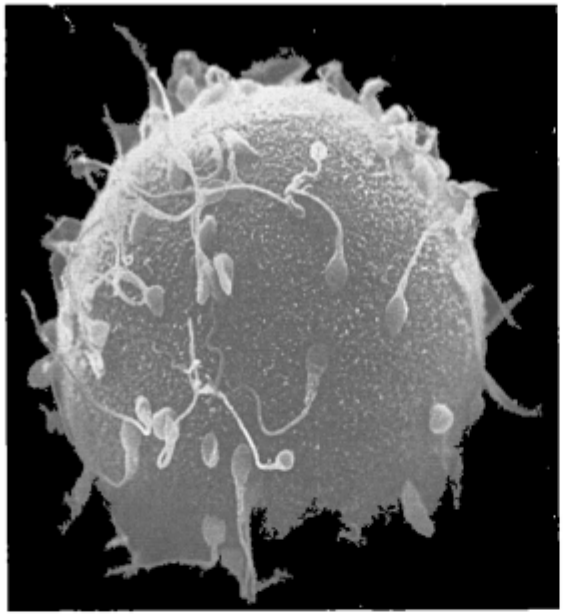
فصل ۱

زندگی با سلول‌ها آغاز می‌شود



یک سلول منفرد ۲۰۰ میکرومتری (μm)، تخمک انسان، با اسپرم، که آنها هم سلول‌هایی منفرد هستند. از اتحاد یک تخمک و اسپرم، ۱۰ تریلیون سلول یک بدن انسان به وجود می‌آیند.

رئوس مطالب

۱.۱ تنوع و اشتراکات سلول‌ها

۱.۲ مولکولهای یک سلول

۱.۳ اعمال سلول‌ها

۱.۴ مروری بر سلول‌ها و اجزای آنها

۱.۵ چشم اندازی بر تکامل ژنوم

سلول‌های تشکیل دهندهٔ بدنمان مانند خودمان، می‌توانند رشد کنند، تولیدمثل نمایند، اطلاعات را پردازش کرده و به محرکها پاسخ دهند. آنها ترتیبی شگفت‌انگیز از واکنش‌های شیمیایی را انجام می‌دهند. این توانایی‌ها زندگی را تعریف می‌کنند. انسان و دیگر موجودات چندسلولی شامل میلیاردها یا تریلیون‌ها سلول سازمان‌یابی شده در ساختارهای پیچیده هستند، اما تعدادی ازموجودات فقط یک سلول انفرادی دارند. با این حال حتی موجودات تک‌سلولی ساده تمام صفات مشخص کنندهٔ زندگی را نشان می‌دهند که این امر بر این موضوع دلالت دارد که سلول واحد اساسی زندگی است. به محض شروع قرن بیست و یکم با انفجاری از اطلاعات جدید دربارهٔ اجزاء تشکیل دهندهٔ سلول مواجه شدیم از جمله اینکه سلول‌ها شامل چه ساختارهایی می‌باشند، چگونه با همدیگر تماس داشته و چگونه همدیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهند. البته هنوز مطالب زیادی برای یادگیری باقی مانده است، بخصوص در مورد این‌که چطور اطلاعات از طریق سلول‌ها جریان می‌یابند و چگونه سلول‌ها روش‌های مناسب‌تری را برای پاسخگویی انتخاب می‌کنند.

زیست‌شناسی سلولی و مولکولی یک علم غنی و کامل می‌باشد که بیوشیمی، بیوفیزیک، زیست‌شناسی مولکولی، میکروسکوپ، ژنتیک، فیزیولوژی، علم کامپیوتر و زیست‌شناسی تکوینی را در بر می‌گیرد. هر یک از این رشته‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند. در فصل‌های بعدی، اطلاعات و روش‌های تجربی بدست آمده از تمامی این رشته‌ها را تدریجاً در یک داستان چند قسمتی متشکل از تولد، زندگی و مرگ سلول‌ها توصیف خواهیم کرد. در مقدمهٔ این فصل به معرفی گوناگونی سلول‌ها، اجزای تشکیل دهنده و عملکردها و همچنین راه‌های مختلف مطالعه آنها می‌پردازیم.

۱ـ۱ گوناگونی و اشتراکات سلول‌ها

سلول‌ها از لحاظ اندازه و شکل تنوع شگفت‌انگیزی نشان می‌دهند (شکل ۱ـ۱). بعضی از آنها همانگونه که در حرکات آمیب‌ها و روتیفرها دیده می‌شود به سرعت حرکت کرده و ساختارهای قابل تغییر سریع دارند. بقیه سلول‌ها غیرمتحرک و ساکن بوده و از نظر ساختاری پایدار می‌باشند. اکسیژن بعضی از سلول‌ها را از بین می‌برد اما یک نیاز مطلق برای بقیه سلول‌ها می‌باشد. در موجودات چندسلولی بیشتر سلول‌ها با سلول‌های دیگر در کنار هم گرد آمده‌اند. اگرچه بعضی موجودات تک‌سلولی جدا زندگی می‌کنند، ولی برخی دیگر کلونی تشکیل می‌دهند و یا در بدن انواع موجودات دیگر زندگی

می‌کنند. به عنوان مثال باکتری‌هایی که در روده‌ها زندگی می‌کنند به ما در هضم غذا کمک می‌نمایند. علی‌رغم این تفاوتها و تفاوتهای دیگر، همهٔ سلول‌ها در بعضی از جنبه‌های ساختاری مشترک هستند و تعدادی از فرآیندهای پیچیده را به طور اساسی به یک روش مشابه انجام می‌دهند. همانطور که داستان سلول در سراسر این کتاب بازگو می‌شود، اساس مولکولی هم تفاوت‌ها و هم شباهت‌ها در ساختار و عملکرد سلول‌های گوناگون مورد توجه قرار گرفته است.

سلول‌ها یا پروکاریوتی یا یوکاریوتی می‌باشند

جهان زیستی شامل دو نوع سلول پروکاریوتی و یوکاریوتی می‌باشد. یوکاریوت‌ها شامل چهار سلسله گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و آغازیان می‌باشند. پروکاریوت‌ها شامل باکتری‌ها و آراکئاها[1] می‌باشند. سلول‌های پروکاریوتی متشکل از یک قسمت مجزا می‌باشند که توسط **غشای پلاسمایی** احاطه شده است. آنها فاقد **هستهٔ مشخص** بوده و سازمان‌یابی درونی ساده‌ای دارند (شکل ۲a-۱). **تمام پروکاریوت‌ها** شامل یکی از انواع سلول‌های زیر می‌باشند: باکتری‌ها، نوع بی‌شماری از پروکاریوت‌ها که موجودات تک‌سلولی می‌باشند؛ سیانوباکتری‌ها، یا جلبک‌های سبز- آبی که می‌توانند به صورت تک سلولی یا زنجیرهٔ رشته‌ای متشکل از سلول‌ها باشند. اگرچه سلول‌های باکتریایی اجزاء احاطه شده به وسیلهٔ غشاء (منظور اندامک) ندارند ولی تعداد زیادی پروتئین در مایع درونی خود (یا **سیتوزول**) دارند، که بیان کنندهٔ وجود یک سازمان‌یابی درونی می‌باشد.

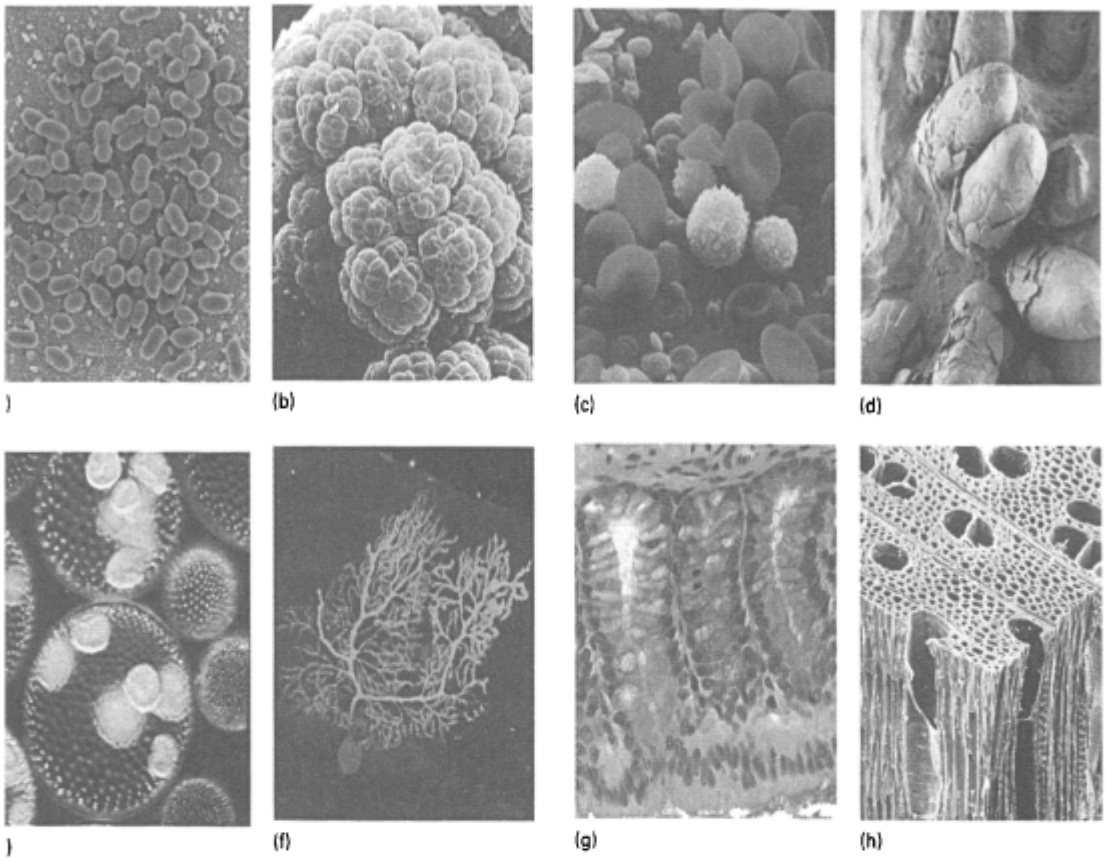
با وجود آنکه پروکاریوت‌ها به طور انفرادی کوچک می‌باشند ولی قسمت عظیمی از تودهٔ زیستی کرهٔ زمین را تشکیل می‌دهند. یک باکتری اشریشیا کلی منفرد وزن خشکی در حدود ۲۵×۱۰^{-۱۴} گرم دارد، با این همه گزارش می‌شود که باکتری‌ها ۱/۵-۱ کیلوگرم وزن متوسط انسان را به طور تخمینی تشکیل می‌دهند. این عدد بیانگر بیشتر از ۴×۱۰^{۱۷} باکتری منفرد در بدن می‌باشد. تخمین زده شده که تعداد باکتری‌ها در کرهٔ زمین ۵×۱۰^{۳۰} باشد و وزن کل آنها در حدود $۱۰^{۱۲}$ کیلوگرم می‌باشد. سلول‌های پروکاریوتی در عمق هفت مایلی اقیانوس و چهل مایلی بالای جو یافت می‌شوند که نشان از قدرت سازگاری آنهاست! کربن ذخیره شده در باکتری‌ها تقریباً به همان اندازهٔ کربن ذخیره شده در گیاهان می‌باشد.

سلول‌های یوکاریوتی، برخلاف سلول‌های پروکاریوتی، شامل یک هسته محاط شده با غشاء و غشاهای گستردهٔ درونی است که اجزاء دیگری بنام **اندامک‌ها** را محصور کرده‌اند (شکل ۲b-۱). ناحیه‌ای از سلول که بین غشای پلاسمایی و هسته قرار گرفته است **سیتوپلاسم** نام دارد و شامل سیتوزول (فاز آبی) و اندامک‌ها می‌باشد. **یوکاریوت‌ها** در برگیرنده تمام اعضای سلسلهٔ گیاهان و حیوانات و همچنین شامل قارچ‌ها که هم در اشکال چندسلولی (کَپک‌ها) و هم تک‌سلولی (مخمرها) وجود دارند، و پروتوزوآها (پروتو، اولیه، زوآن، حیوان)، که اختصاصاً تک‌سلولی می‌باشند هستند. سلول‌های **یوکاریوتی** به طور معمول در حدود $۱۰-۱۰۰\mu m$ طول داشته و عموماً بزرگ‌تر از باکتری‌ها هستند. یک فیبروبلاست انسانی به عنوان یک سلول بافت پیوندی، ممکن است در حدود $۱۵\mu m$ پهنا با یک وزن خشکی تقریباً هزاران برابر آنچه که در سلول باکتریایی اشریشیاکولی دیده می‌شود داشته باشد. آمیب به عنوان یک پروتوزوآی تک سلولی می‌تواند بیشتر از ۰/۵ میلیمتر طول داشته باشد. یک تخم شترمرغ به صورت یک سلول منفرد خیلی بزرگ بوده و به راحتی با چشم غیرمسلح قابل رؤیت است.

تصور می‌شود که تمامی سلول‌ها از یک جد مشترک ایجاد شده‌اند زیرا ساختارها و مولکول‌ها در تمامی سلول‌ها شباهت زیادی دارند. در سال‌های اخیر، آنالیز توالی‌های DNA موجودات مختلف پروکاریوتی، دو نوع جداگانه از آنها شامل **باکتری‌ها** و **آراکئاها** را آشکار نمود. مطالعات بر روی پیوستگی موجودات با ژن‌های شبیه‌تر که از یک جد مشترک ایجاد شده‌اند و آنهایی که دارای ژن‌های نامتشابه‌تر می‌باشند انجام شده است و براساس این مطالعات محققان شجره‌نامهٔ تکاملی نشان داده شده در شکل ۳-۱ را توسعه دادند. براساس این درخت تکاملی، آراکئاها و یوکاریوت‌ها میلیاردها سال قبل از اینکه از یکدیگر جدا شوند از باکتری‌ها جدا شده‌اند. علاوه بر تفاوت‌های توالی DNA که گروه‌های سه گانه موجودات را تعیین می‌کند، غشای سلولی آراکئاها ویژگی‌های شیمیایی خاصی دارند که به طور مهمی از غشای باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها متفاوت می‌باشد.

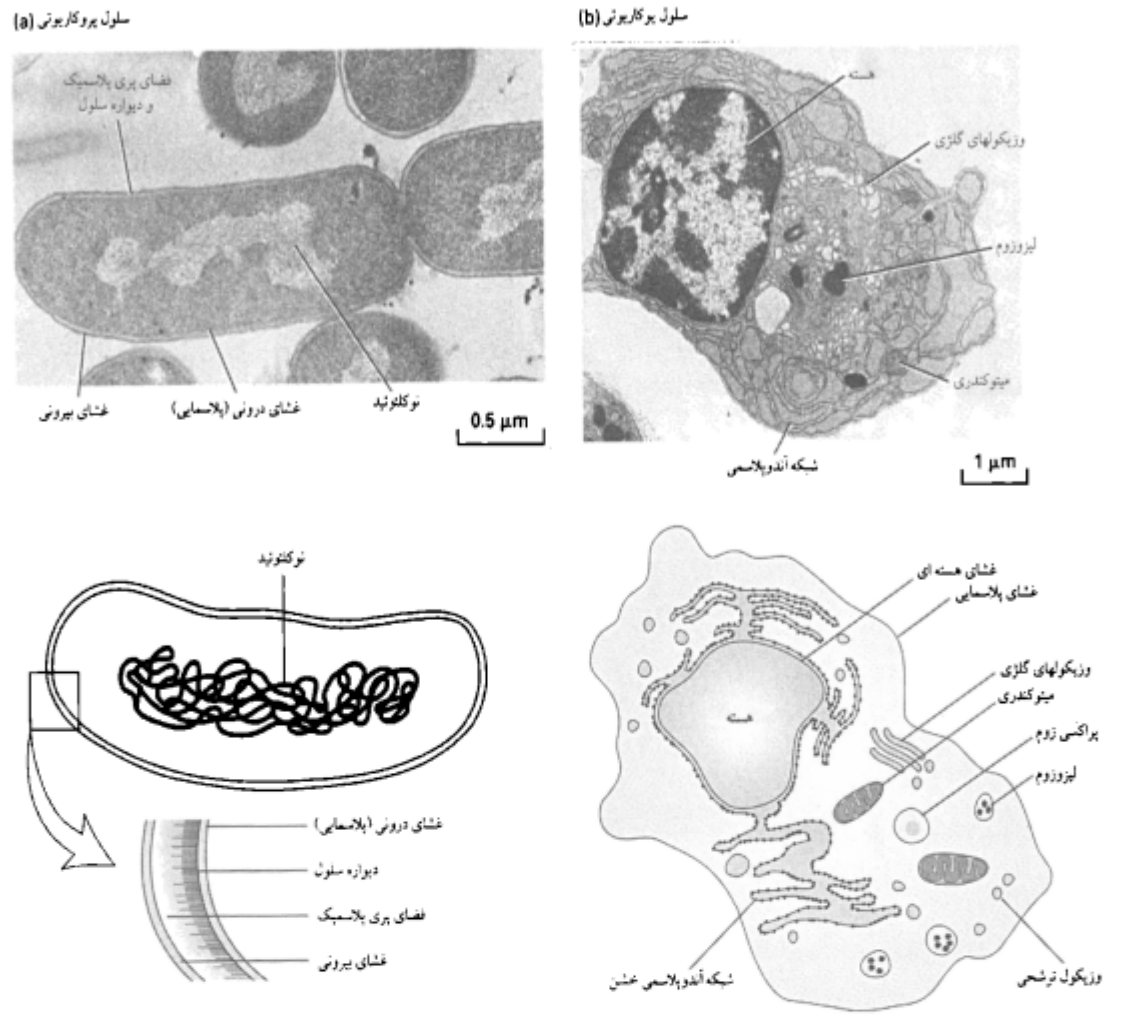
تعدادی از آراکئاها به طور غیرمعمول در محیط‌هایی که ممکن است به شرایط اولیه زندگی در روی کرهٔ زمین شباهت داشته باشد، رشد می‌نمایند. برای مثال، هالوفیل‌ها (نمک دوست‌ها) برای زنده ماندن به غلظت‌های بالایی از نمک نیاز دارند و ترمواسیدوفیل‌ها (گرما و اسیددوست‌ها) در چشمه‌های گرم گوگردی ($۸۰^{\circ}C$) با pH کمتر از ۲ رشد می‌کنند. با این حال آراکئاهای دیگر در محیط‌های فاقد اکسیژن زندگی می‌کنند و متان (CH_4) را توسط ترکیب آب با دی اکسیدکربن تولید می‌کنند.

1- Archeae



▲ **شکل ۱ـ۱ (شکل رنگی) سلول‌ها تنوع شگفت‌انگیزی در شکل و اندازه دارند.** بعضی از تنوعات ریخت‌شناسی سلول‌ها در این تصاویر توضیح داده شده است. سلول‌ها علاوه بر تفاوت در ریخت‌شناسی، در توانایی‌شان در حرکت، سازمان‌یابی درونی (سلول‌های پروکاریوتی در مقابل یوکاریوتی) فعالیت‌های متابولیکی متفاوت می‌باشند. (a) یوباکتری‌ها: به سلول‌های در حال تقسیم توجه نمایید. اینها لاکتوکوکوس لاکتیس[1] هستند که در تولید انواع پنیر مانند پنیر روکفورت[1]، برای[2]، و کامبمبرت[3] کاربرد دارند. (b) توده‌ای از آراکنابا‌کتری‌ها (متانوسارسینا) که انرژی خود را توسط تبدیل دی‌اکسیدکربن و گاز هیدروژن به متان تولید می‌کنند. بعضی از گونه‌های آن که در سیرابی گاو زندگی می‌کنند بیشتر از ۱۵۰ لیتر گاز متان در هر روز تولید می‌کنند. (c) سلول‌های خون، سلول‌های قرمز خون (اریتروسیت‌ها) حامل اکسیژن هستند، سلول‌های سفید خون (لکوسیت‌ها) قسمتی از سیستم ایمنی بود و با عفونت‌ها مبارزه می‌نمایند، و سلول‌های سبز پلاکت‌ها می‌باشند که مواد لازم برای لخته شدن خون در یک زخم را فراهم می‌کنند. (d) سلول‌های بزرگ منفرد: تخم‌های فسیل شدهٔ دایناسور. (e) کلونی از جلبک سبز تک‌سلولی، ولووکس اورئوس. کره‌های بزرگ از تعدادی سلول‌های واحد ساخته شده‌اند که نقطه‌های قابل رویت به رنگ آبی یا سبز هستند. هر کدام از توده‌های زرد رنگی که درون کلونی‌های دختر هستند، از تعدادی سلول ساخته شده‌اند. (f) یک نورون پورکینژ واحد از مخچه که سلول فوق‌العاده بزرگی بوده و می‌تواند از طریق شبکهٔ شاخه‌ای دندریت‌ها بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ ارتباط با سلول‌های دیگر تشکیل بدهد. سلول بواسطهٔ یک پروتئین فلورسنت قابل مشاهده می‌شود؛ جسم سلول مثل یک حبابی در قسمت ته آن می‌باشد. (g) سلول‌ها می‌توانند یک لایهٔ پوششی را تشکیل بدهند. در اینجا قسمتی از وسط روده نشان داده شده است. بلندیِ انگشت مانند سلول‌ها که ویلی نامیده می‌شود، شامل تعدادی سلول در یک لایهٔ ممتد می‌باشد. مواد غذایی حاصل از هضم غذاها از سراسر لایهٔ اپی‌تلیال به خون برای انتقال به سایر قسمت‌های بدن عبور می‌نمایند. سلول‌های جدید به طور پیوسته نزدیک پایهٔ ویلی‌ها تشکیل شده و سلول‌های قدیمی از قسمت سر کنده می‌شوند. (h) سلول‌های گیاهی در گیاهان آوندی به طور محکم در جای خود ثابت شده و توسط یک اسکلت سلولزی سخت محافظت می‌شوند. فضاهای بین سلول‌ها به شبکه‌های انتقال آب و غذاها متصل می‌باشند.

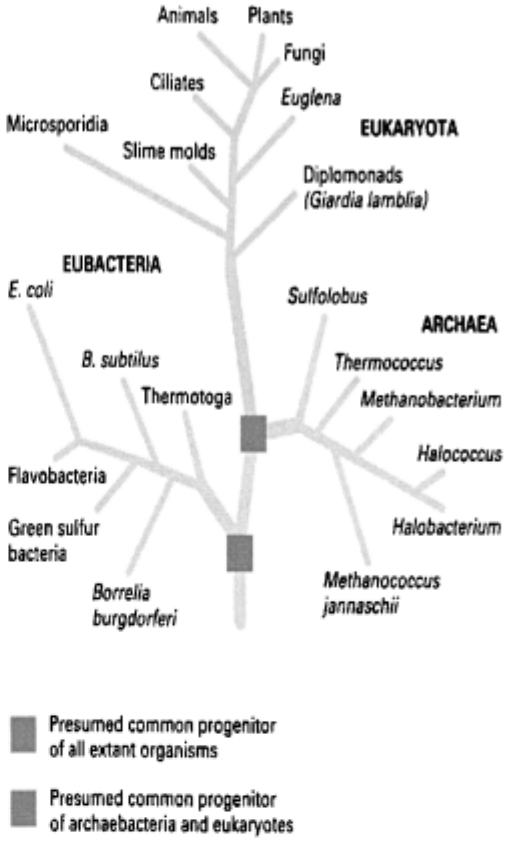
1- Lactococcus lactis
2- Roquefort
3- Brie
4- Camembert



▲ **شکل ۲ـ۱ سلول‌های پروکاریوتی سازمان‌یابی درونی ساده‌تر نسبت به سلول‌های یوکاریوتی دارند.** (a) میکروگراف الکترونی از یک برش عرضی از اشریشیا کلی که یک باکتری شایع روده‌ای می‌باشد. نوکلئوئید، شامل DNA باکتریایی با غشای محصور شده می‌باشد. E.Coli و بعضی از باکتری‌های دیگر توسط دو غشاء احاطه شده‌اند که به وسیلهٔ فضای پری‌پلاسمی از هم جدا می‌شوند. دیوارهٔ سلولی نازک نزدیک به غشای درونی می‌باشد. (b) میکروگراف الکترونی از پلاسماسل، نوعی سلول سفید خون که آنتی بادی‌ها را ترشح می‌کند. تنها یک غشای واحد (غشای پلاسمایی) سلول را احاطه می‌کند، اما قسمت داخلی سلول شامل تعدادی اجزاء محدود به غشاء، یا همان اندامک‌ها می‌باشد. ویژگی مشخص سلول‌های یوکاریوتی مجزا بودن و قرارگرفتن DNA سلولی درون یک هستهٔ مشخص می‌باشد که توسط یک غشاء دوگانه احاطه شده است. غشای بیرونی هسته با شبکهٔ آندوپلاسمی خشن یا ناصاف پیوسته می‌باشد. شبکهٔ آندوپلاسمی خشن محلی برای سنتز و تجمع پروتئین‌ها می‌باشد. وزیکول‌های گلژی پروتئین‌ها را پردازش کرده و تغییر می‌دهند. میتوکندری‌ها انرژی تولید می‌نمایند. لیزوزوم‌ها مواد سلولی را برای چرخهٔ مجدد آنها هضم و تجزیه می‌کنند. پراکسی زوم‌ها مولکول‌ها را با استفاده از اکسیژن پردازش می‌کنند و وزیکول‌های ترشحی مواد سلولی را برای رهایی آنها به سطح سلول حمل می‌کنند.

موجودات تک‌سلولی هم مفید و هم مضر هستند

باکتری‌ها و آرکئاها به عنوان فراوان‌ترین موجودات تک‌سلولی،به طور معمول اندازه‌ای در حدود ۱ـ۲μm دارند. علی‌رغم اندازهٔ کوچک و ساختار ساده، آنها مبدل‌های بیوشیمیایی قابل ملاحظه‌ای‌می‌باشند که مواد شیمیایی ساده را به مولکول‌های زیستی پیچیده تبدیل می‌کنند. باکتری‌ها اگر چه برای اکولوژی کرهٔ زمین مهم می‌باشند، اما بعضی از آنها باعث بیماری‌های خطرناکی می‌شوند: زخم غده‌ای (مرگ سیاه) ناشی از یرسینیاپستیس، گلودرد چرکی ناشی از استرپتومایسس، سیاه زخم ناشی از باسیلوس آنتراسیس، وبا ناشی از ویبریوکلرآ و مسمومیت غذایی ناشی از انواع E.Coli و سالمونلا.



▲ **شکل ۳-۱ تمامی موجودات از باکتری‌های ساده گرفته تا پستانداران پیچیده احتمالاً از یک جد تک‌سلولی مشترک به وجود آمده‌اند.** این درخت خانواده روابط تکاملی را در میان دودمان‌های اصلی درخت موجودات به نمایش می‌گذارد. ساختار این درخت در ابتدا براساس معیارهای ریخت‌شناسی معین شده بود یعنی موجوداتی که شبیه هم به نظر می‌رسند نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. اخیراً توالی‌های DNA و پروتئین‌ها به عنوان معیاری غنی از اطلاعات برای این روابط تکاملی اختصاصی سنجیده شده‌اند. شباهت‌های بیشتر در این توالی‌های ماکرومولکولی، موجودات مربوطه را نزدیک به هم قرار داده است. در این درخت شباهت‌های ریخت‌شناسی حاصل از ثبت و گزارش‌های فسیلی با اطلاعات مولکولی کاملاً در توافق می‌باشند. اگرچه تمام موجودات در دودمان‌های یوباکتریایی و آرکئاها، پروکاریوتی هستند، ولی آراکئاها از بعضی جهات، بیشتر شبیه یوکاریوت‌ها هستند تا یوباکتری‌ها. برای مثال ژنوم‌های یوکاریوتی و آراکئاها پروتئین‌های هیستونی همولوگی را رمزدهی می‌کنند که همراه با DNA می‌باشند، این در حالی است که باکتری‌ها فاقد هیستون می‌باشند. همچنین اجزای RNA و پروتئین ریبوزوم‌های آراکئا بیشتر شبیه یوکاریوت‌ها هستند تا باکتری‌ها.

انسان‌ها مثل گیاهان و حیوانات مخازن بزرگی از باکتری‌ها هستند. ما غذا و سرپناه را برای شمار زیادی از میکروب‌ها با بیشترین تعداد در روده‌هایمان فراهم می‌کنیم. در ازای غذا و مکانی که به باکتری‌ها اجازهٔ تکثیر می‌دهد، آنها در هضم غذا به ما کمک می‌کنند. یک باکتری معمول و شایع در روده که همچنین یک موجود آزمایشگاهی دلخواه نیز می‌باشد، E.Coli است. سلول‌های روده در پاسخ به پیام‌هایی از باکتری‌هایی مانند E.Coli، موقعیت مناسبی را برای زندگی باکتری فراهم می‌کنند. بنابراین تسهیل صحیح هضم غذا ناشی از عملکرد هماهنگ باکتری‌ها و سلول‌های روده‌ای است. به طور معکوس، تغییرات سلول‌های روده‌ای، بعضی از ویژگی‌های باکتری‌ها را که برای هضم مؤثر غذا در روده لازم است تحت تأثیر قرار می‌دهد. اینگونه ارتباط و پاسخ یکی از ویژگی‌های معمول سلول‌ها می‌باشد.

به طور طبیعی بعضی اوقات هم‌زیستی مسالمت‌آمیز انسان‌ها و باکتری‌ها توسط یک یا هر دو طرف مقابل به ناآرامی و خشونت کشیده می‌شود. وقتی که باکتری‌ها در جایی از بدن که برای ما خطرناک است شروع به رشد می‌کنند (یعنی، در جریان خون یا در یک زخم)، سلول‌های ایمنی برای خنثی‌سازی یا بلعیدن عوامل خارجی و مخلّ به نبرد بر می‌خیزند. داروهای آنتی بیوتیک قوی که به طور انتخابی سلول‌های پروکاریوتی را مسموم می‌کنند، به سرعت به یاری و کمک به پاسخ ایمنی (که همراه با تأخیر است) می‌شتابند. فهم زیست‌شناسی مولکولی سلول‌های باکتریایی اطلاعاتی از چگونگی مسموم شدن این باکتری‌ها توسط آنتی بیوتیک‌ها و یا چگونگی مقاومت آنها به آنتی بیوتیک‌ها و اینکه چه فرآیندها یا ساختارهایی در سلول‌های باکتریایی وجود دارد ولی در سلول‌های انسانی وجود ندارد و چگونه این فرایندها ممکن است هدف مفیدی برای داروی‌های جدید باشد فراهم آورده است.

آغازیان مانند باکتری‌ها، معمولاً اعضای مفید و سودمندی در زنجیرهٔ غذایی می‌باشند. آنها نقش‌های کلیدی در باروری و حاصلخیزی خاک، کنترل جمعیت باکتریایی و دفع ترکیبات نیتروژنی و فسفاتی ایفا کرده، و نقش‌آفرینانی کلیدی در بهبود سیستم‌های ضایعاتی (هم طبیعی و هم مصنوعی) می‌باشند. این یوکاریوت‌های تک‌سلولی همچنین قسمت‌های مهمی از اکوسیستم‌های دریایی می‌باشند زیرا مصرف کننده‌های بزرگ فیتوپلانکتون‌ها و جلبک‌های فوتوسنتتیکی هستند که نور خورشید را برای تولید اشکال مفید زیستی انرژی و مولکول‌های کوچک سوختی استفاده می‌کنند.

با این‌حال بعضی از آغازیان به ما ضرر و زیان می‌رسانند: اِنتامو با

هیستولیتیکا[1] اسهال خونی ایجاد می‌نماید؛ تریکوموناس واژینالیس[2] عفونت واژنی؛ و تریپانوزوما بروسئی، بیماری خواب را ایجاد می‌نمایند. هر ساله مهلک‌ترین پروتوزوآ یعنی پلاسمودیوم فالسیپاروم و گونه‌های مربوطه، باعث بیش از ۳۰۰ میلیون مورد جدید مالاریا می‌شوند. مالاریا بیماری است که ۱/۵ تا ۳ میلیون نفر را سالانه از بین می‌برد. این آغازیان به ترتیب در پستانداران و پشهٔ آنوفل سُکنی می‌گزینند و ریخت‌شناسی و رفتارشان در پاسخ به پیام‌ها در هر یک از این محیط‌ها تغییر می‌کند. آنها همچنین گیرنده‌هایی را روی سطوح سلول‌هایی که آلوده کرده‌اند شناسایی می‌کنند. چرخهٔ پیچیدهٔ زندگی پلاسمودیوم به طور شگفت‌انگیزی بیان می‌کند که چگونه یک سلول منفرد می‌تواند برای هر چالش جدیدی که با آن مواجه می‌شود خود را وفق دهد (شکل ۴ـ۱). تمام تغییرات شکلی که در طول چرخهٔ زندگی پلاسمودیوم روی می‌دهد توسط دستورالعمل‌های رمزشدهٔ مادهٔ ژنتیکی این انگل و بخش‌های محیطی که آنها در آن قرار می‌گیرند کنترل شده است.

گروه دیگری از یوکاریوت‌های تک سلولی مخمرها می‌باشند که همچون خویشاوندان چندسلولی‌شان (کپک‌ها)، نکات خوب و بدی را در مواجهه با انسان‌ها دارند. مخمرها و کپک‌ها، که با هم قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند نقش اکولوژیکی مهمی در تجزیهٔ باقیمانده‌های حیوانات و گیاهان برای استفاده مجدد دارند. آنها همچنین شمار زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها را ساخته و در تولید نان، آبجو، شراب و پنیر هم مورد استفاده قرار می‌گیرند. بیماری‌های قارچی چندان خوشایند نیستند و دامنه‌ای از عفونت‌های پوستی مانند جَرَب و میخچهٔ پا تا التهاب ریوی تهدیدکنندهٔ زندگی و **پنومونیاهای پنوموسیستیت** کارینی، علت شایع مرگ در بیماران ایدزی را تشکیل می‌دهند.

ویروس‌ها انگل‌های اجباری می‌باشند

همه پاتوژن‌های میکروسکوپی، سلول‌ها نیستند. شناخته شده‌ترین موجودات دیگر که ایجاد بیماری می‌کنند ویروس‌ها می‌باشند که از ماشین درونی سلول‌ها استفاده کرده و سلول‌ها را برای تکثیر خودشان آلوده می‌کنند. بیماری‌های ایجاد شده توسط ویروس‌ها خیلی زیاد بوده و همگی نیز شناخته شده‌اند: آبله مرغان، آنفلوآنزا، بعضی از انواع التهاب ریه، فلج اطفال، سرخک، هاری، هپاتیت، سرماخوردگی شایع و تعدادی بیماریهای دیگر. بیماری آبله که روزگاری یک بلا در سراسر جهان بود، با یک دهه سعی و تلاش طولانی در ایمن‌سازی جهانی، در اواسط دههٔ ۱۹۶۰ ریشه‌کن شد.

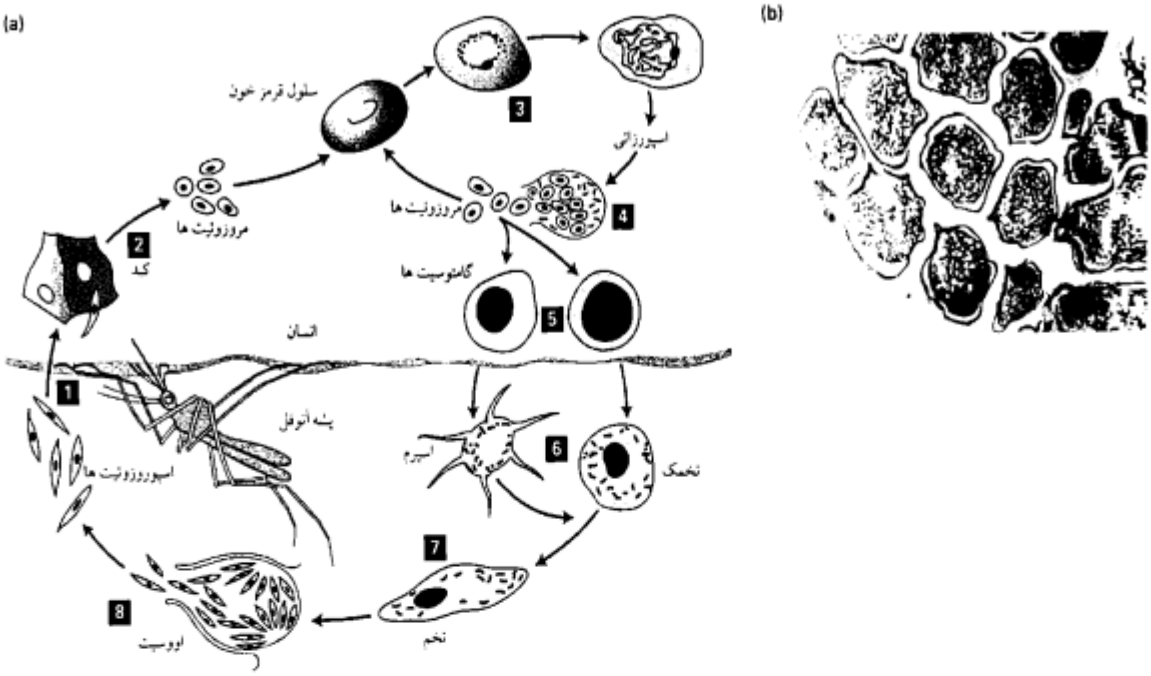
عفونت‌های ویروسی در گیاهان (به طور مثال، ویروس موزائیک قدکوتاه یا پاکوتاه در ذرت) تأثیر اصلی اقتصادی بر تولید محصولات کشاورزی دارند. کاشت گونه مقاوم به ویروس، بوسیلهٔ شیوه‌های آمیزشی سنتی و اخیراً به وسیله تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌تواند از بین رفتن محصولات کشاورزی را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد. بیشتر ویروس‌ها دامنه‌ای نسبتاً محدود از میزبان را دارا می‌باشند، بعضی‌ها باکتری‌ها را آلوده کرده و بعضی گیاهان یا حیوانات را آلوده می‌کنند (شکل ۵ـ۱).

به خاطر اینکه ویروس‌ها نمی‌توانند رشد کرده یا تولیدمثل نمایند، با این تعریف از «زنده»، جزء موجودات زنده به حساب نمی‌آیند. یک ویروس برای بقاء و زنده ماندن، باید یک سلول میزبان را آلوده کرده و ماشین درونی آن را برای سنتز پروتئین‌های خود به خدمت گرفته و در بعضی از موارد مادهٔ ژنتیکی ویروسی تکثیر پیدا کند. هنگامی که ویروس‌های جدید در سلول میزبان ساخته شدند توسط جوانه‌زنی از غشاء سلول رها می‌شوند و یا هنگامی که سلول آلوده میزبان می‌ترکد از آن رها شده و یک چرخهٔ جدید را شروع می‌کنند. ویروس‌ها خیلی کوچک‌تر از سلول‌ها می‌باشند، به عبارتی در مقایسه با سلول‌های باکتریایی که معمولاً بیشتر از ۱۰۰۰ نانومتر قطر دارند ($1nm=10^{-9}m$) در حدود ۱۰۰ نانومتر قطر دارند؛ یک ویروس به طور معمول از یک پوشش پروتئینی که یک هسته حاوی مادهٔ ژنتیکی را محصور می‌نماید تشکیل شده است. این مادهٔ ژنتیکی خود اطلاعاتی را برای تولید ویروس‌های بیشتر به همراه دارد (فصل ۴). این پوشش، ویروس را از محیط اطراف محافظت نموده و به ویروس اجازه می‌دهد که به محیط چسبیده و یا به درون سلول‌های میزبان ویژه وارد شود. در بعضی از ویروس‌ها پوشش پروتئینی توسط یک غلاف غشاء مانند بیرونی احاطه شده است.

توانایی ویروس‌ها در انتقال ماده ژنتیکی به درون سلول‌ها و بافت‌ها هم یک تهدید برای پزشکی و هم یک فرصت برای آن ایجاد می‌کند. عفونت‌های ویروسی به طور ویران کننده‌ای در سلول‌ها ایجاد شده و سلول‌ها نابود و بافت‌ها از هم پاشیده می‌شوند. به هرحال، چندین روش برای دستکاری سلول‌ها از طریق انتقال مادهٔ ژنتیکی توسط ویروس‌ها به درون سلول‌ها وجود دارد. برای انجام این امر، قسمتی از مادهٔ ژنتیکی ویروسی که به طور بالقوه مضر است با مادهٔ ژنتیکی دیگر، یعنی ژن‌های انسانی، جایگزین می‌شود. حال ویروس‌های تغییریافته، یا **وکتورها**، می‌توانند همراه با ژن‌های

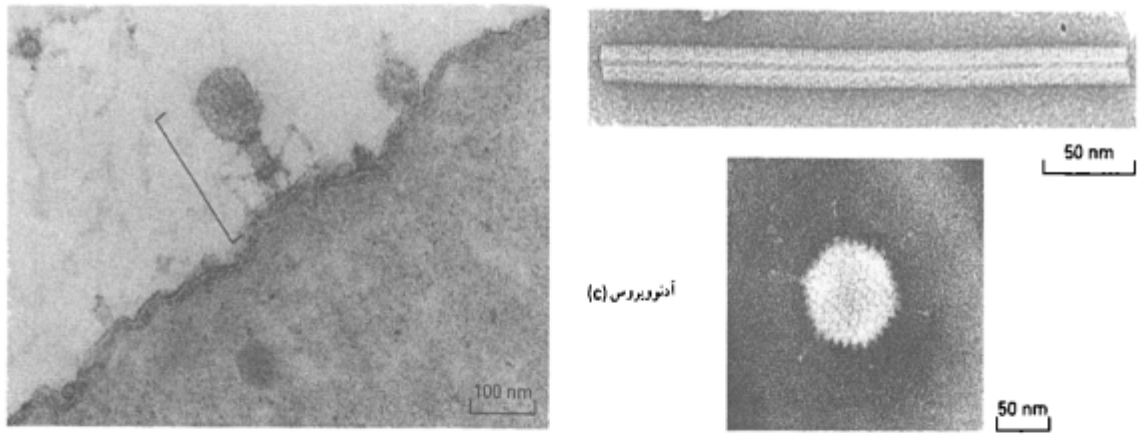
1- Entamoeba histolytica 2- Trichomonas Vaginalis

اسپوروزوئیت پلاسمودیوم در درون و بیرون یک سلول کبدی



▲ **شکل ۴-۱ ارگانیسم‌های پلاسمودیوم. انگل‌هایی که باعث ایجاد مالاریا می‌شوند، آغازیانی تک‌سلولی با چرخهٔ زندگی شگفت‌انگیز و قابل توجه می‌باشند.** تعدادی از گونه‌های شناخته شده پلاسمودیوم می‌توانند توسط چرخه‌ای بین میزبان‌های حشره و مهره‌دار، حیوانات گوناگونی را آلوده کنند. چهارگونه‌ای که باعث مالاریا در انسان می‌شوند چندین تغییر شکل مهم را در درون میزبان‌های پشهٔ آنوفل و انسان متحمل می‌شوند. (a) نمودار چرخهٔ زندگی. اسپوروزوئیت‌ها هنگامی که یک پشهٔ آنوفل آلوده، شخصی را نیش می‌زند وارد یک میزبان انسان می‌شوند ❶. آنها به کبد مهاجرت کرده و به مروزوئیت‌ها تبدیل شده و به جریان خون رها می‌شوند ❷. مروزوئیت‌ها ذاتاً از اسپوروزوئیت‌ها متفاوت می‌باشند، بنابراین این تغییر شکل یک دگردیسی می‌باشد. مروزوئیت‌های موجود در جریان خون، سلول‌های قرمز خون (RBCs) را مورد تهاجم قرار داده و درون آنها تکثیر می‌یابند ❸. پروتئین‌های تولید شده توسط بعضی از گونه‌های پلاسمودیوم به سطح سلول‌های قرمز آلوده حرکت کرده و باعث می‌شوند که سلول‌ها به دیوارهٔ رگ‌های خونی بچسبند. این کار مانع از آن می‌شود که سلول‌های قرمز آلوده از جریان خون به طحال بروند، زیرا در طحال سلول‌های سیستم ایمنی، سلول‌های قرمز و پلاسمودیوم همراه آنها را نابود خواهند کرد. بعد از رشد و تولیدمثل در سلول‌های قرمز برای یک دوره‌ای از زمان و بر حسب ویژگی هرگونهٔ پلاسمودیوم، مروزوئیت‌ها همزمان به طور ناگهانی از تعداد زیادی سلول‌های آلوده به خارج می‌ترکند ❹. این رویداد باعث تب و لرز می‌شود که یکی از نشانه‌های شناخته‌شدهٔ مالاریا است. بعضی از مروزوئیت‌های رها شده، سلول‌های قرمز دیگری را آلوده می‌کنند و دوباره یک چرخهٔ تولید و عفونت را ایجاد می‌نمایند. سرانجام، بعضی مروزوئیت‌ها به گامتوسیت‌های نر و ماده تبدیل می‌شوند ❺ که نوعی دگردیسی دیگر می‌باشد. این سلول‌ها که حاوی نیمی از تعداد معمول کروموزوم‌ها می‌باشند، نمی‌توانند برای مدت طولانی زنده بمانند مگر این که آنهایی که در خون هستند به یک پشهٔ آنوفل انتقال یابند. در معدهٔ پشه، گامتوسیت‌ها به اسپرم یا تخمک‌ها (گامت‌ها) تغییر شکل می‌دهند که در حقیقت نوعی دگردیسی بوده و با توسعهٔ تاژک‌های مومانند بلند روی اسپرم همراه است ❻. الحاق تخمک و اسپرم، تخم را تولید می‌کند ❼ که درون سلول‌های دیوارهٔ معده قرار گرفته و به اووسیت‌ها تبدیل می‌شوند. معده جایگاه ضروری و لازم را برای تولید اسپوروزوئیت‌ها فراهم می‌کند. پاره شدن یک اووسیت هزاران اسپوروزوئیت رها می‌کند ❽. اسپوروزوئیت‌ها به غدد بزاقی مهاجرت می‌کنند، مرحله‌ای که برای عفونت میزبان انسان وضع شده است. (b) میکروگراف الکترونی از اووسیت‌های بالغ و اسپوروزوئیت‌های حاصل شده. اووسیت‌های متصل به سطح خارجی سلول‌های دیوارهٔ معده که درون غشایی که از آنها در مقابل سیستم ایمنی میزبان محافظت به عمل می‌آورد، محصور شده‌اند.

موجود در آنها وارد سلول‌ها شوند (فصل ۹). ممکن است روزی بیماری‌های ایجاد شده توسط ژن‌های معیوب بوسیلهٔ کاربرد وکتورهای ویروسی با وارد کردن یک نسخه طبیعی از یک ژن معیوب به درون سلول‌های بیماران، درمان شوند. تحقیقات فعلی برای غلبه بر



▲ **شکل ۵ـ۱ ویروس‌ها برای رشد و تولید مثل باید یک سلول میزبان را آلوده کنند.** این میکروگراف‌های الکترونی بعضی از ساختارهای گوناگون و متنوع به نمایش گذاشته شده توسط ویروس‌ها را شرح می‌دهند. (a) باکتریوفاژ T4 (کروشه) از طریق یک ساختارِدُمی به یک سلول باکتریایی‌متصل می‌شود. ویروس‌هایی که باکتری‌ها را آلوده می‌نمایند باکتریوفاژ یا به طور ساده‌تر فاژ نامیده می‌شوند. (b) ویروس موزائیک تنباکو که یک حالت لکه‌دار و خالدار در برگ‌های گیاه آلوده شدهٔ تنباکو ایجاد می‌نماید و مانع پیشرفت رشد آنها می‌گردد. (c) آدنوویروس باعث عفونت‌های چشم و مجاری تنفسی در انسان‌ها می‌شود. این ویروس یک غلاف غشایی بیرونی دارد که میله‌های گلیکوپروتئینی بلند از آن به بیرون آمده‌اند.

موانع موجود در این روش مانند دریافت ژن‌های وارد شده در مکان‌ها و زمان‌های مناسب و صحیح در حال انجام است.

تغییرات در سلولی زمینهٔ تکامل تدریجی می‌باشد

قابل توجه‌ترین ویژگی موجودات زنده توانایی آنها در تولیدمثل می‌باشد. تولیدمثل زیست شناختی به همراه انتخاب تکاملی برای طراحی یک بدن بسیار عملکردی دلیلی بر این موضوع است که خرچنگ‌های نعل اسبی امروزی بیشتر از آنهایی که ۳۰۰ میلیون سال قبل بوده‌اند در یک دورهٔ زمانی در دامنه‌های کوهستان‌های تِتون در وایومینگ زندگی کرده‌اند، کوهستان‌های تِتون در وایومینگ در حدود ۱۴۰۰۰ فوت ارتفاع داشته و هنوز این خرچنگ‌ها در آن زندگی می‌کنند. هنوز خرچنگ‌های نعل‌اسبی با یک دورهٔ عمر حدود ۱۹ ساله، دقیقاً نیم میلیون بار از اجداد خود در طول آن دوره تولیدمثل کرده‌اند. این ایده که ساختارهای زیست‌شناختی گذرا بوده و ساختارهای زمین شناختی پایدارند برخلافِ واقعیت، صحیح می‌باشد. علی‌رغم دورهٔ محدود شدهٔ زندگی فردی، تولیدمثل به ما پتانسیلی برای بقاء و نامیرایی می‌دهد که یک کوهستان یا یک صخره ندارد.

در حالیکه بعضی گونه‌ها در دوره‌هایی در مدت زمان کمتر تغییر یافته‌اند ولی دیگر موجودات به نحوی شگفت‌انگیز در طول همان دوره تغییر یافته‌اند. این تغییرات در پاسخ به فشارهایی از محیط که بقاء افراد گوناگون را به وجود آورده‌اند ایجاد شده‌اند. هم رکود و سکون و هم تغییر در این دوره‌ها ممکن می‌باشد زیرا دستگاه ماشینی سلول‌ها یک کار شگفت‌انگیز در همانندسازی مادهٔ ژنتیکی انجام می‌دهند، با وجود این، خطاهای نادر منجر به تنوعات و گوناگونی‌ها در موجودات می‌شود. اگر شرایط محیطی برای انتخاب بیشتر یا کمتر شکل موجود ادامه یابد، مانند مورد خرچنگ‌های نعل اسبی، گونه‌ها کمتر تغییر خواهند یافت. اگر یک گونهٔ جدید به خاطر تغییرات شرایط، مزیتی برای بقاء داشته باشد، ممکن است با شکل قدیمی جایگزین شود. برای مثال جمعیت‌هایی از باکتری‌هایی که در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفته‌اند، به طور شگفت انگیزی ویژگی‌هایشان را برای در امان ماندن و زندگی کردن تغییر می‌دهند. آنها به این خاطر این عمل را انجام می‌دهند که جهش‌های نادر، تغییراتی را در مادهٔ ژنتیکی‌شان ایجاد می‌کند که اجازهٔ مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها را به آن‌ها می‌دهد و بدین نحو بعضی از سلول‌ها که جهش یافته‌اند زنده می‌مانند در حالی که سلول‌های بدون آن جهش‌ها از بین می‌روند. بیشتر جمعیت‌های هر گونهٔ منفرد مجموعهٔ بزرگی از تغییرات ژنتیکی دارند زیرا سرعت خطا در همانندسازی از ژن‌ها به طور کمّی قابل توجه می‌باشد. این سرعت خطا در حضور اشعه مانند نور خورشید یا بعضی از سموم شیمیایی افزایش می‌یابد. پروژه‌های ژنومی حاضر

تنوع ژنتیکی را در انسان‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند. توالی ژنوم «انسان» که هم اکنون تعیین شده است فقط یک دیدگاه از میان میلیاردها می‌باشد. فهم تنوع ژنتیکی برای بررسی اینکه ما به طور متفاوت به بعضی از عفونت‌ها یا داروها پاسخ می‌دهیم ضروری می‌باشد. و همچنین نشان‌دهندهٔ این است که میراث ژنتیکی ما به همراه تجربه و یادگیری‌مان برای بوجودآوردن خصوصیات بی‌نظیرمان ضروری هستند.

تولیدمثل موجودات، به علت همسانه‌سازی از سلول‌ها می‌باشد، و این همسانه‌سازی برای کنترل اندازه، شکل، و سازمان‌یابی حیوانات باید دقیق باشد تا از موارد ناخواسته مانند سرطان پیشگیری نماید. سلول ماشینی است که می‌تواند از خودش رونوشت تولید کند در حالیکه ویروس‌ها، نمی‌توانند این عمل را انجام دهند. همان طور که ما در فصول ۲۰ و ۲۱ مشاهده خواهیم کرد در چرخهٔ سلولی یک سلول منفرد، محتویات لازم برای تقسیم به دو سلول وجود دارد و این چرخه توسط یک سری تبدیلات ظریف و مکانیسم‌های منع عبوری کنترل شده است. تولیدمثل سلول‌ها دقیقاً موضوعی از مرگ و زندگی می‌باشد.

حتی سلول‌های منفرد هم می‌توانند جنسیت داشته باشند

اگر مادهٔ ژنتیکی هرگز تغییر نمی‌کرد یا مبادله نمی‌شد، هر فرد با آغازی از یک کلون جدید از افراد همراه بود و اعضای یک کلون همان قدرت و ضعف‌های ژنتیکی را دارا خواهند بود. آمیزش جنسی یک فرآیند آمیختگی تنوع ژنتیکی از دو فرد است که ایجاد کنندهٔ افرادی جدیدی با ترکیبی از صفات متفاوت از هر کدام از والدین است که ممکن است برای بقاء و تولیدمثل مفید باشد. همه کروموزوم‌ها به استثنای کروموزوم‌های جنسی به صورت دوتایی بوده و حاوی یک رونوشت از پدر و یکی از مادر است. نظر به این‌که هر جفت کروموزوم قطعاتی را در طول تشکیل تخمک‌ها و اسپرم‌ها با هم مبادله کرده‌اند ترکیبات جدیدی از ژن‌ها ایجاد می‌شود و در نسل بعدی به ارث می‌رسند که نشان‌دهنده تنوع تسریع یافته است. مزیت دیگر داشتن دو رونوشت از هر کروموزوم این است که یک ژن ضعیف از لحاظ عملکردی به وسیلهٔ رونوشت دیگر حمایت و پشتیبانی شده است.

مخمر معمول و رایج به کار برده شده در تولید نان و آب جو، ساکارومایسیس سرویزیه است که تا اندازه‌ای به دفعات در این کتاب آورده شده است زیرا به عنوان یک موجود آزمایشگاهی مهم مطرح است. مخمرها مانند تعداد دیگری از موجودات تک‌سلولی، دو نوع جفت دارند که به طور فرضی مثل گامت‌های نر و ماده (اسپرم و تخمک‌ها) موجودات عالی می‌باشند. دو سلول مخمر برخلاف نوع جفت می‌توانند برای تولید نوع سومی از سلول که شامل مادهٔ ژنتیکی هر کدام از سلول‌هاست با هم جفت شوند (شکل ۱.۶). اینگونه چرخه‌های جنسی زندگی اجازه می‌دهند که تغییرات سریع‌تر در وراثت ژنتیکی نسبت به آمیزش غیر جنسی روی دهد که منجر به سازگاریهای ارزشمندی شده و جهش‌های زیان‌آور به سرعت حذف می‌شوند.

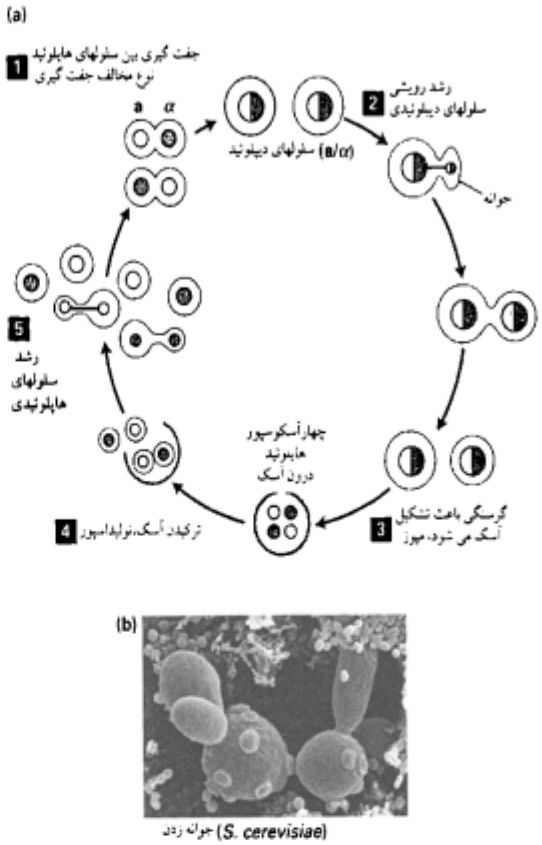
ما از یک سلول منفرد به وجود می‌آئیم

در سال ۱۸۲۷، پزشک آلمانی بنام کارل فون بائر کشف کرد که پستانداران از تخمکهای حاصل از تخمدان مادر به وجود می‌آیند. لقاح یک تخمک به وسیلهٔ یک سلول اسپرم، تخم را ایجاد می‌نماید که سلولی با قطر $200\mu m$ می‌باشد. هر انسان از یک تخم ایجاد می‌شود که حاوی تمام دستورالعمل‌های ضروری برای ساخت بدن یک انسان شامل حدود ۱۰۰ تریلیون (10^{14}) سلول است. رشد و نمو[1] با تقسیم تخمک لقاح یافته به دو، چهار و سپس هشت سلول شروع می‌شود که جنین خیلی ابتدایی را تشکیل می‌دهد (شکل ۱.۷). تکثیر سلول‌ها ادامه یافته و سپس تمایز[2] به انواع جداگانهٔ سلول، باعث ایجاد هر بافتی در بدن می‌شود. یک سلول اولیه تخمک لقاح‌یافته (تخم)، صدها نوع مختلف از سلول‌ها را تولید می‌نماید که در محتویات، شکل، اندازه، رنگ، تحرک و ترکیبات سطحی متفاوت می‌باشند. ما در فصول ۱۶ و ۲۲ ملاحظه خواهیم کرد که چگونه ژن‌ها و پیام‌ها تمایز سلولی را کنترل می‌نمایند.

ساخت انواع متفاوتی از سلول‌ها، عضله، پوست، استخوان، نورون، سلول‌های خونی، برای ایجاد بدن انسان کافی نمی‌باشند. سلول‌ها باید به طور صحیح درون بافت‌ها، اندام‌ها و دستگاه‌ها قرار گرفته و سازمان‌یابی شوند. دو دستِ ما سلول‌های یکسانی دارند، ولی ترتیب متفاوت آن دو (تصویر آینه‌ای) برای عملکرد آنها حیاتی می‌باشند. به علاوه تعدادی از سلول‌ها أعمال مختلف و یا ساختارهای نامتقارن نشان می‌دهند، که اغلب این ویژگی، **قطبیت**[3] نامیده می‌شود. به خاطر قطبیت و عدم تقارن سلول‌ها، بافت‌هایی مانند جدار روده‌ها و ساختارهایی مانند دست‌ها و قلب نیز قطبی می‌شوند. ویژگی‌هایی که بعضی از سلول‌ها را قطبی می‌نمایند و این که چگونه این ویژگی‌ها ایجاد می‌شوند در فصول بعدی از جمله فصل ۲۱، بررسی خواهند شد.

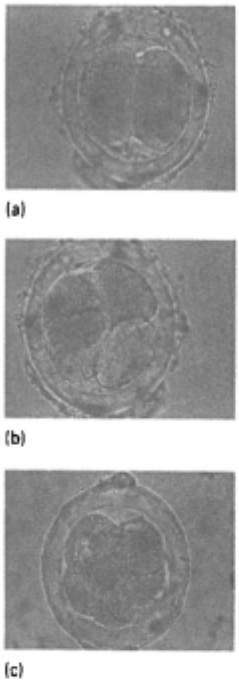
1-Development 2-Differentiation

3-Polarity



▲ **شکل ۶ـ۱ (شکل رنگی) مخمر ساکارومایسیس سرویزیه به صورت جنسی و غیرجنسی تولیدمثل می‌نماید.** (a) دو سلول متفاوت به نام‌های a و α می‌توانند آمیزش کرده و یک سلول، a/α را تولید کنند ❶. سلول‌های a و α هاپلوئید بوده و شامل یک رونوشت از هر کروموزوم می‌باشند. آمیزش، یک سلول دیپلوئید a و α را حاصل می‌کند که شامل دو رونوشت از هر کروموزوم می‌باشد. در طول رشد رویشی، سلول‌های دیپلوئیدی به وسیلهٔ جوانه‌زدن میتوزی تکثیر می‌یابند که یک فرآیند غیرجنسی می‌باشد ❷. تحت شرایط گرسنگی، سلول‌های دیپلوئیدی نوعی از تقسیم سلولی به نام میوز را برای تشکیل آسکوسپورهای هاپلوئیدی انجام می‌دهند ❸. ترکیدن یک آسک چهار اسپور هاپلوئیدی آزاد می‌کند که می‌توانند شروع به رشد کرده و سلول‌های هاپلوئیدی تولید نمایند ❹. اینها همچنین می‌توانند به صورت غیرجنسی تکثیر یابند.(b) ❺. میکروگراف الکترونی از جوانه زنی سلول‌های مخمر. بعد از هر جوانه زنی شکاف‌ها رها شده، یک آسک در سمت چپ جایگاه جوانه زنی قرار گرفته و بنابراین شماری از جوانه‌های قبلی می‌توانند ظاهر شوند. سلول‌های نارنجی رنگ، باکتری‌ها می‌باشند.

رشد و نمو ابتدایی جنینی



▲ **شکل ۷ـ۱ تعداد کمی تقسیمات اولیه سلول از یک تخمک لقاح یافته کل مراحل رشد را تعیین می‌کند.** یک جنین توسعه یافته موش در مراحل (a) دوسلولی، (b) چهارسلولی، و (c) هشت سلولی نشان داده شده است. جنین توسط غشاهای محافظ احاطه شده است. مراحل مشابهی در رشد و نمو انسان در طول اولین روزهای بعد از لقاح نیز روی می‌دهد.

سلول‌های بنیادی، اساس تشکیل بافت‌ها و اندام‌ها، پیشنهادی برای فرصت‌های پزشکی

زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی[1]، (سلول‌هایی که می‌توانند منجر به تولید انواع سلول‌ها و بافت‌های ویژه شوند) موضوع تحقیق جالبی را به وجود آورده است. ما می‌توانیم سلول‌های بنیادی را با انواع ساده‌تری از باکتری‌ها مقایسه نماییم. وقتی که یک سلول باکتریایی E.coli تقسیم می‌شود هر دو سلول دختری در حجم، اندازه، و شکل معادل و نسبتاً مشابه هم می‌باشند. در بعضی از باکتری‌های دیگر و در تعدادی موارد تقسیم سلول یوکاریوتی، دو سلول دختر از جهات مهمی متفاوت می‌باشند. با اینکه دو سلول مادهٔ ژنتیکی یکسانی را خواهند داشت، ولی ممکن است در اندازه، شکل و محتویات با هم تفاوت داشته باشند. سلول‌ها ممکن است سرنوشت‌های متفاوتی داشته

باشند، یعنی ممکن است به انواع متفاوتی از سلول‌های تمایز یافته تبدیل شوند. تقسیمی که دو سلول دختر متفاوت را تولید می‌نماید بعضی اوقات به عنوان یک تقسیم سلولی **نامتقارن** توصیف شده است.

تقسیمات سلول بنیادی یک مورد ویژه‌ای از تقسیم نامتقارن می‌باشد. یعنی یکی از دو سلول دختر به سلول والدی شبیه بوده و دیگری یک مسیر تمایزی مثل تبدیل شدن به یک سلول خونی را دارند. سلول والدی که یک **سلول بنیادی** نامیده می‌شود می‌تواند در چندین مسیر تقسیمی به تکثیر خودش ادامه داده و در هر تقسیم نیز سلول خونی دیگری را تولید نماید. بیشتر بافت‌ها در بدن ما از سلول‌های بنیادی تشکیل می‌شوند. برای مثال، خون از سلول‌های بنیادی در مغز استخوان تولید می‌شود و تولید سلول‌های خونی جدید برای تمام دورهٔ زندگی ادامه دارد. این پدیده اغلب علت موفقیت‌آمیزبودن‌پیوند مغز استخوان می‌باشد که برای درمان بیماران سرطانی که سلول‌های بنیادی خونشان در اثر درمان‌های سرطان آسیب دیده‌اند به کار گرفته شده است. چیزی که پیوند شده است سلول‌های بنیادی می‌باشد. با این حال، سلول‌های بنیادی خونی فقط تعداد بیشتری از خود و سلول‌های خونی و نه انواع سلول‌های دیگر را تولید می‌کنند. بنابراین هر بافت حداقل در طول دوره‌ای از رشد باید سلول‌های بنیادی خودش را داشته باشد. سلول‌های بنیادی برای هر بافت از سلول‌های بنیادی مستعدتری که توانایی تشکیل انواع متعدد سلول‌های بنیادی را دارا می‌باشند به وجود آمده‌اند. اولین سلول‌های بنیادی در جنین‌های ابتدایی که در آنها تمامی سلول‌های دیگر مستعد تولید انواع سلول‌ها می‌باشند یافت شده‌اند.

در پستانداران، سلول بنیادی نهایی، تخمک لقاح یافته است که سلول‌های جنینی ابتدایی که قادر به تشکیل تمام بافت‌های بدن می‌باشند را تولید می‌کند. این توانایی به وسیلهٔ تشکیل دوقلوهای همسان روشن شده است که به طور طبیعی هنگامی که توده‌ای از سلول‌های تشکیل دهندهٔ یک جنین ابتدایی به دو قسمت تقسیم می‌شوند رخ می‌دهد و هر کدام از آنها به یک‌حیوان واحد تبدیل می‌شوند. این بدان معنی است که سلول‌ها نمی‌توانند بیشتر از وظایف تشکیل دهندهٔ جنینی‌شان قبل از زمان تقسیم جنین، تقسیم پیدا کنند. هر سلول در مرحلهٔ هشت سلولی جنین موش، پتانسیل تبدیل‌شدن به هر قسمتی از حیوان کامل را دارد. سلول‌هایی با این توانایی به عنوان **سلول‌های بنیادی جنینی**[1] (ES) گزارش شده‌اند. همچنین که در فصل ۲۲ خواهیم آموخت، سلول‌های ES می‌توانند تحت شرایط مناسب در آزمایشگاه رشد کنند (کشت داده شوند) و به انواع متفاوتی از سلول‌های تمایز یافته تبدیل شوند.

توانایی در ساختن و دستکاری نمودن جنین‌های پستانداران در آزمایشگاه منجر به فرصت‌های جدید پزشکی و همچنین نگرانی‌های اخلاقی و اجتماعی می‌شود. برای مثال لقاح در آزمایشگاه، به تعدادی از زوج‌های نابارور و نازا امکان بچه‌دار شدن، داده است. در این تکنیک هسته‌هایی از اسپرم معیوب که به طور عادی قادر به لقاح یک تخمک نمی‌باشد استخراج می‌شود و این هسته‌ها به تخمک‌ها تزریق می‌گردد. سپس، تخمک‌های لقاح یافتهٔ حاصل در رحم مادر قرار داده می‌شوند.

در سال‌های اخیر، هسته‌های گرفته شده از سلول‌های حیوانات بالغ برای تولید حیوانات جدید به کار برده شده‌اند. در این شیوه، هسته از یک سلول سوماتیک (بدنی) (مانند سلول خون، یا پوست) از یک حیوان دهنده به درون یک تخمک لقاح نیافته فاقد هسته یک پستاندار ارائه می‌شود. در مرحله بعدی که در موش‌ها، گاوها، گوسفندان، دورگه‌ها و بعضی دیگر از حیوانات انجام شده است، تخمک حاوی هستهٔ دهنده در درون یک نامادری کاشته می‌شود. توانایی یک هسته دهنده در هدایت رشد و نمو یک حیوان کامل نشان دهندهٔ این است که تمامی اطلاعات مورد نیاز برای زندگی در هسته‌های بعضی از سلول‌های بالغ باقیمانده‌اند. از این رو تمام سلول‌ها در یک حیوان تولید شده در این مسیر، ژن‌های تک‌سلول دهندهٔ اصلی را دارا می‌باشند. بنابراین حیوان جدید یک کلون ژنتیکی از دهنده می‌باشد (شکل ۱.۸). به هر حال حیوان جدید ممکن است در نتیجه محیط و عوامل دیگر متفاوت باشد. تکرار این فرآیند می‌تواند کلون‌های متعددی را ایجاد نماید. هسته‌های گرفته شده از سلول‌های ES به طرز استثنایی خوب کار می‌کنند، در حالی که هسته‌های قسمت‌های دیگر بدن در مراحل بعدی زندگی به این خوبی کار نمی‌کنند. بیشتر جنین‌های تولید شده به وسیلهٔ این تکنیک به علت نقایص تولد، زنده نمی‌مانند، بنابراین هسته‌های دهنده ممکن است تمامی اطلاعات مورد نیاز را نداشته و یا هسته‌ها ممکن است در فرآیند کلونینگ آسیب دیده باشند. حتی آن دسته از حیواناتی که با این تکنیک، زنده متولد شده‌اند ناهنجاری‌هایی مثل پیری زودرس دارند. در مقابل «ریشه گیری»[2] از گیاهان، نوعی از کلونینگ می‌باشد که به آسانی توسط باغبان‌ها، کشاورزان و تکنسین‌های آزمایشگاهی انجام شده است.

علاقه دانشمندان به انسان بسیار محدود شده است. عملاً تمامی دانشمندان با آن مخالفت می‌نمایند زیرا خطر و ریسک آن برای

1-Rooting

2- Embryonic stem cells

▲ **شکل ۸ـ۱. پنج گوسفند یکسان که به طور ژنتیکی کلون شده‌اند.** یک جنین ابتدایی گوسفند به پنج گروه از سلول‌ها تقسیم شد و هر گروه به طور جداگانه شبیه به فرآیند طبیعی تولید دوقلو به درون رحم یک مادر گذاشته شدند. در یک مرحلهٔ ابتدایی سلول‌ها قادرند با هم یکی شده و یک حیوان کامل را تشکیل بدهند؛ در مراحل بعدی رشد، سلول‌ها به طور تصاعدی محدود شده و نمی‌توانند این عمل را به مدت طولانی‌تر انجام دهند. یک مسیر جایگزین برای کلون حیوانات، جایگزین کردن هسته‌های چندین جنین تک‌سلولی با هسته‌های دهنده از سلول‌های یک گوسفند بالغ می‌باشد. هر جنین به طور ژنتیکی با جنین بالغی که هسته از آن فراهم شده بود یکسان خواهد شد. درصدهای پایینی از جنین‌ها با این روش زنده مانده و حیوانات سالمی را به وجود می‌آورند. علاوه بر این تأثیر فراوان این تکنیک‌ها بر روی حیوانات هنوز به خوبی شناخته نشده است.

جنین بالا است (همچنین، بیشتر مردم معتقد نمی‌باشند که کمبودی جدی از دوقلوها و سه‌قلوها وجود دارد). مزیت و بهرهٔ علمی و پزشکی کلونینگ، توانایی برای تولید انواع سلول‌های ویژه با منشاء سلول‌های بنیادی بالغ یا جنینی است. با این عمل، **انتقال هسته‌ای سلول سوماتیک**[1] (SCNT)، سلول‌هایی که در محیط کشت رشد کرده و هرگز به درون یک جنین انتقال نیافته‌اند تولید می‌شود. علاقهٔ دانشمندان در ایجاد چنین سلول‌هایی اطلاع از پیام‌هایی است که نمی‌توانند پتانسیل ژن‌ها را برای تشکیل یک نوع سلول معین به هم پیوند دهند، مزیت و بهره پزشکی دیگر این سلول‌ها امکان درمان شماری از بیماری‌ها است که در آنها انواع سلول‌ها آسیب دیده و توانایی ترمیم زخم‌ها را به طور کامل از دست داده‌اند. این سلول‌ها همچنین ممکن است برای آزمایش اثرات داروها یا درمان‌های دیگر مفید باشند. هرگاه سلول‌هایی با استفاده از یک هستهٔ دهنده از یک بیمار تولید شوند، ویژگی‌های این سلول‌های تولیدشده ممکن است به آنها امکان دهد که از عدم قبول و رد که توسط سیستم ایمنی بیمار ایجاد می‌شود بگریزند و افق‌های جدیدی برای درمان‌های پیوند سلولی بگشایند.

۲ـ۱ مولکول‌های یک سلول

زیست‌شناسان سلولی - مولکولی، کشف کرده‌اند که چگونه تمامی ویژگی‌های برجسته سلول ناشی از رویدادهای مولکولی است. این رویدادها عبارتند از: تجمع مولکول‌های بزرگ، اتصال مولکول‌های بزرگ به یکدیگر، اثرات کاتالیتیکی که واکنش‌های شیمیایی ویژه‌ای را به پیش می‌برند، و رشد و توسعه اطلاعات حمل شده توسط مولکول‌های بزرگ. ما در اینجا مهم‌ترین انواع مولکول‌هایی که پایه‌های شیمیایی ساختار و عملکرد سلول را تشکیل می‌دهند مرور می‌نماییم.

مولکول‌های کوچک حامل انرژی، ناقل پیام هستند، و با ماکرومولکول‌ها در ارتباط می‌باشند

بیشتر حجم سلول یک سوپ آبکی آمیخته شده با مولکول‌های کوچک (مثلاً، قندهای ساده، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها) و یون‌ها (مثل یون‌های سدیم، کلر، یون‌های کلسیم) می‌باشد. مکان و غلظت‌های مولکول‌ها و یون‌های کوچک درون سلول به وسیلهٔ شماری از پروتئین‌های غشایی سلول کنترل می‌شود. پمپ‌ها، انتقال دهنده‌ها و کانال‌های یونی تقریباً تمام مولکول‌ها و یون‌های کوچک را به درون و بیرون سلول و اندامک‌های آن جابجا می‌کنند (فصل ۱۱).

یکی از شناخته شده‌ترین و معروف‌ترین مولکول‌های کوچک، **آدنوزین‌تری فسفات** (ATP) است که به آسانی انرژی شیمیایی قابل دسترس را در دو پیوند شیمیایی خود ذخیره می‌کند (شکل ۳۱ـ۲ را ملاحظه کنید). هنگامی که سلول قسمتی از این پیوندهای غنی از انرژی ATP را می‌شکنند، انرژی آزاد شده می‌تواند یک فرآیند محتاج به انرژی مانند انقباض عضله یا بیوسنتز پروتئین را تأمین کند. برای به دست آوردن انرژی ساخت ATP، سلول‌ها، مولکول‌های غذایی را تجزیه می‌کنند. برای مثال، وقتی که قند به دی اکسید کربن و آب تجزیه می‌شود انرژی ذخیره شده در پیوندهای اصلی شیمیایی آن آزاد می‌شود و بیشتر این انرژی در ATP به دام می‌افتد (فصل ۱۲). سلول‌های باکتریایی، گیاهی و جانوری همگی می‌توانند به وسیلهٔ این فرآیند ATP بسازند. علاوه بر این گیاهان و

1-Somatic cell nuclear transfer

تعداد کمی از موجودات دیگر می‌توانند انرژی نور خورشید را برای تشکیل ATP در فرایند **فتوسنتز** به دام بیندازند.

مولکول‌های کوچک دیگر به عنوان حامل پیام هم در درون و هم در بین سلول‌ها عمل می‌نمایند مانند پیام‌هایی که فعالیت‌های سلولی بیشماری را هدایت می‌نمایند (فصول ۱۵ و ۱۶). عکس‌العمل بدن نسبت به یک حادثه ترسناک ناشی از تولید اپی‌نفرین است. اپی‌نفرین مولکول **هورمونی** کوچکی است که پاسخ جنگ و گریز را به جریان در می‌آورد. اقدامات مورد نیاز برای جنگ یا گریز توسط ضربان‌های عصبی که با کمک **نوروترانسمیترها** و انواع پیام‌های مولکولی کوچک از مغز به عضلات جریان می‌یابند به پیش برده می‌شوند که در فصل ۲۳ در مورد آنها بحث خواهیم کرد.

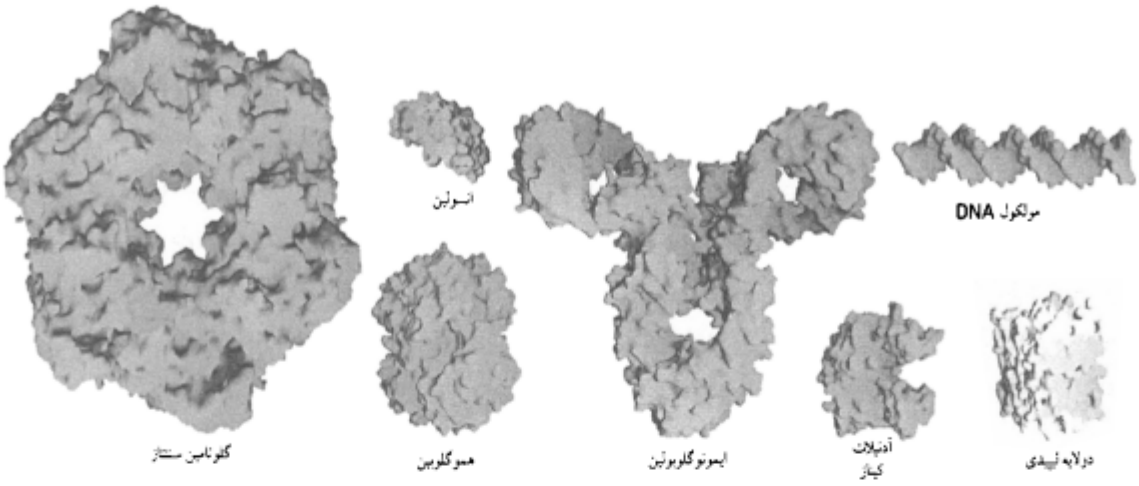
بعضی از مولکول‌های کوچک (**مونومرها**) در سوپ سلولی می‌توانند به هم متصل شده و پلیمرها را بوجود آورند. (شکل ۱-۲ را ملاحظه کنید). سلول‌ها سه نوع پلی‌مر بزرگ شامل : پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را تولید می‌نمایند که به طور عمومی **ماکرو مولکول** نامیده می‌شوند. برای مثال قندهای ساده (مونوساکاریدها)، مونومر به کار رفته برای تشکیل پلی ساکاریدها می‌باشند. این ماکرومولکول‌ها اجزای ساختاری مهمی برای دیوارهٔ سلول‌های گیاهی و اسکلت حشرات می‌باشند. یک پلی ساکارید معمولاً یک زنجیرهٔ خطی یا شاخه‌دار از تکرار واحدهای قندی یکسان می‌باشد. از اینرو تعداد واحدها یک زنجیره اطلاعاتی را حمل می‌کند. با این حال، هرگاه واحدها یکسان نباشند ترتیب و نوع واحدها اطلاعات اضافی را حمل می‌نمایند. همانطور که در فصل ۶ خواهیم دید، بعضی پلی ساکاریدها پیچیدگی اطلاعاتی بیشتری را به همراه رمز خطی ساخته شده از واحدهای مختلف یک توالی ویژه را نشان می‌دهند. این ویژگی، شاخص‌ترین ویژگی دو نوع دیگر از ماکرومولکول‌های زیستی یعنی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد.

پروتئین‌ها نقش ساختاری در سلول دارند و بیشترین وظایف سلولی را انجام می‌دهند

ساختارهای مختلف و پیچیده، پروتئین‌ها را قادر می‌سازد که عملکردهای متعددی را انجام دهند. سلول‌ها ۲۰ اسید آمینه مختلف را در زنجیرهٔ خطی برای تشکیل یک پروتئین به همدیگر متصل می‌کنند (شکل ۱۴-۲ را ملاحظه کنید). معمولاً دامنهٔ طول پروتئین‌ها از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ اسید آمینه می‌باشد، اما بعضی پروتئین‌ها خیلی کوتاه‌تر و بقیه خیلی بلندتر هم می‌باشند. ما اسیدهای آمینه را توسط سنتز آنها از مولکول‌های دیگر و یا توسط تجزیه پروتئینی به دست می‌آوریم. از دیدگاه رژیم غذایی، اسیدهای آمینهٔ «ضروری» شامل هشت اسید آمینه‌ای هستند که بدن توانایی ساختشان را ندارد و باید آنها را از طریق غذا بدست آوریم. لوبیا و ذرت با همدیگر این هشت اسید آمینه را دارند. وقتی که یک زنجیر اسید آمینه‌ای تشکیل می‌شود، به یک شکل پیچیده تا خورده و یک ساختار سه بعدی مشخصی را به خود می‌گیرد و با عملکرد خود متناسب می‌شود (شکل ۹-۱). بعضی از پروتئین‌ها شبیه به یکدیگر می‌باشند و بنابراین می‌توانند اعضای یک **خانوادهٔ پروتئینی** در نظر گرفته شوند. چند صدتایی از خانواده‌های پروتئینی شناخته شده‌اند. بیشتر پروتئین‌ها برای عملکرد در مکان‌های ویژه درون یک سلول طراحی می‌شوند و یا به درون محیط خارج سلولی رها می‌شوند (extra، «بیرون»). مسیرهای پرکار سلولی تضمین می‌کنند که پروتئین‌ها به موقعیت‌های درون سلولی (intra، «درون») مناسب انتقال یافته و یا ترشح شوند (فصول ۱۳ و ۱۴).

پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان اجزای ساختاری یک سلول بکار گرفته شوند. برای مثال می‌توانند یک اسکلت درونی تشکیل دهند (فصول ۱۰، ۱۷ و ۱۸). آنها می‌توانند حسگرهای درجه حرارت، غلظت یون‌ها، یا دیگر ویژگی‌های سلول‌ها باشند. همچنین می‌توانند مواد را به درون و بیرون غشای پلاسمایی انتقال دهند (فصل ۱۱). پروتئین‌ها می‌توانند نقش **آنزیمی** داشته باشند که باعث می‌شوند واکنش‌های شیمیایی بسیار سریع‌تر از آن‌هایی که بدون کمک این کاتالیست‌های پروتئینی روی می‌دهند پیش بروند (فصل ۳). پروتئین‌ها می‌توانند به یک ژن ویژه متصل شده، آن را به حالت روشن یا خاموش در آورند (فصل ۷). آنها می‌توانند پیام‌های خارج سلولی باشند که از یک سلول برای ارتباط با سلول‌های دیگر رها شده‌اند، یا پیام‌های درون سلولی، که اطلاعات را درون سلول حمل می‌کنند (فصول ۱۵ و ۱۶). پروتئین‌ها می‌توانند موتورهایی باشند که پیرامون مولکول‌های دیگر به حرکت در آمده و انرژی شیمیایی (ATP) را برای انجام کارهای دیگر بسوزانند (فصول ۱۷ و ۱۸).

چگونه ۲۰ اسید آمینه می‌توانند تمام پروتئین‌های مختلف موردنیاز برای انجام این وظایف مختلف را تشکیل دهند؟ این امر در نگاه اول غیرممکن به نظر می‌رسد. اما اگر یک پروتئین شاخص طولی در حدود ۴۰۰ اسید آمینه داشته باشد، امکان $۲۰^{۴۰۰}$ توالی مختلف پروتئینی وجود دارد. حتی به فرض این‌که تعدادی از اینها به طور عملکردی یکسان، ناپایدار، یا از جهات دیگر محدودیت داشته باشند ولی، شمار نامحدودی از پروتئین‌ها ممکن است خوب باشند. پس ممکن است سئوال شود که چگونه تعدادی از



▲ **شکل ۹ـ۱ پروتئین‌ها در اندازه، شکل، و عملکرد بسیار متفاوتند.** این مدل‌های سطحی در دسترس آب، بیان کننده بعضی پروتئین‌های ترسیم شده در یک مقیاس عمومی با چندین منظره آشکار و شکاف کوچک روی سطح می‌باشند. هر پروتئین یک شکل سه بعدی شناخته شده (کنفورماسیون) دارد که توسط چندین میانکنش شیمیایی بحث شده در فصول ۲ و ۳ پایدار شده است. پروتئین‌های نشان داده شده شامل آنزیم‌ها (گلوتامین سنتتاز و آدنیلات کیناز)، یک آنتی‌بادی (ایمونوگلوبولین)، یک هورمون (انسولین) و حامل اکسیژن خون (هموگلوبین) می‌باشند. مدل‌های یک قطعه از اسید نوکلئیک DNA و یک ناحیهٔ کوچک از دو لایه لیپیدی که غشای سلولی را تشکیل می‌دهند (قسمت ۳ـ۱ را ملاحظه کنید) ارتباط عمیق این ساختارها را در مقایسه با پروتئین‌های شاخص نشان می‌دهد.

مولکول‌های پروتئینی یک سلول، خودشان را نگهداری و اداره می‌کنند. برای پاسخ به این سؤال اجازه بدهید که یک سلول شاخص یوکاریوتی مانند یک هپاتوسیت (سلول کبدی) را در نظر بگیریم، این سلول تقریباً مکعبی، با ۱۵μm (۰/۰۰۱۵cm) طول هر وجه، حجمی معادل $۳/۴\times۱۰^{-۹}cm^{۳}$ (یا میلی‌لیتر) دارد. به فرض این که چگالی یک سلول ۱/۰۳g/ml باشد، وزن سلول $۳/۵\times۱۰^{-۹}gr$ خواهد بود. از آنجایی که پروتئین‌ها تقریباً ۲۰ درصد وزن یک سلول را تشکیل می‌دهند بنابراین وزن کل پروتئین‌های سلولی $۷\times۱۰^{-۱۰}gr$ می‌باشد. میانگین وزن مولکولی یک پروتئین مخمر در حدود ۵۲۷۰۰(gr/mol) می‌باشد. با فرض اینکه، این شاخص پروتئین‌های یوکاریوتی باشد، ما می‌توانیم شمار کل مولکول‌های پروتئینی هر سلول کبدی را با استفاده از وزن کل پروتئین‌ها و عدد آووگادرو، تعداد مولکول‌های یک ترکیب شیمیایی در هر مول ($۶/۵۲\times۱۰^{۲۳}$)، محاسبه نمائیم که برابر با $۷/۹\times۱۰^{۹}$ خواهد بود. برای انجام این محاسبه، یک مرحله بیشتر لازم است. زیرا یک سلول کبدی در حدود ۱۰۰۰۰ پروتئین مختلف دارد؛ بنابراین یک سلول به طور میانگین نزدیک به یک میلیون مولکول از هر نوع پروتئین دارد. در حقیقت فراوانی پروتئین‌های مختلف از پروتئین ساختاری کمیاب نظیر گیرندهٔ انسولین (۲۰۰۰۰ مولکول) تا پروتئین ساختاری فراوان اکتین (۵×۱۰^{۸}) به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت می‌باشند.

اسیدهای نوکلئیک رمزهای اطلاعاتی برای ساخت پروتئین‌ها در زمان و مکان صحیح را به همراه دارند

اطلاعات مربوط در مورد چگونگی، زمان و مکان تولید یک نوع پروتئین در مادهٔ ژنتیکی (پلی‌مری که **دئوکسی ریبونوکلئیک اسید** (DNA) نامیده می‌شود) حمل شده است. ساختار سه بعدی DNA شامل دو رشتهٔ مارپیچ بلند که حول یک محور فرضی پیچیده‌اند می‌باشد که یک مارپیچ دوگانه را تشکیل می‌دهد. رشته‌های DNA از مونومرهایی که نوکلئوتید نامیده می‌شوند تشکیل شده‌اند؛ نوکلئوتیدها اغلب با نام بازها معرفی می‌شوند زیرا در ساختارشان بازهای آلی حلقوی دارند (فصل ۴).

چهار نوکلئوتید مختلف، A، T، C و G انتها به انتها در یک رشتهٔ DNA به هم متصل شده‌اند، طوری که بخش‌های بازی در درون این مارپیچ قرار گرفته‌اند. هر مارپیچ دوگانه DNA یک ساختمان ساده دارد: هر کجا که یک رشته یک A دارد، رشتهٔ دیگر یک T دارد و هر C با یک G جفت شده است (شکل ۱۰ـ۱). این جفت **مکملی** از دو رشته آنقدر قوی و محکم است که اگر رشته‌های مکمل از هم جدا شوند، آنها به طور خودبخودی در شرایط صحیح

دمائی و نمک به یکدیگر متصل خواهند شد. از اینرو هیبریداسیون اسید نوکلئیک برای تعیین یک رشته مورد نظر بی‌نهایت مفید می‌باشد. برای مثال، اگر یک رشته تخلیص شده و به تکه‌ای از یک کاغذ متصل شود و کاغذ در یک محلولی که حاوی رشتهٔ مکمل دیگر است قرار داده شود، دو رشته با هم جفت خواهند شد حتی اگر محلول حاوی رشته‌های دیگر باشد که جفت نمی‌شوند.

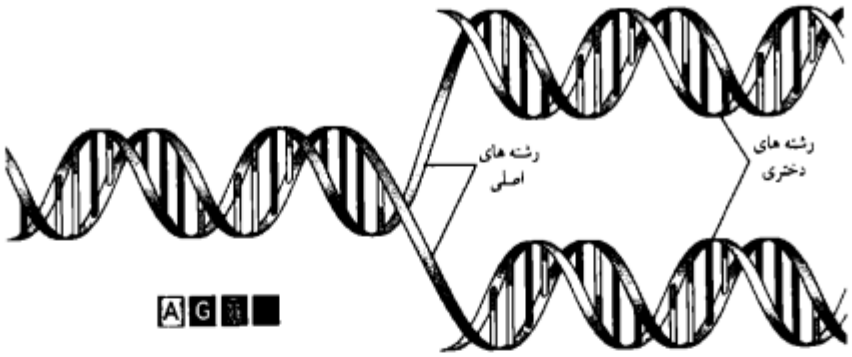
اطلاعات ژنتیکی حمل شده توسط DNA در توالی و ترتیب خطی نوکلئوتیدها در طول یک رشته قرار گرفته است. اطلاعات DNA به واحدهای عملکردی مجزایی بنام **ژن‌ها** تقسیم شده است، که به طور شاخص حدود ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ نوکلئوتید طول دارند. بیشتر باکتری‌ها چندین هزار ژن دارند؛ انسان‌ها در حدود ۲۰۰۰۰ تا ۲۵۰۰۰ ژن دارند. ژن‌هایی که دستورات ساخت پروتئین‌ها را حمل می‌کنند به طور عمومی شامل دو قسمت هستند: یک ناحیهٔ رمزدهی‌کننده که توالی اسیدهای آمینه یک پروتئین را تعیین می‌نماید و یک ناحیهٔ تنظیمی که کنترل کنندهٔ زمان و مکان سنتز پروتئین است.

سلول‌ها از دو فرآیند برای انتقال اطلاعات DNA به پروتئین استفاده می‌کنند (شکل ۱۱ـ۱). در فرآیند ابتدایی که **رونویسی** نام دارد، ناحیه رمزدهی‌کننده یک ژن است که به یک اسید **ریبونوکلئیک** (RNA) تک‌رشته‌ای رونویسی می‌شود. آنزیم بزرگی بنام RNA **پلی مراز**، اتصال نوکلئوتیدها را در یک زنجیرهٔ RNA با استفاده از DNA به عنوان الگو کاتالیز می‌نماید. در سلول‌های یوکاریوتی، محصول RNA ابتدایی به یک RNA **پیامبر کوچک‌تر** (mRNA) پردازش می‌شود، که به سیتوپلاسم انتقال می‌یابد. **ریبوزوم** که ماشین مولکولی بزرگ متشکل از RNA و پروتئین می‌باشد فرآیند دوم را که **ترجمه** نامیده می‌شود انجام می‌دهد. در طول ترجمه، تجمعات ریبوزومی و ارتباطات دقیق اسیدهای آمینه با یکدیگر به وسیلهٔ توالی mRNA که آن هم براساس رمز ژنتیکی جهانی دیکته شده است صورت می‌گیرد. ما اجزای سلول را که رونویسی و ترجمه انجام می‌دهند به طور مفصل با جزئیات بیشتر در فصل ۴ بررسی می‌نمائیم.

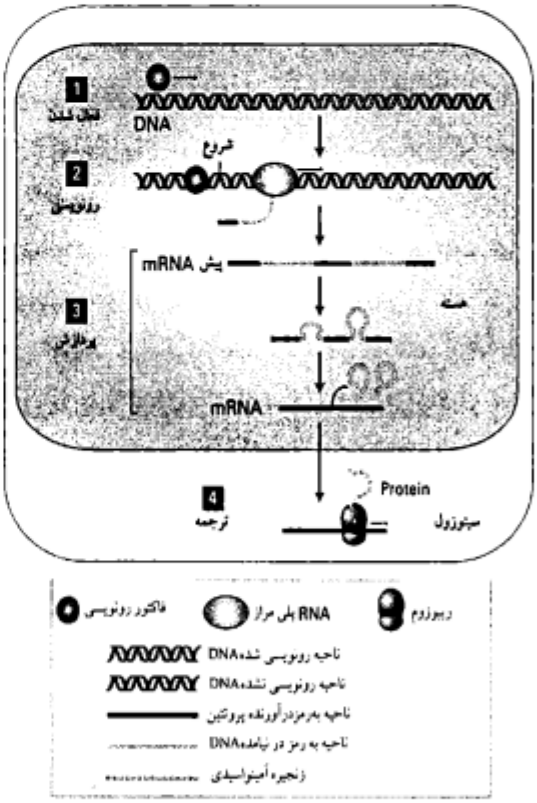
علاوه بر نقش RNA در انتقال اطلاعات از هسته به سیتوپلاسم، آن می‌تواند چارچوبی را برای ساخت یک ماشین مولکولی بکار برد. برای مثال، ریبوزوم چهار زنجیرهٔ RNA دارد که با بیش از ۵۰ پروتئین برای ساخت یک مترجم اطلاعات ژنتیکی mRNA و سنتزکنندهٔ دقیق و کارای پروتئین مشارکت می‌نماید. RNA همچنین یک نقش مهم قابل ملاحظه‌ای در تنظیم جنبه‌های متعدد فعالیت ژن، شامل ساختار کروموزوم و پایداری و پردازش RNA داشته است. در چندین مورد RNAهای کوچک (به طور ۲۰۰ـ۲۰ نوکلئوتید) به طور ویژه ساختار و عملکرد کروموزوم‌ها، پایداری مولکول‌های بلندتر RNA و ترجمه مولکول‌های mRNA را به پروتئین تنظیم می‌نمایند.

تمامی موجودات راه‌هایی را برای کنترل زمان و مکان رونویسی ژن‌ها دارا می‌باشند. برای مثال، تقریباً تمام سلول‌های بدنمان شامل مجموعه‌ای کامل از ژن‌های انسان می‌باشند، اما در هر نوع سلول فقط بعضی از این ژن‌ها، فعال یا روشن بوده، و در ساخت پروتئین بکار می‌روند. این پدیده دلیل این موضوع است که چرا سلول‌های کبدی بعضی از پروتئین‌هایی را تولید می‌نمایند که سلول‌های کلیه تولید نمی‌نمایند و بالعکس. با این حال، تعدادی از سلول‌ها می‌توانند به وسیلهٔ روشن یا خاموش نمودن ژن‌های ویژه به پیام‌های خارجی یا تغییرات شرایط خارجی پاسخ دهند و به موجب آن گنجینه پروتئینی‌شان با نیازهای رایج تطابق پیدا می‌کند. از این رو کنترل فعالیت ژنی بستگی به اتصال فاکتورهای رونویسی به DNA دارد که به نواحی خاصی از DNA اتصال یافته و به عنوان مبدل‌هایی، رونویسی ژن‌های ویژه را فعال کرده و یا مهار می‌کنند (فصل ۷).

فاکتورهای رونویسی آنقدر با دقت طراحی شده‌اند که قادر می‌باشند به ترتیب تقدم به نواحی تنظیمی فقط چندین ژن از هزاران ژن موجود در DNA سلول متصل شوند. به طور نمونه یک پروتئین متصل‌شونده به DNA توالی‌های کوتاه DNAای را که در حدود ۱۲ـ۶ جفت باز طول دارد تشخیص می‌دهد. یک قطعه از DNA حاوی ۱۰ جفت باز با توجه به اینکه هر موقعیت می‌تواند هر چهار نوکلئوتید را داشته باشد می‌تواند 4^{10} توالی ممکن (۱۰۴۸۵۷۶) داشته باشد. پس فقط چند کپی و رونوشت از هر توالی در DNA سلول تأمین کنندهٔ مهار و فعالیت ژن خواهد شد. چندین رونوشت از یک نوع فاکتور رونویسی به طور هماهنگ می‌توانند مجموعه‌ای از ژن‌ها را به طور هماهنگ تنظیم نمایند البته اگر مکان اتصال برای آن فاکتور رونویسی در مجموعه ژنی وجود داشته باشد. فاکتورهای رونویسی اغلب به صورت کمپلکس‌های چند پروتئینی کار می‌کنند که حداقل بیش از یک پروتئین در ویژگی و انتخاب ژن‌های تنظیم شده مشارکت می‌کند. در موجودات پیچیده، صدها فاکتور رونویسی مختلف برای تشکیل یک سیستم کنترل بسیار مناسب که ژن‌های صحیح را در سلول‌های صحیح در زمان‌های مناسب فعال می‌کنند به کار گرفته شده‌اند. مولکول‌های RNAای کوچک می‌توانند با تنظیم



▲ **شکل ۱۰ـ۱ DNA شامل دو رشتهٔ مکمل می‌باشد که برای تشکیل یک مارپیچ دوگانه به دور هم پیچیده‌اند.** (چپ) مارپیچ دوگانه به وسیلهٔ پیوندهای ضعیف هیدروژنی بین بازهای A و T و C و G پایدار شده است. (راست) در طول رونویسی، دو رشته آزاد هستند و به عنوان الگوهایی برای تولید رشته‌های مکمل به کار می‌روند. نتیجه، تولید دو رونوشت از مارپیچ دوگانهٔ اصلی می‌باشد که هر کدام حاوی یکی از رشته‌های اولیه (اصلی) و یک رشته دختر (مکمل) جدید می‌باشد.



▶ **شکل ۱۱ـ۱ اطلاعات رمز شده در DNA توسط یک فرآیند چندمرحله‌ای به توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین‌ها تبدیل شده است.** مرحلهٔ ❶: فاکتورهای رونویسی به نواحی تنظیمی ژن‌های ویژه متصل می‌شوند و آن‌ها را کنترل و فعال می‌کنند. مرحله ❷: به دنبال تجمع کمپلکس شروع چند پروتئینی و اتصال این کمپلکس به DNA؛ RNA پلیمراز رونویسی از یک ژن فعال شده را در یک مکان ویژه، در جایگاه شروع، آغاز می‌نماید. پلیمراز در طول DNA حرکت کرده و با استفاده از یکی رشته‌های DNA به عنوان الگو، نوکلئوتیدها را به هم متصل کرده و یک پیش mRNA تک‌رشته‌ای تولید می‌کند. مرحلهٔ ❸: رونوشت برای برداشت توالی‌های غیر کدکننده پردازش می‌شود. مرحلهٔ ❹: در یک سلول یوکاریوتی، RNA پیک بالغ (mRNA) به سیتوپلاسم حرکت می‌کند، سپس به ریبوزوم‌هایی اتصال می‌یابد که توالی آن را خوانده و یک پروتئین را توسط اتصال شیمیایی اسیدهای آمینه به یک زنجیرهٔ خطی تشکیل می‌دهند.

تولید محصول و پایداری رونوشت‌های ژن اثراتی بر بیان ژن داشته باشند. در بعضی موارد RNAهای کوچک ممکن است با مکانیسم‌هایی، بیشتر یا تمام ژن‌ها را تنظیم کنند که البته این مکانیسم‌ها هنوز کشف نشده است.

ژنوم درون کروموزوم‌ها بسته‌بندی شده است و در طول تقسیم سلول همانندسازی می‌شود.

بیشتر DNA سلول‌های یوکاریوتی در هسته قرار گرفته و به طور گسترده‌ای در ساختارهای مشخص به نام **کروموزوم** (فصل ۶) تا خورده‌اند. هر کروموزوم شامل یک مولکول DNA خطی واحد همراه با پروتئین‌های مشخص می‌باشد. در سلول‌های پروکاریوتی، بیشتر یا تمام اطلاعات ژنتیکی در یک مولکول DNA

حلقوی واحد که حدود یک میلیمتر طول دارد قرار گرفته‌اند؛ این مولکول در ناحیهٔ مرکزی سلول که چندین بار به روی خودش تا می‌خورد، قرار می‌گیرد (شکل ۱ـ۲a را ملاحظه نمایید). **ژنوم** یک موجود، کل DNA آن موجود را در برمی‌گیرد. به استثنای تخمک و اسپرم، هر سلول انسان طبیعی ۴۶ کروموزوم دارد (شکل ۱ـ۱۲). نیمی از آنها از مادر؛ و نیمی دیگر از پدر به ارث می‌رسند.

هر وقت یک سلول تقسیم می‌شود، یک ماشین همانندسازی چندپروتئینی بزرگ بنام رپلیزوم، دورشته DNA مارپیچی را در کروموزوم‌ها از هم جدا می‌کند و هر رشته را به عنوان الگو برای تجمع نوکلئوتیدها به یک رشته مکمل به کار می‌برد (شکل ۱ـ۱۰ را ملاحظه نمائید). نتیجه ایجاد یک جفت مارپیچ دوگانه می‌باشد که هر کدام شبیه DNA اولیه هستند. DNA پلیمراز مسئول اتصال نوکلئوتیدها به یک رشته DNA می‌باشد؛ اجزای دیگر رپلیزوم در فصل ۴ توصیف شده‌اند. طراحی مولکولی DNA و ویژگی‌های قابل ملاحظهٔ رپلیزوم رونوشت سریع و بسیار صحیح را تأمین می‌نمایند. تعدادی از مولکول‌های DNA پلیمراز به طور هماهنگ کار کرده و هر کدام قسمتی از یک کروموزم را کپی می‌کنند. ژنوم کامل مگس میوه که در حدود $1/2\times10^8$ نوکلئوتید طول دارد می‌تواند در عرض سه دقیقه همانندسازی شود! به علت صحت همانندسازی، تقریباً تمامی سلول‌ها در بدن ما دستورات ژنتیکی یکسانی را حمل کرده، و ما می‌توانیم موهای قهوه‌ای مادر و چشم‌های آبی پدر را به ارث ببریم.

یک مثال تقریباً برجسته از کنترل ژن شامل غیرفعال شدن یک کروموزوم کامل در جنس ماده انسان می‌باشد. زنان دو کروموزوم X دارند، در حالی که مردان یک کروموزوم X و یک کروموزوم Y دارند که ژن‌های متفاوتی نسبت به کروموزوم X دارد. در عین حال ژن‌های موجود بر روی کروموزوم X باید، به طور برابر در سلول‌های ماده (XX) و سلول‌های نر (XY) فعال شوند. برای کسب این تعادل، یک نسخه از کروموزوم X در سلول ماده به طور شیمیایی تغییر یافته و به یک تودهٔ خیلی کوچک که جسم بار[1] نامیده می‌شود متراکم شده است. جسم بار غیرفعال است و هرگز رونویسی نمی‌شود.

به طور تعجب برانگیزی، ما مقداری از مواد ژنتیکی را منحصراً از مادرمان به ارث می‌بریم. این مواد ژنتیکی مربوط به DNA حلقوی موجود در میتوکندری‌ها می‌باشد. میتوکندریها اندامک‌هایی در سلول‌های یوکاریوتی هستند که ATP را بوسیلهٔ انرژی آزاد شده از شکست مواد غذایی سنتز می‌کنند. میتوکندری‌ها شامل چندین رونوشت از ژنوم‌های DNA خودشان می‌باشند که بعضی از پروتئین‌های میتوکندریایی را رمزدهی می‌کنند (فصل ۶). چون هر انسان فقط DNA میتوکندریایی را از مادرش به ارث می‌برد (میتوکندری از تخمک حاصل می‌شود نه از اسپرم)، اشکال مجزای یک DNA میتوکندریایی ویژه می‌تواند برای ردیابی اجداد مادری بکار گرفته شود. کلروپلاست‌ها، اندامک‌هایی که فتوسنتز را در گیاهان انجام می‌دهند، نیز ژنوم‌های حلقوی دارند. حدس بر این است که هم کلروپلاست‌ها و هم میتوکندری‌ها از همزیست درونی مشتق شده‌اند، به این صورت که باکتری‌ها درون سلول‌های یوکاریوتی وارد شده و به طور همزیستی در آنها زندگی کرده و در نهایت میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها را بوجود آورده‌اند.

به نظر می‌آید DNAهای حلقوی کلروپلاستی و میتوکندریایی از ژنوم‌های باکتریایی سرچشمه گرفته باشند، که آنها نیز معمولاً حلقوی هستند. با این حال ژنوم این دو اندامک، ژن‌های باکتریایی کمی را دارا می‌باشند.

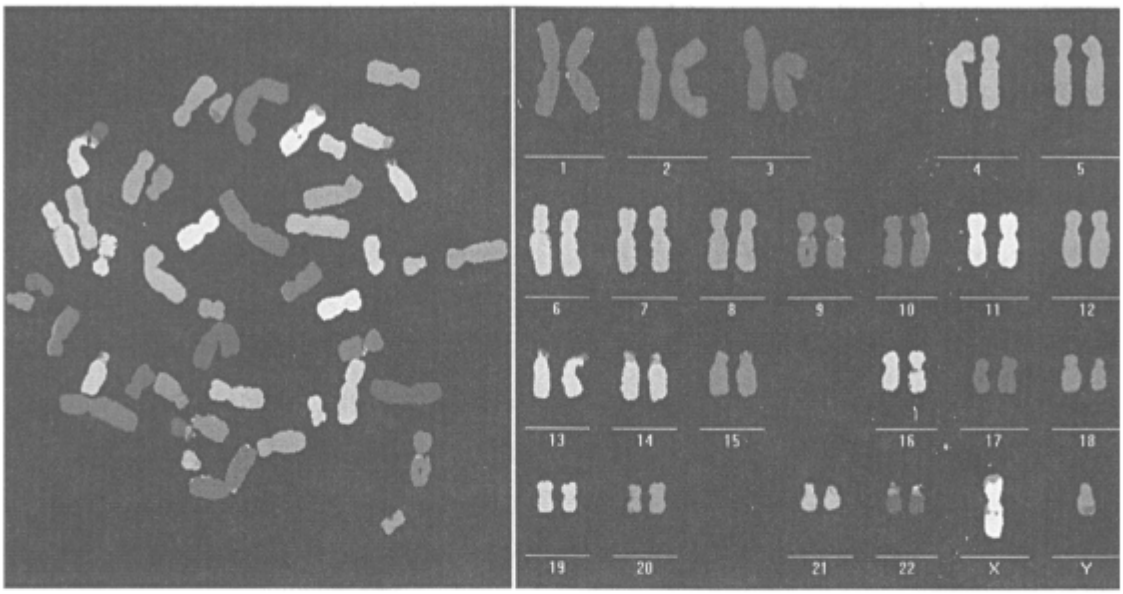
جهش‌ها ممکن است خوب، بد، یا خنثی باشند

احیاناً اشتباهات به طور خودبخودی در طول همانندسازی DNA روی می‌دهد و باعث تغییراتی در توالی نوکلئوتیدها می‌شود. تغییرات یا **جهش‌ها** همچنین می‌توانند از اشعه‌ای که باعث آسیب به زنجیرهٔ نوکلئوتید می‌شوند یا از سموم شیمیایی، مثل سموم موجود در دود سیگار که منجر به ایجاد خطاهایی در طول فرآیند همانندسازی DNA می‌گردد حاصل شوند (فصل ۲۵). جهش‌ها در اشکال مختلف وجود دارند: جایگزینی ساده یک نوکلئوتید با دیگری؛ حذف، دخول یا معکوس شدن یکی از میلیون‌ها نوکلئوتید در DNA یک کروموزوم؛ و جابه‌جاشدگی یک فاصله از DNA از یک کروموزوم به دیگری.

در تولیدمثل جنسی حیوانات مانند انسان، جهش‌های موجود در سلول‌هایی که به طور بالقوه در تولیدنسل مشارکت می‌نمایند، مثل سلول‌های **ردهٔ جنسی (زایا)** شامل تخمک، اسپرم، و سلول‌های پیش‌ساز آنها به ارث می‌رسند . سلول‌هایی از بدن که در زاد و ولد مشارکت نمی‌نمایند **سلول‌های سوماتیک** نامیده می‌شوند. جهش‌هایی که در این سلول‌ها رخ می‌دهند هرگز به ارث نمی‌رسند، اگرچه این جهش‌ها ممکن است در پیدایش سرطان مشارکت نمایند. گیاهان یک تقسیم جدا بین سلول‌های ردهٔ زایا و سوماتیک دارند، از اینرو تعدادی از سلول‌های گیاهی در هر دو ظرفیت می‌توانند عمل کنند.

ژن‌های جهش‌یافته که پروتئین‌های تغییر یافته را رمزدهی

1-Barr body



▲ **شکل ۱۲ـ۱ (شکل رنگی) کروموزم‌ها می‌توانند برای تشخیص آسان رنگ‌آمیزی شوند.** یک انسان طبیعی از لحاظ موفولوژیکی ۲۳ جفت کروموزم جداگانه دارد؛ یک تعداد از هر جفت از مادر و تعدادی دیگر از پدر به ارث می‌رسند. (چپ) یک گسترهٔ کروموزومی از یک سلول بدن در نیمهٔ تقسیم میتوز، که کروموزوم‌ها کاملاً متراکم شده‌اند. این آماده‌سازی با عوامل رنگ‌آمیزی متصل شده به رنگ فلورسنت حاصل شده است که اجازه می‌دهد هر ۲۲ جفت کروموزم و کروموزوم‌های X و Y در رنگ‌های متفاوت به هنگام مشاهده با یک میکروسکوپ فلورسنت ظاهر شوند. این تکنیک فلورسنت مرکب دورگه‌سازی (هیبریدیزاسیون) درجا[1] (M-FISH) بعضی اوقات رنگ‌آمیزی کروموزومی نامیده می‌شود (فصل ۶). (راست) کروموزوم‌های موجود در سمت چپ به صورت جفت و براساس اندازه مرتب شده‌اند، این آرایش، کاریوتیپ نامیده می‌شود. در شکل بالا وجود کروموزوم‌های X و Y جنسیت فرد را به عنوان نر مشخص کرده است.

می‌کنند یا آن دسته از ژن‌هایی که نمی‌توانند به طور صحیح کنترل شوند باعث ایجاد شماری از بیماری‌های ارثی می‌شوند. برای مثال، کم خونی سلول داسی شکل، حاصل یک جایگزینی نوکلئوتیدی در ژن هموگلوبین است، هموگلوبین پروتئینی است که اکسیژن را در سلول‌های قرمز خون حمل می‌کند. تغییر یک اسیدآمینه توسط جهش ایجاد شده در سلول داسی شکل، توانایی سلول‌های قرمز خون برای حمل اکسیژن از شش‌ها به بافت‌ها را کاهش می‌دهد. پیشرفت‌های اخیر در تعیین جهش‌های ایجادکنندهٔ بیماری‌ها و در فهم این‌که چگونه آنها بر روی عملکردهای سلول تأثیر می‌گذارند احتمالات جالبی را برای کاهش اغلب اثرات از بین برندهٔ آنها ارائه می‌نماید. توالی ژنوم انسان نشان می‌دهد که یک نسبت خیلی بزرگ از DNA به RNA رونویسی نشده و یا هیچ عملکرد تنظیمی آشکاری ندارد. جهش در این نواحی معمولاً هیچ تأثیر خوب یا بدی را ایجاد نمی‌کنند. با این حال، جهش‌های خنثی در DNA غیرعملکردی ممکن است یک نقش اصلی در تکامل داشته باشد که منجر به خلق ژن‌های جدید یا توالی‌های تنظیمی جدید برای کنترل ژن‌های موجود می‌گردد. برای مثال، نظر به این که جایگاه‌های اتصال برای فاکتورهای رونویسی شاخص فقط ۱۲ـ۱۰ نوکلئوتید طول دارند، تعداد کمی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی ممکن است یک قطعه غیرعملکردی DNA را به یک جایگاه تنظیمی اتصال پروتئین تبدیل کنند.

بسیاری از DNAهای غیرضروری هم در یوکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها از توالی‌های بسیار تکرار شونده‌ای که می‌توانند از یک مکان در ژنوم به جای دیگر حرکت نمایند تشکیل شده‌اند. این **عناصر متحرک** DNA می‌توانند روی ژن‌ها پرش (جابجاشدگی) کنند و باعث آسیب به ژن شوند اما بعضی اوقات آن را فعال می‌کنند. عموماً

1-Multiplex fluorescence in situ hynbidization

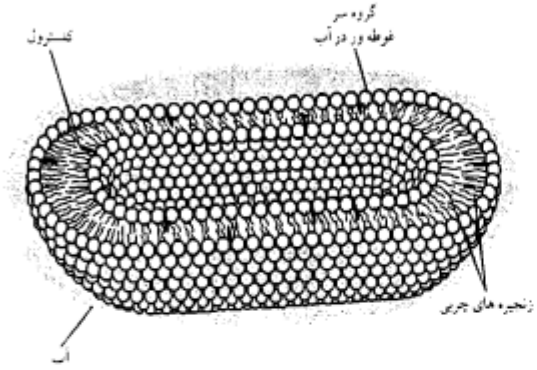
پرش به علت به مخاطره انداختن موجود میزبان روی می‌دهد. عناصر متحرک که اولین بار در گیاهان کشف شدند، مسئول گوناگونی رنگ برگ‌ها و تنوع طرح‌های رنگی زیبا در ریشه‌های ذرت هندی می‌باشند. عناصر متحرک با پرش به درون و بیرون از ژن‌هایی که تجمع رنگدانه را به هنگام رشد و نمو کنترل می‌کنند، باعث الگوهای رنگی ماهرانه می‌شوند. بعداً عناصر متحرک در باکتری‌ها هم یافت شدند، که متأسفانه، ژن‌های لازم برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک را پراکنده می‌کنند.

عناصر متحرک، به آرامی در ژنوم در روند تکامل متراکم‌شده و یک ویژگی جهانی ژنوم موجودات امروزی را بوجود آورده‌اند. آنها به طور شگفت‌انگیزی، ۴۵ درصد ژنوم انسان را شامل می‌شوند. بعضی از عناصر متحرک DNA انسان‌ها کپی‌هایی (اغلب جهش‌یافته و آسیب‌رسان) از ژنوم‌های ویروس‌هایی هستند که قسمتی از چرخه زندگی‌شان را به صورت قطعه‌ای از DNA درج شده در DNA سلول میزبان می‌گذرانند. بنابراین ما در کروموزوم‌های خود ریشه‌های ژنتیکی بیماری‌های عفونی نیاکانمان را حمل می‌کنیم.

عناصر متحرک DNA که روزگاری فقط به عنوان انگل‌های مولکولی تلقی می‌شدند حال در تکامل موجودات عالی‌تر به طور قابل ملاحظه‌ای اهمیت پیدا کرده‌اند (فصل ۶).

۱-۳ اعمال سلول‌ها

در اصل هر سلول به سادگی یک قسمت با یک جزء درونی آبکی می‌باشد که توسط یک غشای سطحی (غشای پلاسمایی) از محیط خارجی جدا شده است. این غشای سطحی از جریان آزاد مولکول‌ها به درون و بیرون ممانعت به عمل می‌آورد. علاوه بر این همانطور که ذکر شد سلول‌های یوکاریوتی غشاهای درونی وسیعی دارند که در قسمت‌های مختلف اندامک‌ها تقسیم می‌شوند. هر قسمت ویژگی‌ها و محتویاتی مانند پروتئین‌های اختصاصی یا یک pH معین دارد که برای کار آن تناسب یافته است. غشاء پلاسمایی و دیگر غشاهای سلولی به طور اولیه از دو لایهٔ مولکول **فسفولیپیدی** تشکیل شده‌اند. این مولکول‌های دو قسمتی یک انتهای آبدوست **(هیدروفیل)** و یک انتهای آب گریز **(هیدروفوب)** دارند. انتهاهای آبدوست دو لایه فسفولیپیدی یک غشاء به طرف سطوح بیرونی جهت‌گیری می‌کند و انتهاهای آبگریز در قسمت درونی محصور شده و به دام افتاده‌اند (شکل ۳-۱). مقادیر کمی از لیپیدهای دیگر مانند کلسترول و تعدادی از انواع پروتئین‌ها درون چارچوب فسفولیپیدی قرار گرفته‌اند. مولکول‌های لیپیدی و بعضی از پروتئین‌ها می‌توانند در سطح غشاء شناور شده و سیالیت ایجاد کنند. این سیالیت به سلول‌ها این اجازه را می‌دهد که تغییر شکل یافته و حتی حرکت نمایند. ولی با این حال اتصال بعضی از پروتئین‌های غشایی به مولکول‌های دیگر درون یا بیرون سلولی، حرکت جانبی آنها را محدود می‌کند. در فصل ۱۰ و ۱۱ در مورد غشاها و اینکه آنها چگونه مولکول‌ها را عبور می‌دهند بیشتر می‌آموزیم.



▲ **شکل ۱۳-۱ (شکل رنگی) قسمت آبکی درون سلول‌ها به وسیلهٔ غشای پلاسمایی، متشکل از یک پوستهٔ دولایه‌ای از فسفولیپیدها احاطه شده‌اند.** مولکول‌های فسفولیپید با زنجیره‌های اسید چرب (خطوط موج‌دار مشکی) جهت‌گیری شده به درون و گروه‌های سرغوطه‌ور در آب (کره‌های سفید) مشخص شده‌اند. بنابراین هر دو طرف غشا به وسیلهٔ قسمت سرپوشیده شده‌اند که به طور عمده حاوی فسفات‌های باردار بوده، و با محیط آبکی درونی و بیرونی سلول تماس برقرار کرده‌اند. تمام غشاهای زیستی همان ساختار پایه‌ای دولایه فسفولیپیدی دارند. کلسترول (قرمز) و پروتئین‌های مختلف (نشان داده نشده) در غشای دولایه فرو رفته‌اند. فضای واقعی درونی یک سلول بسیار بیشتر از حجم اشغال‌شده توسط غشای پلاسمایی در این شکل است.

سیتوزول و فضاهای درونی اندامک‌ها از لحاظ اسیدیته، ترکیب یونی و محتویات پروتئینی از یکدیگر و از قسمت خارجی سلول متفاوت می‌باشند. برای مثال، ترکیب نمک‌ها در درون سلول اغلب به طور مؤثری از آنچه که در قسمت بیرون است متفاوت می‌باشند. در نتیجهٔ این تفاوت‌ها ریز نواحی‌های هر قسمت از سلول کار مربوط به خود را داشته و رویهم رفته کار یک سلول را انجام می‌دهند (فصول ۱۰، ۱۲ و ۱۳). عملکردهای بی‌نظیر و ریزنواحی‌های قسمت‌های مختلف سلول در نتیجه پروتئین‌هایی می‌باشند که در غشاهایشان یا درون آنها قرار گرفته‌اند.

می‌توان تصور کرد که بخشهای مختلف سلول به عنوان یک کارخانهٔ اختصاصی عمل کرده و منجر به عملکرد موفق سلول می‌شوند. بیشتر کار سلولی به وسیلهٔ ماشین‌های مولکولی انجام می‌شود که بعضی در سیتوزول قرار گرفته، بعضی به اسکلت سلولی متصل می‌شوند و بعضی در اندامک‌های گوناگون قرار دارند. ما در اینجا به طور کامل وظایف اصلی سلول‌ها را مرور می‌نماییم.

سلول مولکول‌ها و ساختارهای بیشماری را می‌سازد و از بین می‌برند

سلول به عنوان کارخانه شیمیایی، شمار فراوانی از مولکول‌های پیچیده را از ترکیبات شیمیایی ساده تولید می‌کند. تمام این کار سنتزی به وسیلهٔ انرژی شیمیایی استخراج شده از قندها و چربی‌ها و یا نور خورشید (در مورد سلول‌های گیاهی) که در ATP، شکل رایج انرژی در جهان ذخیره شده‌اند، تقویت می‌شود (شکل ۱۴-۱). در سلول‌های حیوانی و گیاهی، اکثر ATP به وسیلهٔ ماشین‌های مولکولی بزرگی که در دو اندامک قرار گرفته‌اند یعنی میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، تولید می‌شود. ماشین‌های مشابه برای تولید ATP در غشای پلاسمایی سلول‌های باکتریایی وجود دارند. منشاء کلروپلاست و میتوکندری احتمالاً از باکتری‌هایی است که به درون سلول‌های یوکاریوتی وارد شده‌اند (فصل ۱۲).

تمام غذای ما به طور مستقیم یا غیرمستقیم، توسط سلول‌های گیاهی استفاده کنندهٔ از نور خورشید برای ساخت ماکرومولکول‌های پیچیده در طول فتوسنتز ایجاد شده‌اند. حتی نفت اعماق زمین هم از تجزیهٔ مواد گیاهی مشتق شده‌اند.

سلول‌ها به هنگام نیاز به مولکول‌های کوچک می‌توانند قسمت‌های فرسوده را خود تجزیه کنند و دوباره وارد چرخه کنند. این وظیفه بر عهده **لیزوزوم‌ها** (اندامک‌های انباشته شده با آنزیم‌های تجزیه کننده) واگذار شده است. قسمت درونی لیزوزوم pHای در حدود ۵ دارد که تقریباً ۱۰۰ برابر اسیدی‌تر از pH سیتوزول می‌باشد. pH پایین به تجزیه مواد به وسیلهٔ آنزیم‌های لیزوزومی کمک می‌نماید، آنزیمهای مزبور طوری طراحی شده‌اند که در آن pH فعالیت دارند. برای ایجاد محیطی با pH پایین، پروتئین‌هایی در غشای لیزوزومی قرار گرفته‌اند که یون‌های هیدروژن را با استفاده از انرژی ATP به درون لیزوزوم پمپ می‌کنند (فصل ۱۱). لیزوزوم‌ها در کار پاکسازی سلول با پراکسیزوم‌ها همکاری می‌نمایند. این اندامک‌های کوچک برای تجزیه اجزاء لیپیدی غشاها و سموم مضر مختلف نیز اختصاصی شده‌اند.

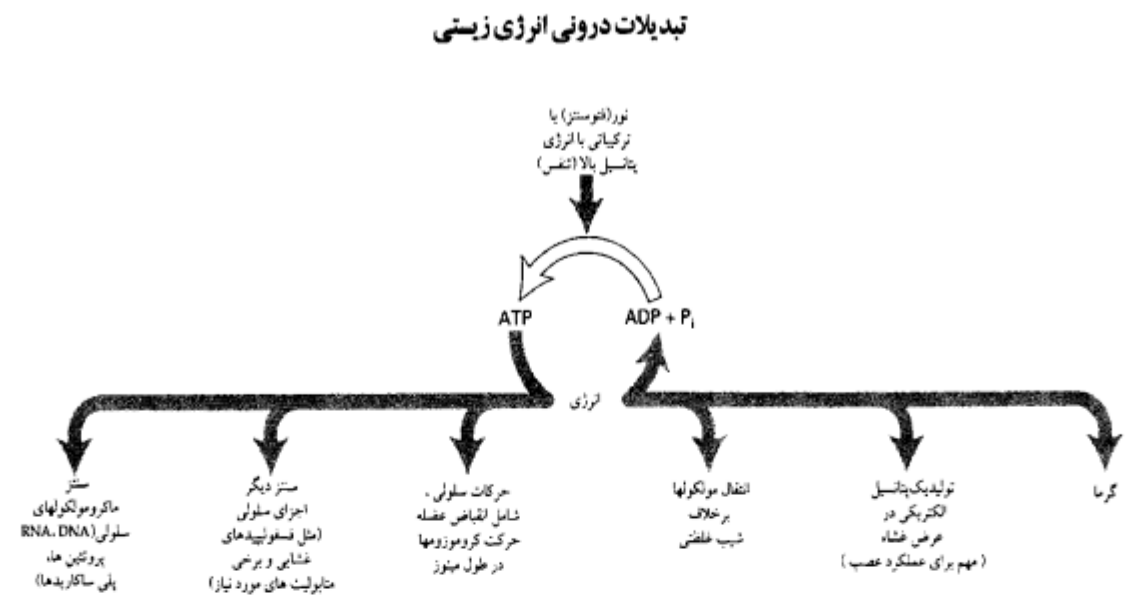
بیشتر ویژگی‌های ساختاری و عملکردی سلول‌ها وابسته به پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین برای سلول‌هایی که به طور صحیح کار می‌کنند، پروتئین‌های بیشماری باید از محل سنتز به مکان‌های مناسب‌شان انتقال داده شوند (فصول ۱۷ و ۱۸). بعضی از پروتئین‌ها روی ریبوزوم‌های آزاد در سیتوزول ساخته می‌شوند. با این حال پروتئین‌های ترشح شونده از سلول و بیشتر پروتئین‌های غشایی، بر روی ریبوزوم‌های متصل به **شبکه آندوپلاسمی**[1] (ER) ساخته می‌شوند. این اندامک هم پروتئین‌ها و هم چربی‌ها را تولید کرده، پردازش نموده و به بیرون انتقال می‌دهد. زنجیره‌های پروتئینی تولید شده در ER به کمپکس گلژی انتقال یافته، و در آنجا متحمل تغییرات بیشتری می‌شوند. پروتئین‌هایی که در این مسیر حرکت می‌کنند شامل توالی‌های کوتاه اسید آمینه‌ای یا زنجیره‌های قندی متصل (الیگوساکاریدها) می‌باشند که به عنوان نشانه‌هایی برای جهت‌یابی پروتئین‌ها به مقاصد صحیح‌شان بکار می‌روند. این نشانه‌ها عملکرد دارند زیرا آنها به وسیلهٔ پروتئین‌های دیگر تشخیص داده شده و به آن‌ها متصل می‌شوند و به این ترتیب پروتئین‌ها را به بخشهای مختلف سلول هدایت می‌کنند.

سلول‌های جانوری محیط خارجی و مایعات خود را خودشان می‌سازند

ساده‌ترین حیوانات تک‌سلولی در ژله‌ای از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها که **ماتریکس خارج سلولی** نامیده می‌شوند فرو رفته‌اند. سلول‌ها خودشان این مواد را تولید و ترشح می‌نمایند، بنابراین محیط خودشان را تولید می‌کنند (فصل ۱۹). کلاژن، فراوان‌ترین پروتئین ویژه در سلسلهٔ جانوری، یک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی در بیشتر بافت‌ها می‌باشد. در حیوانات، ماتریکس خارج سلولی، سلول‌ها را لغزنده می‌نماید. یک ماتریکس ویژه بادوام بنام **بازال لامینا** (غشای پایه) لایهٔ صفحه مانند زمینه‌ای محافظت کنندهٔ لایه‌های سلولی بوده و به سلول‌ها کمک می‌نماید که از بقیه قسمت‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای دور بمانند.

سلول‌ها در بافت‌های حیوانی به وسیلهٔ **مولکول‌های چسبندگی سلول** (CAMs) که در غشاهای سطحی‌شان قرار دارد به هم چسبیده شده‌اند. بعضی از مولکول‌های چسبندگی سلول، سلول‌ها را به یکدیگر متصل می‌کنند؛ انواع دیگر به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شوند و یک واحد چسبنده را تشکیل می‌دهند. سلول‌های گیاهان عالی شامل تعداد

1- Endoplasmic reticulum



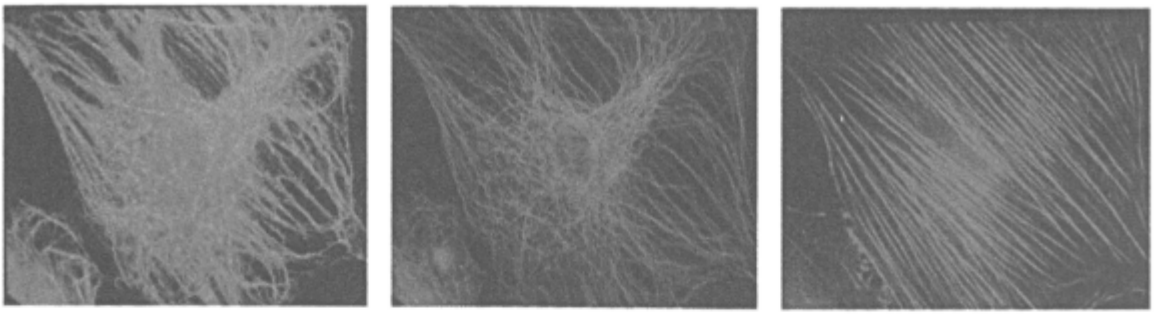
▲ **شکل ۱۴ـ۱ ATP شایع‌ترین مولکول استفاده شده توسط سلول‌ها برای به دام انداختن و انتقال انرژی است.** ATP از ADP و فسفات معدنی (Pi) توسط فتوسنتز در گیاهان و به وسیلهٔ تجزیه قندها و چربی‌ها در بیشتر سلول‌ها تشکیل یافته است. انرژی آزاد شده توسط شکافت (هیدرولیز) Pi از ATP، تعدادی از فرآیندهای سلولی را به راه می‌اندازند.

نسبتاً کمی از این مولکول‌ها می‌باشند؛ در عوض، سلول‌های گیاهی به وسیلهٔ پیوستگی وسیع دیواره‌های سلولی سلول‌های مجاور به سختی و به شدت به یکدیگر متصل شده‌اند. سیتوزول‌های مجاور سلول‌های حیوانی یا گیاهی اغلب به وسیلهٔ رابط‌های متشابه از لحاظ عملکردی اما متفاوت از نظر ساختاری که در حیوانات، **ارتباطات شکافدار** و در گیاهان **پلاسمودسماتا** نامیده می‌شوند به هم مرتبط شده‌اند. این ساختارها به سلول‌ها اجازه می‌دهند تا مولکول‌های کوچک مثل مواد غذایی و پیام‌ها را مبادله کنند و باعث تسریع عملکرد سلول‌ها در بافت‌ها شوند.

سلول‌ها تغییر شکل داده و حرکت می‌نمایند

سلول‌ها به خاطر داشتن سیتواسکلت (اسکلت سلولی)، تغییر شکل داده و حرکت می‌کنند. اسکلت سلولی، نیرویی را برای حرکت محتویات سلولی فراهم می‌کند. همانطور که بدن ما به اسکلت سخت و یک مجموعه‌ای از عضلات قابل کشش نیاز دارد، سلول‌ها نیز فیبرهای اسکلتی سخت و موتورهای پروتئینی تولیدکننده نیرو را دارا می‌باشند. اگرچه سلول‌ها بعضی اوقات کروی هستند، اما آنها به طور معمول به علت داشتن اسکلت درونی و اتصالات خارجی اشکال متفاوتی ایجاد می‌کنند. سه نوع از فیلامان‌های پروتئینی، در قالب شبکه‌ها و بسته‌های سازمان یافته، اسکلت درونی سلول‌های حیوانی را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۵ـ۱). اسکلت سلولی، غشای پلاسمایی سلول‌های حیوانی را از شل شدن به حالت کروی (فصل ۱۰) باز می‌دارد؛ این اسکلت همچنین در جنبش سلولی و انتقال درون سلولی وزیکول‌ها، کروموزوم‌ها و ماکرومولکول‌ها (فصول ۱۷ و ۱۸) عمل می‌نماید. اسکلت سلولی می‌تواند از طریق سطح سلول به ماتریکس خارج سلولی یا اسکلت سلولی سلول‌های دیگر متصل شود و بنابراین به تشکیل بافت‌ها کمک نماید (فصل ۱۹).

تمام فیلامان‌های اسکلت سلولی پلیمرهایی طویل از زیرواحدهای پروتئینی می‌باشند. سیستم‌های ماهرانه‌ای که تجمع و عدم تجمع اسکلت سلولی را تنظیم می‌نمایند، به نحوی کنترل کنندهٔ شکل سلول می‌باشند. در بعضی از سلول‌ها اسکلت سلولی نسبتاً پایدار است، اما در بقیه به طور پیوسته تغییر شکل می‌دهد. انقباض اسکلت سلولی در بعضی از قسمت‌های سلول و رشد آن در قسمت‌های دیگر، می‌تواند تغییراتی ایجاد نماید که باعث جنبش سلول شود. برای مثال، یک سلول می‌تواند در طرفی که به یک سطح و یا به سلول‌های دیگر متصل می‌شود گسترش پیدا کند و سپس



میکروفیلاماتها — میکروتوبولها — فیلامانهای حد واسط

▲ **شکل ۱۵-۱ (شکل رنگی) سه نوع فیلامان اسکلت سلولی که درون سلول‌ها به طور اختصاصی توزیع شده‌اند.** سه منظره از یک نوع سلول. یک فیبروبلاست کشت داده شده در معرض سه آنتی بادی مختلف قرار داده شده است. هر آنتی بادی به طور اختصاصی به مونومرهای تشکیل دهندهٔ یک نوع فیلامان مشخص متصل می‌شود. هر آنتی‌بادی نیز به طور شیمیایی به یک رنگ (سبز، آبی، یا قرمز) فلورسنت متصل شده است. مشاهدهٔ سلول رنگ‌آمیزی شده در یک میکروسکوپ فلورسنت، موقعیت فیلامان‌های متصل به یک آنتی بادی رنگی ویژه را نشان می‌دهد. در این مورد، فیلامان‌های حد واسط با رنگ سبز، میکروتوبول‌ها با رنگ آبی؛ و میکروفیلامان‌ها با رنگ قرمز مشاهده می‌شوند. هر سه سیستم رشته‌ای در شکل و جنبش‌های سلول‌ها مشارکت می‌کنند.

جسم سلول در انتهای دیگر سلول منقبض شود. همین امر باعث حرکت رو به جلوی سلول می‌شود. فرآیند مذکور به خاطر تغییرات هماهنگ در اسکلت سلولی روی می‌دهد. سلول‌ها می‌توانند در سرعتی معادل ۲۰ میکرومتر در ثانیه حرکت کنند. جنبش سلولی در طول رشد و نمو جنینی حیوانات چند سلولی به هنگام تشکیل بافت‌ها و در طول بلوغ برای دفاع بر ضد عفونت‌ها، برای انتقال مواد غذایی، و برای بهبود زخم‌ها به کار می‌رود. حرکت سلولی نقشی در رشد و توسعه گیاهان چندسلولی ایفا نمی‌نماید زیرا سلول‌های گیاهی جدید به وسیلهٔ تقسیم سلول‌های حاضر، دارای دیواره‌های سلولی مشترک تولید شده‌اند. یک نتیجه دیگر از فرآیند بالا وابستگی نموّ و توسعهٔ گیاهی به طویل شدن سلولی و نه جنبش سلول‌ها از یک موقعیت به موقعیت دیگری می‌باشد.

سلول‌ها اطلاعات را حس و سپس ارسال می‌کنند

یک سلول زنده به طور پیوسته محیط اطراف خود را بررسی می‌کند و فعالیت‌ها و ترکیبات ترکیباتش را برطبق آن تعدیل می‌کند. سلول‌ها همچنین به وسیلهٔ پیام‌های ارسالی خود که توسط سلول‌های دیگر دریافت می‌شود ارتباط برقرار می‌کنند. این قبیل پیام‌ها نه فقط درون یک موجود ویژه بلکه بین موجودات مختلف نیز متداول می‌باشند. برای مثال بوی گلابی پیام مبنی بر وجود یک منبع غذایی برای ما و دیگر حیوانات است و همچنین مصرف یک گلابی به وسیلهٔ یک حیوان به توزیع دانه‌های گلابی کمک می‌نماید. هر یک مزایایی دارند! پیام‌های بکار گرفته شده توسط سلول‌ها شامل مواد شیمیایی سادهٔ کوچک، گازها، پروتئین‌ها، نور و جنبش‌های مکانیکی می‌باشند. سلول پروتئین‌های گیرندهٔ زیادی را برای دریافت پیام‌ها و مسیرهای استادانه‌ای را برای انتقال آنها به درون سلول برای ارائه یک پاسخ مناسب دارا می‌باشند. در یک زمان معین یک سلول قادر است فقط بعضی از پیام‌های اطراف را حس نماید و به پیامهای تغییر یابنده با گذشت زمان پاسخ دهد. در بعضی موارد، دریافت یک پیام اولیه توسط سلول با پاسخ به یک پیام بعدی متفاوت در یک مسیر ویژه همراه می‌باشد.

تغییرات در محیط (یعنی، یک افزایش یا کاهش در یک مادهٔ غذایی ویژه یا میزان نور) و پیام‌های دریافت شده از سلول‌های دیگر، اطلاعات خارجی که سلول‌ها باید پردازش کنند را ارائه می‌نمایند. سریع‌ترین پاسخ‌ها به پیام‌ها عموماً مستلزم تغییرات در موقعیت یا فعالیت پروتئین‌های پیش موجود می‌باشند. برای مثال، اندکی بعد از اینکه شما یک وعده غذایی غنی از کربوهیدرات می‌خورید، گلوکز به درون جریان خون شما وارد می‌شود. افزایش گلوکز خون توسط سلول‌ها بتای پانکراس حس می‌گردد که به وسیلهٔ آزاد شدن هورمون **انسولین** ذخیره شده به آن پاسخ می‌دهد. پیام انسولین در جریان خون باعث می‌شود که انتقال دهنده‌های گلوکز در سیتوپلاسم سلول‌های عضلانی و چربی به سطح سلول حرکت کند و شروع به وارد کردن گلوکز به درون این سلول‌ها نمایند. همچنین سلول‌های کبدی گلوکز را از طریق انتقال دهنده‌های متفاوت جذب می‌کنند. در هر دو سلول کبدی و عضلانی، یک مسیر پیام‌رسانی درون سلولی به وسیلهٔ اتصال انسولین به گیرنده‌های سطح سلول، فعالیت آنزیم مورد

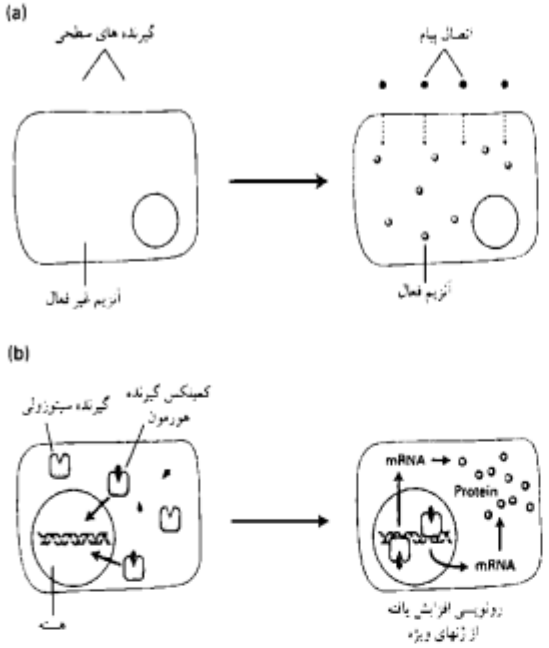
نیاز برای ساخت گلیکوژن، (پلیمر بزرگ گلوکز) را به پیش می‌برد. (شکل ۱۶a-۱). نتیجه خالص این پاسخ‌های سلولی کاهش سطح گلوکز بدن شما است و گلوکز اضافی به صورت **گلیکوژن** ذخیره می‌شود و سلول‌های شما می‌توانند از آن به عنوان منبع از گلوکز وقتی که شما یک وعدهٔ غذایی را برای دادن یک آزمایش حذف می‌کنید (منظور حالت ناشتا) استفاده نمایند.

توانایی سلول‌ها برای فرستادن و پاسخ به پیام‌ها برای رشد و نمو حیاتی می‌باشد. تعدادی از پیام‌های مهم رشد و نموی، پروتئین‌های مترشحهٔ تولیدی به وسیلهٔ سلول‌های ویژه در زمان‌ها و مکان‌های ویژه در یک موجود توسعه یافته می‌باشد. اغلب یک سلول دریافت کننده چندین پیام را در تعیین چگونگی رفتار، برای مثال، در تمایز به یک نوع بافت ویژه، با گسترش یک فرآیند، برای مردن، برای برگشت یک پیام تأیید کننده (بله، من اینجا هستم!)، یا برای مهاجرت، یکپارچه می‌نماید.

عملکرد حدود نیمی از پروتئین‌ها در انسان‌ها، کرم‌های پهن، مخمر و چندین موجود یوکاریوتی دیگر، بر پایهٔ آنالیزهای توالی‌های ژنومی پیش‌بینی شده‌اند (فصل ۶). این قبیل آنالیزها آشکار کرده‌اند که حداقل ۱۵-۱۰ درصد پروتئین‌ها در عملکرد یوکاریوت‌ها به صورت پیام‌های خارج سلولی ترشحی، گیرنده‌های پیام یا پروتئین‌های انتقال پیام درون سلولی عمل می‌کنند. پروتئین‌های پیام‌رسان در درون سلول، در طول یک سیگنال از مجموعه‌ای از مراحل اوج پاسخ ویژه سلولی مانند افزایش سنتزگلیکوژن عبور می‌کنند. به طور وضوح پیام‌رسانی و انتقال پیام از فعالیت‌های اصلی سلول‌ها می‌باشند.

سلول‌هایی که به ناچار با تغییر مواجه می‌شوند بیان ژن‌شان را تنظیم می‌نمایند

سلول‌ها علاوه بر تعدیل فعالیت پروتئین‌های موجود، اغلب به تغییر چگونگی و برای پیام‌های سلول‌های دیگر توسط تغییر مقدار یا نوع پروتئین‌های خود پاسخ می‌دهند. بیان ژن، فرآیندی که به طور انتخابی اطلاعات ژنتیکی را خوانده و استفاده می‌کند، به طور عمومی در سطح رونویسی که اولین مرحله در تولید پروتئین‌هاست کنترل می‌شود. در این روش سلول‌ها می‌توانند یک mRNA ویژه‌ای را هنگامی که به پروتئین رمزشونده توسط آن mRNA احتیاج است تولید کنند. بنابراین انرژی زائد را به حداقل می‌رسانند. با این حال تولید یک mRNA، فقط اولین زنجیره از رویدادهای تنظیم است که با هم‌دیگر یک محصول پروتئینی فعال از یک ژن را



▲ شکل ۱۶-۱ پیام‌های خارج سلولی به طور عمومی باعث یک تغییر در فعالیت پروتئین‌های از قبل موجود یا در مقادیر و انواع پروتئین‌هایی که سلول‌ها تولید می‌کنند می‌شوند. (a) اتصال یک هورمون یا مولکول پیام‌رسان دیگر به گیرنده‌های ویژه خود می‌توانند یک مسیر درون سلولی که فعالیت یک پروتئین از قبل موجود را افزایش یا کاهش می‌دهد به پیش ببرند. برای مثال، اتصال انسولین به گیرنده‌های خود در غشای پلاسمایی سلول‌های کبد و عضله منجر به فعالیت گلیکوژن سنتاز (یک آنزیم کلیدی در سنتز گلیکوژن از گلوکز) می‌گردد (b) گیرنده‌های هورمون‌های استروئیدی در درون سلول و نه روی سلول قرار گرفته‌اند. کمپلکس‌های گیرنده - هورمون، رونویسی از ژن‌های هدف ویژه را فعال می‌کنند که منجر به افزایش تولید پروتئین‌های کدشده توسط آن ژنها می‌شوند. تعدادی از پیام‌ها نیز که به گیرنده‌های روی سطح سلول متصل می‌شوند، توسط مسیرهای پیچیده‌تری، با اثر بر بیان ژن عمل می‌کنند.

کنترل رونویسی بیان ژن اولین مرحله در پاسخ باکتری روده‌ای E.coli به منابع متفاوت قندی می‌باشد. سلول‌های E.coli به طور ترجیحی گلوکز را به عنوان منبع قندی استفاده می‌کنند اما می‌توانند در مواقع بحرانی با لاکتوز هم زنده بمانند. این باکتری‌ها هم از یک بازدارنده[1] پروتئینی متصل‌شونده به DNA و هم از یک فعال کنندهٔ[2] پروتئینی متصل‌شونده به DNA برای تغییر سرعت رونویسی سه ژن مورد نیاز برای متابولیزه کردن لاکتوز وابسته به

مقادیر نسبی گلوکز و لاکتوز موجود استفاده می‌کنند (فصل ۴). این قبیل کنترل دوتایی مثبت / منفی بیان ژن، یک سازگاری عالی برای آنزیم‌های سلول باکتریایی فراهم می‌کند.

یوکاریوت‌های تک‌سلولی مانند سلول‌های باکتریایی، ممکن است به طور گسترده‌ای در معرض شرایط محیطی متنوع قرار گیرند که در نتیجه به تغییرات وسیعی در ساختارها و عملکرد سلولی نیاز دارند. برای مثال در شرایط گرسنگی رشد سلول‌های مخمر متوقف می‌شود و هاگ‌های ثابت و بی‌حرکتی را ایجاد می‌کنند (شکل ۴ـ۱ را ملاحظه کنید). با این حال در موجودات چندسلولی، محیط اطراف بیشتر سلول‌ها نسبتاً ثابت می‌باشد. هدف اصلی کنترل بیان ژن در ما و در دیگر موجودات پیچیده، کامل کردن ویژگی‌های انواع مختلف سلول‌ها به نفع گیاه یا حیوان کامل می‌باشد.

کنترل فعالیت ژن در سلول‌های یوکاریوتی معمولاً شامل تعادل عمده بین فعال کننده‌ها و بازدارنده‌های رونویسی می‌باشد. اتصال فعال کننده‌ها به توالی‌های تنظیمی ویژهٔ DNA که تقویت کننده‌ها[1] نامیده می‌شوند رونویسی را فعال کرده و اتصال بازدارنده‌ها به سایر توالی‌های تنظیمی دیگر که خاموش کننده‌ها[2] نامیده می‌شوند رونویسی را خاموش می‌کنند. در فصل ۷ و ۸، نگاه دقیقی به فعال کننده‌ها و بازدارنده‌های رونویسی و چگونگی عمل آنها و همچنین مکانیسم‌های دیگر درگیر در کنترل بیان ژن خواهیم پرداخت. در آخر اینکه، بیان یک ژن ویژه فقط می‌تواند در قسمتی از مغز و در طول ساعات بعد از ظهر و فقط در طول مرحلهٔ معینی از رشد و نمو و بعد از یک وعدهٔ غذایی زیاد و غیره روی دهد.

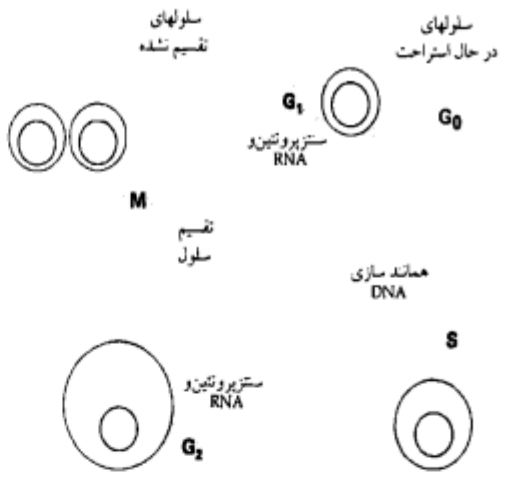
تعدادی از پیام‌های خارجی فعالیت فعال کننده‌های رونویسی و بازدارنده‌هایی که ژن‌های ویژه‌ای را کنترل می‌کنند، تغییر می‌دهند. برای مثال، هورمون‌های استروئیدی محلول در چربی مانند استروژن و تستوسترون می‌توانند از عرض غشای پلاسمایی انتشار یافته و به گیرنده‌های ویژه خود که در سیتوپلاسم یا هسته قرار گرفته‌اند متصل شوند (شکل ۱۶b ـ۱). اتصال هورمون، شکل گیرنده را به نحوی تغییر می‌دهد که می‌تواند به توالی‌های تقویت کننده در DNA متصل شود. بنابراین گیرنده به یک فعال‌کنندهٔ رونویسی تبدیل می‌شود. هورمون‌های استروئیدی با این مسیر انتقال پیام نسبتاً ساده، باعث می‌شوند که سلول‌ها ژن‌هایی را که از آنها رونویسی می‌کنند، تغییر دهند (فصل ۷). از اینرو هورمون‌های استروئیدی می‌توانند در جریان خون به طور موقتی بر روی ویژگی‌های تعدادی یا تمامی سلول‌ها در یک شیوهٔ هماهنگ شده تأثیر بگذارند. اتصال تعدادی دیگر از هورمون‌ها و فاکتورهای رشد به گیرنده‌های خود در روی سطح سلول، مسیرهای انتقال پیام متفاوتی را به پیش می‌برند که همچنین منجر به تغییراتی در رونویسی ژن‌های ویژه می‌شود (فصول ۱۵ و ۱۶). اگرچه این مسیرها به ترکیبات متفاوتی نیاز داشته و پیچیده‌تر از آنهایی می‌باشند که پیام‌های هورمون‌های استروئیدی را انتقال می‌دهند، ولی ایدهٔ عمومی یکسان می‌باشد.

سلول‌ها رشد کرده و تقسیم می‌شوند

همانطور که قبلاً بحث شد، تولیدمثل در قلب زیست‌شناسی می‌باشد؛ صخره‌ها تولید مثل انجام نمی‌دهند. تولیدمثل موجودات وابسته به تولیدمثل سلول‌ها می‌باشد. ساده‌ترین نوع تولیدمثل تقسیم یک سلول «والد» به دو سلول «دختر» می‌باشد. این پدیده به عنوان قسمتی از چرخهٔ سلول روی می‌دهد. چرخه سلولی مجموعه‌ای از وقایع است که یک سلول را بوسیلهٔ فرایندی که **میتوز** نامیده می‌شود برای تقسیم آماده می‌نماید. چرخهٔ سلول یوکاریوتی به طور عمومی به صورت چهار مرحله ارائه شده است (شکل ۱۷ـ۱). کروموزوم‌ها و DNA حمل‌شده توسط آنها در طول فاز S (سنتز) همانندسازی می‌شوند، کروموزوم‌های همانندسازی شده در طول فاز M (میتوزی) که در آن هر سلول دختر حاصل شده دارای یک کُپی از هر کروموزوم در طول تقسیم سلول است از هم جدا می‌شوند. فازهای M و S به وسیلهٔ دو مرحلهٔ وقفه، فاز G1 و G2، از هم جدا شده‌اند. در طول این دو فاز وقفه، mRNA و پروتئین ساخته می‌شوند. در موجودات تک‌سلولی، هر دو سلول دختر (ولی نه همیشه) همانند سلول والد می‌باشند. در موجودات چندسلولی، سلول‌های بنیادی می‌توانند باعث ایجاد دو سلول متفاوت شوند که یکی از آن‌ها شبیه سلول والد و دیگری شبیه به آن نیست. چنین تقسیم سلولی نامتقارنی برای تولید انواع مختلفی از سلول‌ها در بدن حیاتی و مهم می‌باشد (فصل ۲۱).

در طول رشد، چرخه سلولی به طور پیوسته و مداوم تنظیم می‌شود و سلول‌های دختر که به تازگی تشکیل شده‌اند فوراً در مسیر خودشان به مرحله میتوز وارد می‌شوند. تحت شرایط بهینه و مطلوب باکتری‌ها می‌توانند هر ۳۰ دقیقه یک بار به دو سلول دختری تقسیم شوند. با این سرعت، در یک ساعت یک سلول باکتری به چهار سلول تبدیل می‌شود و در یک روز تعداد سلول‌ها بیشتر از 10^{14} عدد می‌شوند، که وزن خشک آنها در حدود ۲۵ گرم خواهد شد. با این حال تحت شرایط طبیعی، رشد نمی‌تواند با این سرعت ادامه یابد زیرا

1-Enhancers 2-Silencers



▲ **شکل ۱۷ـ۱ به هنگام رشد، سلول‌های یوکاریوتی چهار مرحله را در چرخه سلولی طی می‌کنند که منجر به تولید سلول‌های دختر جدید خواهد شد.** در اکثر تکثیرات سلولی، چهار فاز به مدت ۲۰ـ۱۰ ساعت بسته به نوع سلول و وضعیت رشد با موفقیت روی می‌دهد. به هنگام اینترفاز که شامل فازهای G1، S و G2 است سلول تودهٔ خود را دو برابر می‌کند. به هنگام همانندسازی DNA در فاز S باعث می‌شود که هر سلول چهار نسخه از هر کروموزوم را داشته باشد. در فاز M (میتوز)، کروموزوم‌ها در دو سلول دختر تسهیم شده و سیتوپلاسم نیز به دو قسمت تبدیل می‌شود. تحت برخی از شرایط مثل سیری یا رسیدن اندازهٔ بافتها به یک حد مشخص، سلول چرخه را متوقف کرده و در یک وضعیت استراحت بنام Go قرار می‌گیرد. بسیاری از سلول‌های فاز Go می‌توانند با تغییر شرایط دوباره وارد چرخه شوند.

منابع غذایی محدود می‌شود.

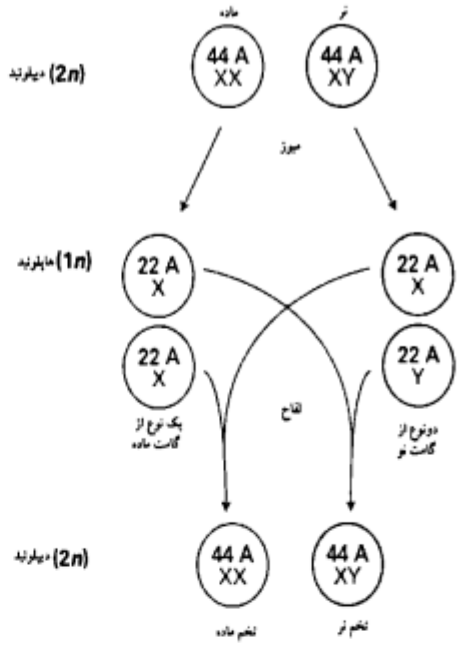
بیشتر سلول‌های یوکاریوتی زمان نسبتاً طولانی‌تری نسبت به سلول‌های باکتریایی برای رشد و تقسیم نیاز دارند. با این حال، چرخهٔ سلولی در گیاهان و حیوانات بالغ به طور طبیعی بسیار تنظیم شده است (فصل ۲۰). این کنترل سخت و شدید عدم تعادل را در تقسیم سلولی از بین می‌برد و باعث رشد زیاد بافت‌ها به هنگام فرسودگی و آسیب سلول‌ها می‌شود. همچنین آن باعث می‌شود که سلول‌های اضافی در پاسخ به موقعیت‌ها یا احتیاجات جدید رشد کنند. برای مثال، وقتی که یک شخص به یک ارتفاع بلندتر صعود می‌کند و به ضرفیت به دام انداختن اکسیژن بیشتری نیاز دارد تکثیر سلول‌های قرمز خون اساساً افزایش می‌یابد. بعضی از سلول‌های بسیار تخصص یافته در حیوانات بالغ، مانند سلول‌های عصب و سلول‌های عضلات مخطط، به ندرت تقسیم می‌شوند و یا به هیچ وجه تقسیم نمی‌شوند.

این تأثیر اساسی و بنیادی در تعادل رشد سلول، در سرطان (فقدان توانایی در کنترل رشد و تقسیم سلول‌ها) از بین می‌رود. در فصل ۲۵، ما وقایع سلولی و مولکولی که منجر به تکثیر نامناسب و کنترل نشدهٔ سلول‌ها می‌شود را بررسی می‌کنیم.

میتوز یک فرآیند غیرجنسی است زیرا سلول‌های دختر همان اطلاعات ژنتیکی سلول والد را حمل می‌نمایند. در تولیدمثل جنسی، الحاق دو سلول، سلول سومی را تولید می‌نماید که اطلاعات ژنتیکی هر دو سلول والد را در بر دارد. از اینرو چنین الحاق‌هایی باعث افزایش در تعداد کروموزوم‌ها خواهند شد. چرخه‌های تولیدمثلی جنسی یک نوع ویژه از تقسیم سلولی بنام **میوز** را بکار می‌گیرند که تعداد کروموزوم‌ها را برای آماده شدن جهت الحاق و ترکیب کاهش می‌دهد (شکل ۵ـ۳ را ملاحظه کنید). سلول‌هایی با یک مجموعهٔ کامل از کروموزوم‌ها سلول‌های **دیپلوئیدی** نامیده می‌شوند. در طول میوز، یک سلول دیپلوئیدی کروموزوم‌های خود را مثل تقسیم میتوز همانندسازی می‌کند اما در مرحلهٔ بعد بدون همانندسازی کروموزوم‌ها تقسیم می‌شود. در میوز هر چهار سلول دختر حاصل، فقط نیمی از تعداد کل کروموزوم‌ها را دارا می‌باشند که **هاپلوئید** نامیده می‌شود.

تولیدمثل جنسی در حیوانات و گیاهان و حتی در موجودات تک سلولی مانند مخمرها روی می‌دهد (شکل ۶ـ۲ را ملاحظه کنید). حیوانات زمان و انرژی قابل ملاحظه‌ای را برای تولید تخمک‌ها و اسپرم‌ها، (سلول‌های هاپلوئیدی که گامت نامیده شده‌اند و برای تولید مثل جنسی بکار می‌روند) صرف می‌نمایند. یک انسان مونث در حدود نیم میلیون تخمک در یک دورهٔ زندگی تولید می‌نماید و تمام این سلول‌ها قبل از این که او به دنیا بیاید تشکیل شده‌اند؛ یک انسان نوجوان مذکر در هر روز در حدود ۱۰۰ میلیون اسپرم تولید می‌نماید. گامت‌ها از سلول‌های پیش‌ساز دیپلوئیدی لایهٔ زایا تشکیل شده‌اند که در انسان‌ها شامل ۴۶ کروموزوم می‌باشد. در انسان‌ها کروموزم‌های X و Y، کروموزم‌های جنسی نامیده می‌شوند زیرا آنها تعیین‌کنندهٔ نر یا ماده‌بودن فرد هستند.

در سلول‌های دیپلوئیدی انسان، ۴۴ کروموزم باقیمانده، **کرموزوم اتوزومی** نامیده شده‌اند که به صورت جفت‌هایی از ۲۲ نوع مختلف موجود می‌باشند. در میوز، یک مرد، اسپرمی را که ۲۲ کروموزوم و همچنین یک X یا یک Y دارد تولید می‌نماید، و همچنین یک زن تخمکی (تخمک‌های لقاح نیافته) با ۲۲ کروموزوم به اضافه کروموزوم X را تولید می‌نماید. الحاق و ترکیب تخمک و اسپرم (لقاح)، یک تخمک لقاح یافته، یا همان تخم را با ۴۶ کروموزوم تولید می‌کند که شامل یک جفت از هر ۲۲ نوع کروموزوم و یک جفت از Xها در ماده‌ها

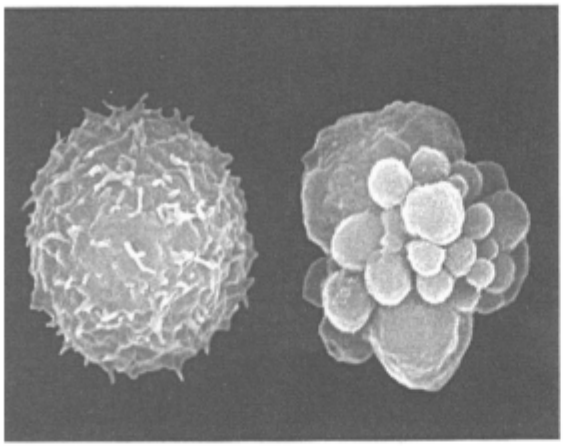


▲ **شکل ۱۸ـ۱ پدر تعیین‌کنندهٔ پسر یا دختر بودن است.** در حیوانات، میوز سلول‌های پیش‌ساز دیپلوئیدی، تخمک‌ها و اسپرم را به وجود می‌آورند (گامت‌ها). والد نر دو نوع اسپرم را تولید نموده و جنسیت تخم را تعیین می‌نماید. همانطور که در اینجا نشان داده شده است، در انسان‌ها X و Y کروموزم‌های جنسی هستند؛ تخم باید یک کروموزوم Y را از والد نر خود دریافت کند تا یک نر را بوجود آورد A = اتوزوم‌ها (کروموزوم‌های غیرجنسی).

و یا یک X و یک Y در نرها می‌باشد (شکل ۱۸ـ۱). خطاهایی که در طول میوز رخ می‌دهند به ناهنجاری‌هایی در تعداد کروموزوم‌ها منجر شوند. اینها شامل سندرم داون، دارای یک کروموزوم ۲۱ اضافی و سندرم کلاین فیلتر، دارای یک کروموزوم X اضافی می‌باشند.

سلول‌ها از شدت آسیب و یا با یک برنامه درونی می‌میرند

وقتی سلول‌ها در موجودات چندسلولی به طور جدی آسیب دیده و یا با یک ویروس دچار عفونت می‌شوند، می‌میرند. در مرگ سلولی که ناشی از یک رویداد تروما‌یی است یکپارچگی سلول به هم خورده و اغلب بطور بالقوه اجزای سمی آن آزاد می‌شود که می‌توانند به سلول‌های اطراف آسیب برسانند. سلول‌ها همچنین ممکن است هنگامی که برای دریافت یک پیام نگهدارنده و حافظ زندگی یا برای دریافت یک پیام مرگ ناتوان باشند، بمیرند. در این نوع مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول، که **آپوپتوز**[1] نامیده می‌شود یک سلول در حال مرگ واقعاً پروتئین‌های ضروری را برای نابودی خودش تولید می‌نماید. مرگ به وسیلهٔ آپوپتوز از رهایی بالقوه اجزاء سمی سلول جلوگیری می‌کند (شکل ۱۹ـ۱).



▲ **شکل ۱۹ـ۱ سلول‌های آپوپتوز شده بدون خروج اجزاء سلول دور از مکان اصلی خود که ممکن است به سلول‌های مجاور صدمه بزنند تجزیه شده و از بین می‌روند.** سلول‌های سفید خون به طور طبیعی مانند سلول نشان‌داده شده در سمت چپ به نظر می‌رسند. سلول‌ها تحت مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول (آپوپتوز) می‌میرند مانند سلول نشان داده شده در سمت راست که تعدادی سطح برآمدگی و حباب مانند را تشکیل داده که فوراً رها و آزاد می‌شوند. سلول نشان داده‌شده در حال مرگ است زیرا فاقد بعضی از پیام‌های رشد می‌باشد. آپوپتوز برای حذف سلول‌های عفونی شده با ویروس، حذف سلول‌ها از جائی که آنها مورد نیاز نمی‌باشند (مانند حاشیه‌های ضخیم و پرده‌ای که در توسعه و رشد انگشتان ناپدید می‌شوند) و برای حذف سلول‌های سیستم ایمنی واکنش‌دهنده با بافتهای خودمان، مهم است.

مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول برای توسعهٔ مناسب و عملکردی بدن ما حیاتی و مهم می‌باشد (فصل ۲۱). برای مثال در طول زندگی جنینی، دست‌های ما در ابتدا دارای «نواحی و قسمت‌های ضخیم» پرده مانند بین انگشتان می‌باشند؛ سلول‌ها در نواحی ضخیم و پرده مانند به تدریج در یک الگوی دقیق و منظمی از بین می‌روند و انگشتان و شست ما را برای نواختن پیانو در طول زندگی ترک می‌نمایند. سلول‌های مغز هیچ وقت نمی‌میرند مگر اینکه آنها صحیح شکل نگیرند یا برای ارتباطات الکتریکی با سلول‌های دیگر مفید نباشند. بعضی از لنفوسیت‌های توسعه یافته سلول‌های سیستم ایمنی برای تشخیص پروتئین‌ها و پلی ساکاریدهای خارجی انتخاب و برگزیده می‌شوند، برخی از این لنفوسیت‌ها توانایی واکنش دادن بر ضد بافت‌های خودمان را دارند. از این رو لنفوسیت‌های واکنش دهنده

1-Apoptosis

با بافت‌های خودی قبل از اینکه کاملاً بالغ شوند با مرگ برنامه‌ریزی شده از بین می‌روند. اگر این سلول‌ها قبل از رسیدن به بلوغ از بین نروند، ممکن است باعث بیماریهای خودایمنی (اتوایمن) شوند که در آن سیستم ایمنی خودمان هر بافتی که برای محافظت از بدن نقش ایفاء می‌کند را از بین می‌برد.

۱-۴ مروری بر سلول‌ها و اجزای آنها

برای درک و فهم کامل از چگونگی نقش اجزای مولکولی مختلف سلول در عملکردهای سلولی یک سلول زنده باید دیدگاههای مختلفی را در نظر بگیریم. در اینجا به پنج دیدگاه از بُعد زیست‌شناسی سلولی، بیوشیمی و بیوفیزیک، ژنتیک، ژنومیک و زیست‌شناسی تکوینی می‌پردازیم که بوسیله آنها می‌توانیم به انش‌مان در مورد ساختار و عملکرد سلول اضافه نماییم. جنبه‌های عملی و آزمایشگاهی هر کدام از رشته‌های فوق کارهای درونی سلول ا به روش‌های مختلف جستجو می‌کند و به ما این اجازه را می‌دهد که نواع مختلفی از سئوال‌ها را دربارهٔ سلول‌ها و چگونگی عملکرد آنها پرسیم. تقسیم سلولی مثال خوبی برای تشریح نقش این دیدگاهها ر آنالیز یک فرآیند سلولی پیچیده را فراهم می‌نماید. اگرچه ما یدگاههای مختلف را به طور مجزا با نظم و ترتیب بحث می‌نمائیم، ولی در عمل بیشتر زیست‌شناسان چندین دیدگاه را به طور هماهنگ مورد استفاده قرار می‌دهند. قراردادن علم ژنتیک همراه با علم میکروسکوپ یا علم آنزیم‌شناسی با علم تکوین، یک سرگرمی و لذت زیست‌شناسی سلولی است.

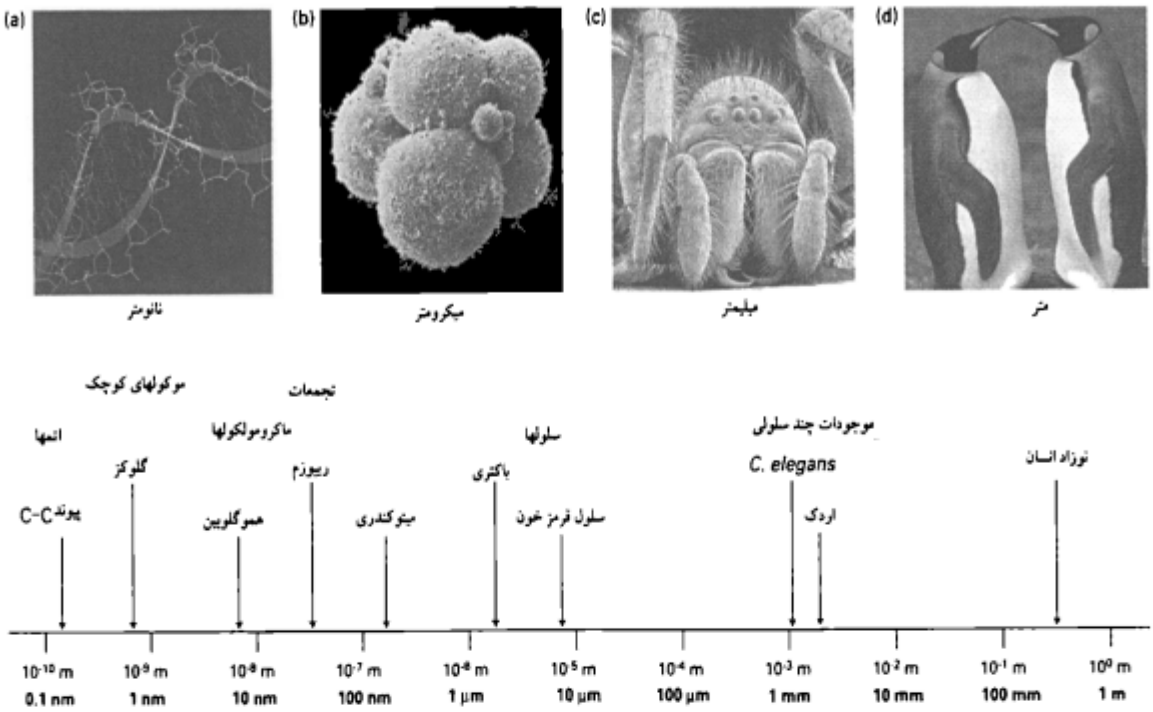
قلمرو دامنه‌های زیست‌شناسی مقیاسی بیشتر از میلیارد را شامل می‌شود (شکل ۲۰-۱). در یک سوی آن، اکولوژی (بوم‌شناسی) و علم زمین در انتهای «ماکرو»، و در سوی دیگر شیمی و فیزیک در انتهای «میکرو» قرار دارند. گیاهان و حیوانات مرئی که محیط اطراف ما را احاطه می‌نمایند در مقیاس متر اندازه‌گیری می‌شوند (متر 10^{2} تا 10^{-2}). با نگاهی دقیق‌تر ما می‌توانیم جهان زیستی را در مقیاس میلیمترها ($1mm=10^{-3}m$) و حتی یک دهم میلیمتر ($10^{-4}m$) ملاحظه نمائیم. به غیر از تخم‌های پرندگان، بیشتر سلول‌ها ۱۰۰-۱ میکرومتر ($1\mu m=10^{-6}m$) طول دارند و بنابراین فقط هنگامی که در زیر ذره‌بین قرار گرفته باشند به طور وضوح دیده می‌شوند. برای دیدن ساختارهای درونی سلول‌ها، ما باید به سوی مقیاس‌هایی در حد ۱۰۰-۱۰ نانومتر ($1nm=10^{-9}m$) برویم.

زیست‌شناسی سلولی، اندازه، شکل، موقعیت و حرکات اجزای سلول را آشکار می‌نماید

هدف زیست‌شناسان سلولی فهمیدن چگونگی کنترل ویژگی‌های سطحی و شکلی سلول توسط خود سلول، انتقال مواد به مکان‌های صحیح، تکثیر سلولی و دریافت و ارسال پیام‌ها می‌باشد. زیست‌شناسان سلولی چندین نوع میکروسکوپ را برای مشاهدهٔ سلول‌ها بکار می‌برند، و همزمان اجزای ویژه سلول را علامت گذاری کرده و تغییرات پیش روی آنها را با میکروسکوپ بررسی می‌کنند. آنالیزها عموماً در مقیاس میکرومتری انجام می‌شوند.

مشاهدهٔ واقعی سلول‌ها با توسعهٔ میکروسکوپ‌های اولیه در اوایل دههٔ ۱۶۰۰ انجام شده است. یک میکروسکوپ کامل، سودمندترین نوع میکروسکوپ نوری، دو عدسی یا لنز دارد. قدرت بزرگ کنندگی میکروسکوپ، در اثر بزرگنمایی هر کدام از عدسی‌ها می‌باشد. به موازات اختراع عدسی‌های بهتر، قدرت بزرگ‌نمایی و توانایی تشخیص با وضوح بیشتر فواصل اشیاء (قدرت تفکیک) بسیار افزایش یافت. میکروسکوپ‌های مرکب پیشرفته، تصویر را در حدود یک هزار بار بزرگ می‌نمایند، یعنی یک باکتری با طول یک میکرومتر ($1\mu m$) در زیر این میکروسکوپ یک میلیمتر طول دارد. اشیاء با طول $0/2\mu m$ اختصاصاً با این وسیله می‌توانند تمییز داده شوند.

هنگامی که اجزاء سلول اختصاصاً رنگ‌آمیزی شده و یا علامت‌گذاری شوند میکروسکوپ قوی‌تر عمل می‌کند و ما را قادر می‌سازد که این اجزاء را به آسانی ببینیم و مکانشان را درون سلول تعیین کنیم. یک مثال ساده رنگ‌آمیزی با رنگ‌هایی است که به طور اختصاصی برای دیدن کروموزم‌ها به DNA متصل می‌شوند. پروتئین‌های ویژه به وسیلهٔ علامت گذاری با آنتی بادی‌های ویژه می‌توانند تشخیص داده شوند. آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی هستند که وظیفهٔ عادی آنها کمک به دفاع حیوانات بر ضد عوامل خارجی و عفونت می‌باشد. در حالت کلی، هر نوع آنتی بادی به یک پروتئین یا پلی‌ساکارید بزرگ و نه چیز دیگری متصل می‌شود (فصل ۳). آنتی بادی‌های تخلیص شده می‌توانند به طور شیمیایی به یک مولکول فلورسنت متصل شوند، که اجازه می‌دهد در زیر یک میکروسکوپ فلورسنت ویژه، این آنتی بادی تشخیص داده شود و محل پروتئین یاپلی ساکارید مورد نظر تعیین گردد (فصل ۳). اگر یک سلول یا بافت با یک ترکیب شوینده که به طور ویژه غشاهای سلولی را حل می‌نماید تیمار شود، آنتی بادی‌های فلورسنت می‌توانند به پروتئینی ویژه که آنها تشخیص می‌دهند متصل گردند. وقتی که نمونه در زیر میکروسکوپ



▲ **شکل ۲۰ـ۱. زیست شناسان علاقه‌مند می‌باشند که محدوده اندازه اشیاء را از مولکول‌های کوچک تا بلندترین درخت‌ها قرار دهند.** یک نمونه از اشیاء زیستی که در یک مقیاس لگاریتمی تنظیم شده‌اند. (a) مارپیچ دورشته‌ای DNA قطری در حدود ۲nm دارد. (b) جنین انسان در مرحله هشت سلولی و سه روز بعد از لقاح در حدود ۲۰۰mm عرض دارد. (c) یک عنکبوت گرگی، در حدود ۱۵mm عرض دارد. (d) پنگوئن‌های امپراور در حدود ۱m قد دارند.

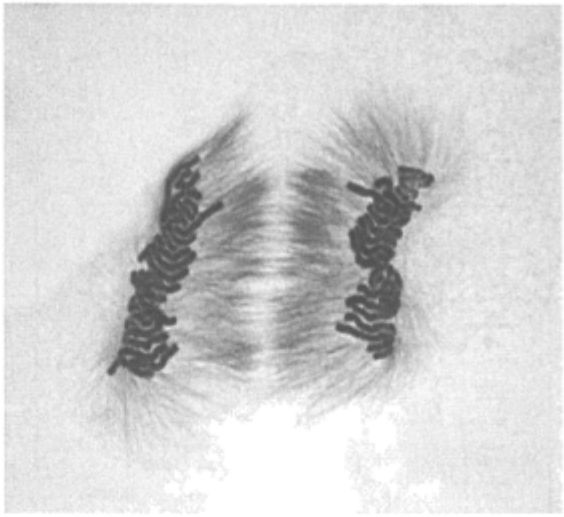
دیده می‌شود، اتصال آنتی بادی‌های فلورسنت موقعیت و مکان‌پروتئین هدف را تشخیص می‌دهد (شکل ۱۵ـ۱ را ملاحظه نمائید).

با وجود این هنوز پروتئین‌های خیلی جزئی و کوچک در سلول‌های زنده با غشاهای سالم و دست نخورده وجود دارند. یک راه برای حل این مشکل، استفاده از یک ژن مهندسی شده می‌باشد که یک پروتئین هیبرید را رمزدهی می‌کند. قسمتی از پروتئین هیبرید، پروتئین سلولی مورد نظر می‌باشد و قسمت دیگر پروتئینی است که هنگام در معرض قرارگیری با اشعه ماورا بنفش خاصیت فلورسانس دارد. یک پروتئین فلورسنت معمول که برای این هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد پروتئین فلورسنت سبز (GFP) (یک پروتئین طبیعی که رنگ و فلورسنت ماهی ژله‌ای را ایجاد می‌کند) می‌باشد. GFP برچسب شده می‌تواند در زیر میکروسکوپ دیده شود. برای مثال، یک پروتئین ویژهٔ نشاندار با GFP اولین بار روی شبکهٔ آندوپلاسمی ساخته می‌شود و سپس توسط سلول به درون لیزوزوم انتقال می‌یابد. در این مورد اولین شبکهٔ آندوپلاسمی و لیزوزوم‌های بعدی در زیر میکروسکوپ فلورسانس در تاریکی خواهند درخشید.

کروموزوم‌ها فقط در طول میتوز و هنگامی که بسیار متراکم می‌شوند در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده می‌باشند. رفتار فوق‌العاده کروموزوم‌ها در طول میتوز ابتدا با استفاده از میکروسکوپ‌های مرکب اصلاح شده در اواخر دههٔ ۱۸۰۰ کشف شد. در مراحل میانی میتوز، کروموزم‌های همانندسازی‌شده، شروع به حرکت به کنار سلول می‌نمایند. میکروتوبول‌ها، که یکی از سه نوع فیلامان‌های اسکلت سلولی هستند در این حرکت کروموزوم‌ها در طول میتوز دخالت می‌نمایند.

نشاندار کردن توبولین (پروتئین تک زیرواحدی که برای تشکیل میکروتوبول‌ها پلی‌مریزه می‌شود) با فلورسانت، جزئیات ساختاری تقسیم سلول را که به صورت‌های دیگر نمی‌توانست مشاهده شود آشکار کرده و باعث مشاهده حرکت کروموزوم‌ها شده است (شکل ۲۱ـ۱).

میکروسکوپ‌های الکترونی بجای پرتو نوری یک پرتوی کانونی‌شده الکترونی را مورد استفاده قرار می‌دهند. در میکروسکوپ الکترونی، نمونه‌ها به قطعات خیلی نازک بریده می‌شود و زیر یک خلاء بزرگ قرار می‌گیرند. سلول‌های زنده را نمی‌توان با این میکروسکوپ مشاهده کرد. قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی در حدود ۰/۱ نانومتر است که اجازه می‌دهد جزئیات ریز ساختاری خوب دیده شوند



▲شکل ۲۱-۱(شکل رنگی). در طول مراحل بعدی میتوز، میکروتوبول‌ها (قرمز) کروموزوم‌های همانندسازی شده را (سیاه) به اطراف انتهاهای یک سلول در حال تقسیم هدایت می‌کنند این سلول گیاهی با یک رنگ (اتیدیوم) متصل به DNA برای آشکارکردن کروموزوم‌ها و با آنتی بادی‌های نشان‌دار شده با فلورسنت ویژه توبولین برای آشکار کردن میکروتوبول‌ها رنگ‌آمیزی شده است. در این مرحله از میتوز، دو کپی از هر کروموزوم همانندسازی شده (که کروماتید نامیده می‌شوند) از هم جدا شده و به دور از همدیگر حرکت می‌نمایند.

و این قدرت درشت نمایی، یک سلول باکتریایی راکه ۱μm طول دارد شبیه به یک توپ فوتبال خواهد ساخت. بیشتر اندامک‌ها در سلول‌های یوکاریوتی و ساختار غشای پلاسمایی دولایه اولین چیزهایی بودند که با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شدند (فصل ۹). با تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی جدید اختصاصی، مدل‌های سه بعدی اندامک‌ها و کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ می‌توانند از چندین تصویر استنباط شوند. اما برای به دست آوردن یک تصویر بسیار جزئی از ماکرومولکول‌های ویژهٔ درون سلول‌ها، باید به تکنیک‌هایی در محدوده و حوزه بیوشیمی و بیوفیزیک رجوع نماییم.

بیوشیمی و بیوفیزیک، ساختار مولکولی و شیمی ترکیبات تخلیص‌شدهٔ سلول را آشکار می‌نمایند

بیوشیمیست‌ها محتویات سلول‌ها را استخراج کرده و اجزای تشکیل دهندهٔ آنها را بر پایهٔ تفاوت در ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی‌شان، که جداسازی بخش‌ها[1] نامیده می‌شود از هم جدا می‌نمایند. توجه به مولکول‌های ویژه بدین معنی است که این مولکول‌ها در مقیاس نانومتر فعالیت می‌نمایند. توجه ویژه به پروتئین‌ها می‌باشد که اکثر فرایندهای سلولی را انجام می‌دهند. طرح جداسازی بخش‌های شاخص مستلزم کاربرد تکنیک‌های مجزای مختلفی در یک روش متوالی می‌باشد. اساس این تکنیک‌های جداسازی به طور عمومی بر پایهٔ تفاوت در اندازه یا بار الکتریکی مولکول‌ها می‌باشد (فصل ۳). برای خالص کردن یک پروتئین ویژه مورد نظر، یک روش خالص‌سازی طراحی می‌شود طوریکه بازده هر مرحلهٔ خالص‌سازی با آزمایش بر روی پروتئین مورد نظر مشخص می‌شود (شکل ۲۲-۱).

تخلیص ابتدایی یک پروتئین موردنظر از یک عصارهٔ سلولی اغلب یک کار خسته کننده و زمان‌بَر می‌باشد. اگر مقدار کمی از پروتئین تخلیص شده به دست آید، می‌توان به وسیلهٔ روش‌های بحث شده در فصل ۱۹ بر علیه آن آنتی‌بادی تولید کرد. برای یک بیوشیمیست، آنتی بادی‌ها ابزارهایی تقریباً کامل برای جداسازی مقادیر بیشتر یک پروتئین مورد نظر به منظور بررسی‌های بیشتر می‌باشد. آنتی بادی‌ها به طور مؤثر می‌توانند پروتئینی راکه به طور اختصاصی شناسایی می‌کنند از یک نمونه تقریباً خالص‌شدهٔ حاوی شماری از پروتئین‌های مختلف «بیرون بکشند[2]». یک روش مرسوم با کارایی بالا مهندسی کردن یک ژنی می‌باشد که پروتئین مورد نظر را به همراه پروتئین متصل‌شوندهٔ کوچک «برچسب» رمزدهی کند. این پروتئین کوچک برچسبی می‌تواند برای بیرون کشیدن پروتئین مورد نظر از کل عصاره‌های سلولی بکار گرفته شود.

تخلیص یک پروتئین مرحله‌ای ضروری برای مطالعات کاتالیزی واکنش‌های شیمیایی یا عملکردهای دیگر و چگونگی فعالیتهای تنظیمی می‌باشد. بعضی از آنزیم‌ها از چندین زنجیرهٔ پروتئینی (زیر واحدها) تشکیل شده‌اند که یکی از آنها کاتالیز کنندهٔ یک واکنش شیمیایی و زنجیره‌های دیگر، تنظیم کننده زمان و مکان واکنش می‌باشند. ماشین‌های مولکولی که تعدادی از فرایندهای حیاتی تشکیل دهندهٔ سلول را انجام می‌دهند حتی از پروتئین‌های بزرگ‌تری ایجاد می‌شوند. با جداسازی پروتئین‌های ویژه‌ای که تجمع یافته‌اند، فعالیت‌های کاتالیتیکی ویژه و فعالیت‌های دیگر آنها می‌تواند تشخیص داده شود. برای مثال، تخلیص و مطالعه فعالیت‌های پروتئین‌های ویژه تشکیل دهندهٔ ماشین همانندسازی DNA، سرنخ‌هایی را دربارهٔ چگونگی همانندسازی DNA در طول تقسیم فراهم می‌کند (فصل ۴).

ساختار سه بعدی، تاخورده یا کنفورماسیون (شکل فضایی) یک

1-Fractionation 2- Pluckout

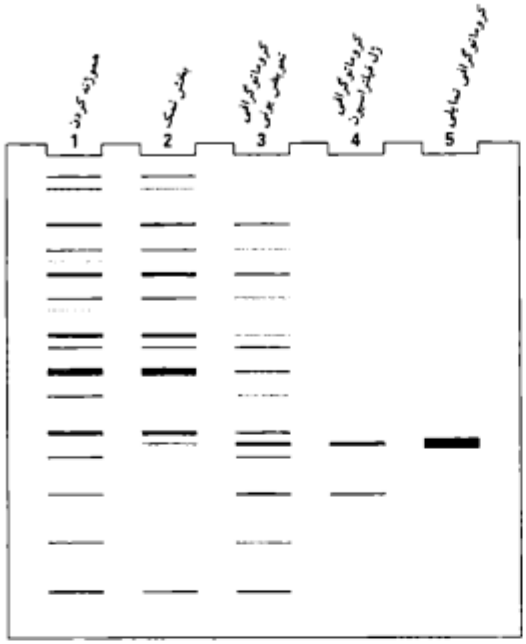
پروتئین برای عملکرد آن ضروری و حیاتی می‌باشد. برای فهم رابطهٔ بین عملکرد و ساختار یک پروتئین، ما به عملکرد ساختار جزئی آن پروتئین نیاز داریم. گسترده‌ترین شیوه برای تعیین ساختارهای پیچیدهٔ پروتئین‌ها، DNA و RNA، کریستالوگرافی اشعهٔ X می‌باشد که یکی از ابزارهای قدرتمند و توانمند علم بیوفیزیک می‌باشد. آنالیزهای کامپیوتری داده‌ها، اطلاعات دقیقی از مکان هر اتم در یک مولکول پیچیدهٔ بزرگ فراهم می‌کند. ساختار دورشته‌ای DNA که نقش کلیدی در وراثت دارد بر پایهٔ مطالعات کریستالوگرافی اشعهٔ X حاصل شده است. در سرتاسر این کتاب شما با مثال‌های متعددی از ساختارهای پروتئین مواجه خواهید شد همانطور که ما این فصل را با چگونگی عملکرد پروتئین‌ها شروع کردیم.

علم ژنتیک نتایج حاصل از ژن‌های آسیب دیده را آشکار می‌نماید

مطالعات بیوشیمیایی و کریستالوگرافی می‌توانند دربارهٔ یک پروتئین معین ویژه به ما کمک کنند، اما آنها نمی‌توانند در مورد نقش آن پروتئین در تقسیم سلولی یا هر فرآیند سلولی دیگر اطلاعات بدهند. اهمیت یک پروتئین موقعی با قطعیت شرح داده می‌شود که یک جهشی از سنتز آن جلوگیری کند و یا عملکرد آن را تحت تأثیر قرار دهد.

ما ژنوتیپ یک موجود را به عنوان ترکیب ژن‌های آن تعریف می‌کنیم؛ این اصطلاح همچنین به طور عمومی به عنوان مرجعی برای اختلافات و گوناگونی یک ژن واحد یا یک تعداد کوچک‌تری از ژن‌های مورد نظر در یک موجود خاص بکار رفته است. یک موجود دیپلوئید عموماً دو نوع **آلل** از هر ژن را حمل می‌نماید، که هر کدام از یک والد مشتق شده است. البته استثناهای مهمی مانند ژن‌های موجود بر روی کروموزوم‌های X و Y در نرهای بعضی گونه‌ها، مثل انسان وجود دارند. **فنوتیپ** (نتیجه عمل یک ژن) مانند چشم‌های آبی در مقابل چشم‌های قهوه‌ای یا اشکال قابل دید در نخودها می‌باشند. در روزهای اولیه علم ژنتیک، موقعیت و طبیعت شیمیایی ژن‌ها ناشناخته بود؛ فقط ویژگی‌های قابل مشاهده یا فنوتیپ‌ها می‌توانستند دنبال شوند. فهم این که ژن‌ها مانند «دانه‌های تسبیح» بر روی رشتهٔ بلند کروموزوم هستند در اوایل دهه ۱۸۹۰ بر پایهٔ کار با مگس میوه دروزوفیلا پیشنهاد شد.

از جنبهٔ کلاسیکی علم ژنتیک، جهش یافته‌ها آنهایی هستند که از بقیه جدا شده و فاقد توانایی برای انجام بعضی اعمالی هستند که یک



▲ **شکل ۲۲ـ۱ تخلیص بیوشیمیایی یک پروتئین از یک عصارهٔ سلول اغلب به چندین تکنیک جداگانه نیاز دارد.** تخلیص می‌تواند به وسیلهٔ الکتروفورز مخلوط پروتئین‌های اولیه و همچنین الکتروفورز پروتئین‌های بدست آمده از هر مرحلهٔ تخلیص انجام شود. در این شیوه یک نمونه در بالای ترکیب ژلاتین مانند لزج و در درون چاهک‌ها قرار گرفته و سپس تحت تأثیر یک میدان الکتریکی قرار می‌گیرد. در حضور غلظت‌های مناسب نمک و دترجنت، پروتئین‌ها از طریق رشته‌های ژل به سمت آند حرکت می‌کنند. حرکت پروتئین‌های بزرگ‌تر نسبت به حرکت پروتئین‌های کوچک‌تر بر روی ژل به کندی صورت می‌گیرد (شکل ۳ـ۳۵ را ملاحظه نمایید). هنگامی که ژل رنگ‌آمیزی می‌شود، پروتئین‌های جداشده به صورت نوارهای مجزا که با شدت غلظت پروتئین‌ها متناسب هستند دیده می‌شوند. تصاویر اسکن شده از ژل‌ها برای مخلوط پروتئین‌ها (خط ۱) و نمونه‌های دیگر بعد از چندین مرحله تخلیص می‌باشند. در اولین مرحلهٔ تخلیص بوسیلهٔ نمک، پروتئین‌هایی که با یک مقدار معینی از نمک ته‌نشین شده بودند الکتروفورز شدند. الکتروفورز این نمونه (خط ۲) نشان می‌دهد که آن پروتئین‌های کمتری نسبت به مخلوط اولیه دارد. سپس نمونه بوسیلهٔ سه نوع ستون کروماتوگرافی که پروتئین‌ها رابه وسیلهٔ بار الکتریکی، اندازه، یا تمایل اتصالی برای مولکول کوچک ویژه جدا می‌نماید بیشتر تخلیص می‌شود (شکل ۳ـ۳۷ را ملاحظه نمائید). نمونهٔ نهایی کاملاً خالص بوده، که حضور آنرا با یک نوار پروتئینی می‌توان در خط ۵ دید.

موجود طبیعی می‌تواند آن اعمال را انجام دهد. اغلب «غربال‌گری‌های وسیع ژنتیکی» برای جستجوی افراد جهش یافته (مانند مگس‌های میوه، سلول‌های مخمر) که قادر به تکمیل یک فرایند معین مانند تقسیم سلولی یا تشکیل عضله نمی‌باشند انجام می‌گیرد. در موجودات آزمایشگاهی یا سلول‌های کشت داده شده، جهش‌ها معمولاً به وسیلهٔ مواد **جهش‌زا**،[1] (یک عامل شیمیایی یا فیزیکی که جهش را در یک نقطه تصادفی به پیش می‌برد) تولید می‌شوند. اما چگونه ما می‌توانیم حیوانات یا سلول‌های جهش یافته‌ای راکه در بعضی از فرآیندها، مانند تقسیم سلولی ضروری برای بقاء، نقص دارند جدا نموده و نگهداری نماییم؟ یک راه برای جستجو استفاده از موجودات با یک **جهش حساس به حرارت** می‌باشد. این جهش یافته‌ها قادر به رشد در یک درجه حرارت، (حرارت مجاز)، اما نه در درجه حرارت دیگر، معمولاً درجهٔ حرارت بالا (درجه حرارت غیرمجاز) می‌باشند. سلول‌های طبیعی در هر درجهٔ حرارتی می‌توانند رشد کنند. در بیشتر موارد، جهش یافته حساس به حرارت یک پروتئین تغییر یافته‌ای راکه در درجهٔ حرارت مجاز عمل می‌کند اما به درستی تا نخورده و در درجهٔ حرارت غیرمجاز عمل نمی‌نماید، تولید می‌کنند. غربال‌گری‌های حساس به حرارت به آسانی با ویروس‌ها، باکتری‌ها، مخمر، کرم‌های پهن، و مگس‌های میوه انجام گرفته است.

با آنالیز تأثیرات تعدادی از جهش‌های حساس به حرارت مختلف که تقسیم سلول را تغییر می‌دهند، ژنتیکدانان تمامی ژن‌های ضروری و محصولات پروتئینی رمزشده توسط آنها را در فرآیند تقسیم سلولی کشف کردند. قدرت بزرگ علم ژنتیک آشکارنمودن حضور و نقش پروتئین‌ها بدون دانش قبلی از تشخیص بیوشیمیایی یا عملکرد مولکولی آنها می‌باشد. در نتیجه این تعریف ژن‌های جهش‌یافته جدا شده و با تکنیک‌های DNA نوترکیب که در فصل ۵ بحث شده، **کلون‌سازی** شدند. با ژن‌های جدا شده در دست، پروتئین‌های رمزدهی شده توسط آن‌ها در لوله آزمایش یا در باکتری‌های مهندسی شده یا سلول‌های کشت یافته می‌توانستند تولید شوند. سپس بیوشیمیست‌ها می‌توانستند بررسی کنند که پروتئین‌های همراه با دیگر پروتئین‌ها یا DNA و RNA، و کنش‌های شیمیایی ویژه را در طول تقسیم سلول کاتالیز می‌نمایند (فصل ۲۰).

آنالیز توالی‌های ژنوم موجودات گوناگون در طول دههٔ گذشته تعدادی از نواحی DNA که قبلاً ناشناخته بودند ولی احتمالاً نواحی رمزدهی‌کنندهٔ پروتئین‌ها بودند (یعنی نواحی رمزدهی‌کننده پروتئین) را معین کرده‌اند. عملکرد عمومی پروتئین به رمز درآمده توسط یک ژن با توالی شناخته شده ممکن است توسط شباهت با توالی پروتئین‌های شناخته شده استنباط گردد. علاوه بر جداکردن تصادفی جهش‌ها در ژن‌های جدید، امروزه چندین تکنیک برای غیرفعال کردن ژن‌های ویژه توسط جهش‌های مهندسی شده درون آنها یا ویران کنندهٔ mRNAشان با مولکول‌های RNA مداخله‌گر[2] (فصل ۵) قابل دسترسی می‌باشند. اثرات غیرفعال شدن ژن ویژه، اطلاعاتی را دربارهٔ نقش پروتئین‌های به رمز در آمده در موجودات زنده فراهم می‌کنند. این کاربرد تکنیک‌های ژنتیک با یک توالی ژن / پروتئین شروع شده و در نهایت با یک فنوتیپ جهش یافته تمام می‌شوند در حالیکه علم ژنتیک سنتی با یک فنوتیپ جهش یافته شروع و با یک توالی ژن / پروتئین خاتمه می‌یافت.

ژنومیک تفاوت‌هایی را در ساختار و بیان ژنوم‌های کامل آشکار می‌نماید.

علوم بیوشیمی و ژنتیک عموماً بر روی یک ژن و پروتئین رمزدهی‌شدهٔ آن در یک زمان متمرکز می‌شوند. علی‌رغم توانایی، این جنبه‌های سنتی (بیوشیمی و ژنتیک) یک دید وسیع و جامع از ساختار و فعالیت یک ژنوم، (مجموعهٔ کامل ژن‌های موجود) ارائه نمی‌کنند. رشتهٔ **ژنومیک**[3] علاوه بر تعیین ویژگی‌های مولکولی تمامی ژنوم‌ها، الگوهایی از بیان ژن را نیز تعیین می‌کند. اخیراً اتمام توالی‌های ژنوم بیشتر از ۱۰۰ گونه باکتری و چندین یوکاریوت به ما اجازه می‌دهد که ژنوم‌های کامل گونه‌های مختلف را مقایسه نماییم. این نتایج، شواهد یگانگی مولکولی فرایندهای زندگی و تکاملی ما را میسر ساخته است (قسمت ۱.۵ را ملاحظه کنید). روش‌های بر پایه ژنومیک برای مقایسهٔ هزاران بخش از DNA همهٔ افراد مختلف در یک زمان، تجربه‌ای مفید در ردیابی تاریخی و مهاجرت‌های گیاهان و حیوانات و متعاقباً وراثت بیماری‌ها در خانواده‌های انسان فراهم کرده است.

ریزآرایه‌های DNA می‌توانند تمام مولکول‌های mRNA ارائه شده در سلول و در نتیجه نوع ژنهای رونویسی شده را تعیین کنند. این قبیل الگوهای جامع بیان ژن به وضوح نشان می‌دهند که سلول‌های کبدی یک مجموعه متفاوت کاملی از ژن‌ها را نسبت به سلول‌های سفید خون یا سلول‌های پوست رونویسی می‌کنند. با این تکنیک تغییرات بیان ژن نیز می‌توانند در طول یک فرآیند بیماری،

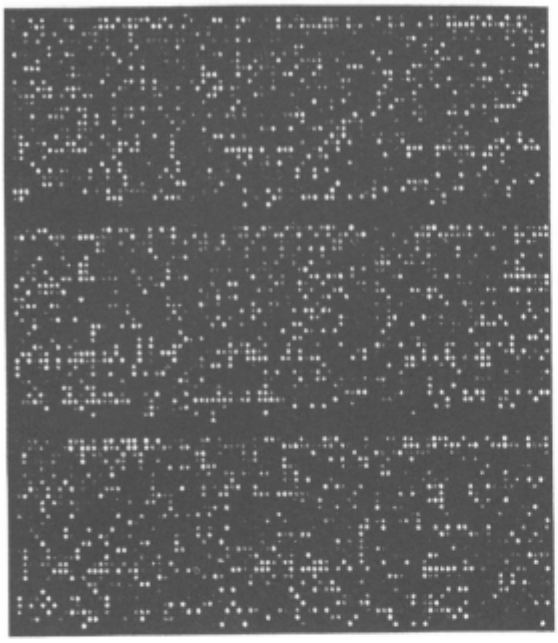
1-Mutagen
2-RNA interfering
3-Genomics

در پاسخ به داروها یا پیام‌های خارجی دیگر و در طول تکامل بررسی شوند. برای مثال، تشخیص تمام مولکول‌های mRNA موجود در فیبروبلاست‌های کشت داده شده در پیش از تقسیم، طول تقسیم و بعد از تقسیم یک دیدگاه کلی از تغییرات رونویسی را که در طول تقسیم سلول روی می‌دهد، ارائه می‌کنند (شکل ۲۳ـ۱). تشخیص سرطان با این تکنیک امکان‌پذیر است زیرا الگوهای بیان ژن در سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال از هم متفاوت است (فصل ۲۵). مطالعات مشابهی با موجودات مختلف و انواع سلول‌ها آشکار کننده نقش ژن‌های دخیل در تقسیم سلول و نقش ژنها در یک موجود ویژه می‌باشد. برای یافتن این که کدام یک از ژن‌ها به طور مستقیم توسط فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌شوند کروماتین حاوی پروتئین ژن موردنظر می‌تواند با یک آنتی بادی تخلیص و DNA همراه با آن بر روی ریزآرایه‌ها آنالیز شود، که این شیوه، رسوب ایمنی کروماتین نامیده می‌شود.

بخشی از کل پروتئین‌های موجود در یک سلول، (**پروتئوم**[1]) به وسیلهٔ تغییرات در بیان ژن کنترل می‌شود. سنتز تنظیم شده، موقعیت، پردازش و تجزیه پروتئین‌های ویژه نیز در تعیین پروتئوم یک سلول ویژه نقش‌هایی را ایفا می‌نمایند. یادگیری اینکه چگونه پروتئین‌ها با پروتئین‌های دیگر، مجتمع شده و کمپلکس‌های چندپروتئینی بوجود می‌آورند، یک دید جامع از ماشین‌های مولکولی مهم برای عملکرد سلول فراهم می‌کنند. رشتهٔ پروتئومیکس[2] به طور برجسته‌ای پیشرفت خواهد کرد زیرا تکنیک قدرتمندی بنام کریستالوگرافی اشعهٔ X با تأثیر بالا[3] که در حال توسعه یافتن است، به محققان اجازه می‌دهد به سرعت ساختارهای صدها یا هزاران پروتئین را تعیین نمایند.[این یافته‌ها باز هم نقش علم بیوشیمی را در تمام علوم زیستی مشخص می‌کند و می‌توان این علم را ملکهٔ علوم پزشکی و زیستی نامید. مترجم]

زیست‌شناسی تکوینی تغییرات ویژگی‌های سلول‌ها را به هنگام تخصصی‌شدن آنها آشکار می‌نماید.

دیدگاه دیگر در مطالعهٔ سلول‌ها مطالعه تغییرات آنها در طول رشد و نمو یک موجود می‌باشد. باکتری‌ها، جلبک‌ها و یوکاریوت‌های تک‌سلولی (آغازیان، مخمرها) اغلب، اما به هیچ وجه همیشه به طور انفرادی نمی‌توانند کار کنند. عمل هماهنگ تریلیون‌ها سلول که بدن ما را تشکیل می‌دهند، به مقدار زیادی به ارتباط و تقسیم کار نیاز دارد. در طول توسعه موجودات چندسلولی، فرایند تمایز باعث عمل اختصاصی صدها نوع سلول، می‌شود. انتقال پیام‌های



▲ **شکل تجربی ۲۳ـ۱(شکل رنگی) آنالیز ریزآرایه سلول‌های در حال رشد مغز و سلول‌های توموری مغز.** یک آزمایش مانند این یک نقطهٔ شروع برای یادگیری این‌که چگونه سلول‌های توموری از سلول‌های طبیعی متفاوت هستند می‌باشد. RNA از سلول‌های در حال رشد مغز موش از مخچه و از یک تومور مخچه استخراج شده بود. RNA توموری با رنگ قرمز و RNA طبیعی مخچهٔ غیرتوموری با رنگ سبز علامت‌گذاری شده بود. دو RNA موجود با یک ریزآرایه حاوی هزاران نقطه از DNA، مخلوط و هیبرید شدند. هر نقطه شامل توالی DNA یک ژن می‌باشد. RNA متصل نشده با شسته شدن به بیرون رفته و ریزآرایه در معرض نور UV قرار گرفت به این خاطر که رنگ‌ها فلورسنت شوند. نقاطی که سبز هستند RNA اتصال یافته طبیعی می‌باشند و نقاطی که قرمز هستند RNA توموری اتصال یافته می‌باشند و نقاطی که زرد هستند تقریباً نواحی اتصال یافته برابر از هر یک می‌باشند. نقاط ضعیف رنگ‌آمیزی شده ژن‌هایی را برای این‌که RNA کوچکی در هر نمونه وجود دارد ارائه می‌کنند. اطلاعات بر این دلالت می‌کنند که ژن‌ها در تومورها، مخچهٔ طبیعی یا هر دو رونویسی شده‌اند. فقط قسمتی از اطلاعات در اینجا نشان داده شده است. مجموعهٔ کامل اطلاعات نیاز به آنالیز رنگها برای بیشتر از ۲۵۰۰۰ نقطه است، که تمامی اینها می‌توانند وارد یک اسلاید میکروسکوپی مناسب شوند. اندازه‌گیری‌های دقیق شدت رنگ‌ها به وسیلهٔ یک اسپکتروفوتومتر (طیف‌سنج) صورت می‌گیرد، اما مشاهدهٔ چشمی نشان می‌دهد که تعداد ژن بسیار زیادی در سلول‌های طبیعی یا توموری بیان شده است. بعضی از این تفاوت‌ها نتیجه تغییر در سلول‌های توموری است، اما بعضی ممکن است تغییرات بیان ژن را که باعث تشکیل تومورها می‌شود آشکار نماید. به علاوه پروتئین‌های منحصراً ساخته شده در تومورها و یا شاید ضروری برای رشد کنترل نشده، ممکن است اهداف مناسب کاندیدشده‌ای برای کشف داروهای ضدسرطان باشند.

1-Proteome 2-Proteomics

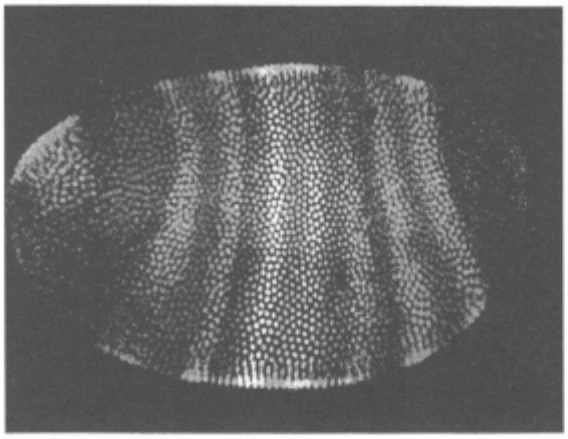
3-High-through x-ray crystallography

الکتریکی به وسیلهٔ نورون‌ها، انتقال اکسیژن به وسیلهٔ سلول‌های قرمز خون، از بین بردن باکتری‌های عفونت‌زا به وسیلهٔ ماکروفاژها، انقباض به وسیلهٔ سلول‌های عضله، پردازش شیمیایی توسط سلول‌های کبدی و غیره از این مواردند.

تعدادی از تفاوت‌ها در میان سلول‌های تمایزیافته در نتیجه تولید گروه‌های ویژه‌ای از پروتئین‌ها می‌باشد که برای انجام عملکردهای بی‌نظر هر نوع سلول موردنیاز می‌باشند؛ یعنی این که فقط یک زیرگروه از یک ژن موجود در یک زمان یا در یک سلول رونویسی شده است. یک چنین **بیان تمایزی ژن**[1] در زمان‌های مختلف یا در انواع مختلف سلول‌ها در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان، جانوران و حتی ویروس‌ها روی می‌دهد. بیان تمایزی ژن به آسانی در یک جنین ابتدایی مگس نمایان می‌شود، در این که تمامی سلول‌ها با مشخص شدن پروتئین‌های به رمز درآمده به وسیلهٔ ژن‌های ویژه رنگ‌آمیزی شده‌اند (شکل ۲۴ـ۱). رونویسی می‌تواند در یک نوع سلول در پاسخ به یک پیام خارجی یا در مطابقت با یک ساعت زیستی تغییر یابد؛ برای مثال بعضی ژن‌ها، تحت یک چرخهٔ روزانه بین سرعت‌های بالا و پایین رونویسی قرار می‌گیرند.

تولید انواع متفاوت سلول‌ها برای ایجاد یک موجود، کافی نمی‌باشد، هر مجموعه بیشتر از تمام قسمت‌های جزءتشکیل دهندهٔ خود است. انواع گوناگون سلول‌ها باید درون تمام بافت‌ها و اندام‌ها سازمان یافته و تجمع یافته باشند. حتی به طور قابل ملاحظه‌تر، این قسمت‌های بدن باید تقریباً فوراً بعد از تشکیل، عملکرد داشته و عمل پیوسته خود را در طول فرآیند رشد ادامه دهند. برای مثال، قلب انسان هنگامی که کمتر از ۳mm طول دارد شروع به تپش می‌کند. وقتی که ما جنین ۲۳ روزه می‌باشیم این تپش تا هنگامی که به یک عضله کامل در طول رشد تبدیل شود، ادامه پیدا می‌کند.

در تکوین موجود، سلول‌ها رشد می‌نمایند و در بعضی اوقات تقسیم می‌شوند و بقیه اینکار را انجام نمی‌دهند، سلول‌ها تجمع یافته و ارتباط برقرار می‌نمایند، آنها در فرآیند توسعه، خطاها را ترمیم کرده یا مهار می‌کنند و هر بافت را با دیگری هماهنگ می‌کنند. در موجودات بالغ، تقسیم سلولی بسیار زیاد در بیشتر اندام‌ها متوقف می‌شود. اگر قسمتی از یک اندام مانند کبد آسیب دیده یا برداشته شود، تقسیم سلول افزایش یافته تا این‌که اندام دوباره ایجاد شود. افسانه‌ای رواج دارد که زئوس، پرومتئوس را برای بخشش آتش به انسان‌ها با بستن او به یک صخره تنبیه می‌کند و عقابی کبد او را می‌خورد. تنبیه بی‌اثر بود زیرا، همانطور که یونانیان از قرار معلوم می‌دانستند، کبد نوبره تولید شد.

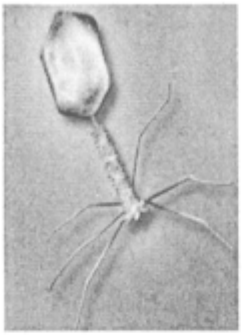


▲ شکل ۲۴ـ۱ (شکل رنگی) بیان تمایزی ژن می‌تواند در جنین ابتدایی مگس تعیین شده باشد قبل از این که سلول‌ها به طور مورفولوژیکی متفاوت گردند. یک جنین ابتدایی دروزوفیلا که در حدود ۶۰۰۰ سلول سطح آن را پوشانیده‌اند و مهم‌تر این که بسیاری از آنها به وسیلهٔ میکروسکوپ نوری ساده قابل تشخیص می‌باشند. هرگاه جنین با یک دترجنت که به طور جزئی غشاها را حل می‌کند تا سلول‌ها به آنتی‌بادیها نفوذپذیری داشته باشد، تیمار شود. آنتی‌بادی‌ها می‌توانند وارد سلول شده و به پروتئین‌هایی که تشخیص می‌دهند، اتصال می‌یابند. در این جنین ما آنتی‌بادی‌های برچسب شده را با یک برچسب فلورسنت متصل به پروتئین‌هایی که در هسته (هر کرهٔ کوچک مطابق با یک هسته) است مشاهده می‌کنیم. سه آنتی‌بادی متفاوت بکار گرفته شدند که هرکدام برای یک پروتئین متفاوت ویژگی داشته و هر کدام یک رنگ مجزا را (زرد، سبز، و آبی) در زیر میکروسکوپ فلورسنت می‌دهند. رنگ قرمز به هم‌پوشانی‌های برجسته بین رنگ‌های زرد و آبی اضافه شده است. مکان پروتئین‌های متفاوت نشان می‌دهند که سلول‌ها در حقیقت در این مرحلهٔ ابتدایی متفاوت می‌باشند و این خود نشان می‌دهد که ژن‌های ویژه‌ای در نوارهای مخصوص سلول‌ها روشن هستند. این ژن‌ها تقسیم جزئی بدن را به قطعات تکراری، مانند نوارهای زرد و سیاه یک زنبور سرخ، کنترل می‌کنند.

مطالعات تکوینی مستلزم دیدن این که کجا، چه وقت و چگونه انواع مختلفی از سلول‌ها تشکیل می‌شوند، این‌که پیام‌ها رویدادهای تکوینی را هماهنگ کرده و به پیش می‌برند و فهم عمل تمایزی ژن که تمایز را تحت تأثیر قرار می‌دهد، می‌باشد (فصول ۱۶ و ۱۲). در طول تکوین ما می‌توانیم در حالت طبیعی تغییر سلول‌ها را به سلول‌های دیگر مشاهده کنیم. زیست‌شناسی سلول، بیوشیمی،

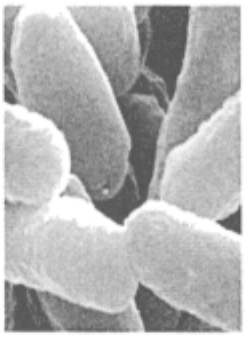
1-Different gene expression

(a)



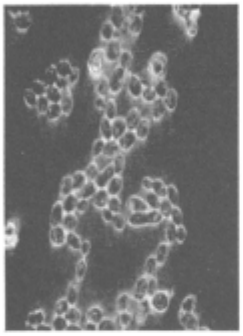
ویروسها
پروتئینهای مورد بحث در DNA و RNA
سنتز پروتئین
تنظیم ژن
سرطان و کنترل تکثیر سلول
انتقال پروتئین الدامکهای
درون سلولی
عفونی و ایمنی
جنبه های ممکن ژن درمانی

(b)



باکتریها
پروتئینهای مورد بحث در DNA و RNA
سنتزپروتئین
متابولیسم
تنظیم ژن
اهدافی برای آنتی بیوتیکها جدید
چرخه سلول
پیام رسانی

(c)



(ساکاروماپیس سرویزیه) **مخمر**
کنترل چرخه سلول وتقسیم سلول
ترشح پروتئین وتولید غشاء
عملکرد اسکلت سلولی
تمایز سلول
پیری
تنظیم ژن و ساختار کروموزوم

(d)

(کانورابدیتیس) کرم پهن
توسعه صفحه بدنی
سطح بندی سلول
تشکیل و عملکرد سیستم عصبی
کنترل مرگ برنامه ریزی شده
سلول ، تکثیر سلولی
و ژنهای سرطان
پیری
رفتار
تنظیم ژن و ساختار کروموزوم

(e)

(دروزوفیلا ملانوگستر) **مگس میوه**
توسعه صفحه بدنی
تولید دودمانهای تمایز یافته
تشکیل سیستم عصبی ، قلب
وعضلاتی
مرگ برنامه ریزی سلول
کنترل ژنتیکی رفتار
ژنهای سرطان و کنترل تکثیر سلول
کنترل تقسیم سلول
اثرات داروها الکل سموم کشنده

(f)

گورخر ماهی
توسعه بافتهای بدن مهرداران
تشکیل وعملکرد مغز وسیستم عصبی
نقایص تولید
سرطان

(g)

(مشعل سوئیهای کشت داده شده) **موش**
توسعه بافتهای بدن
عملکرد سیستم ایمنی پستانداران
تشکیل و عملکرد مغز وسیستم عصبی
مدلهای سرطان و دیگر بیماریهای انسان
تنظیم ژن و وراثت
بیماری عفونی

(h)

(رابیدوپسیس تاتانا) **گیاه**
توسعه و الگو برداری بافتها
ژنتیک زیست شناسی سلول
کاربرد های کشاورزی
فیزیولوژی
تنظیم ژن
ایمنی
بیماری عفونی

◀ شکل ۲۵ـ۱ هر موجود آزمایشگاهی که در زیست‌شناسی سلول بکار می‌رود مزایایی برای بعضی از انواع مطالعات دارد. ویروس‌ها (a) و باکتری‌ها (b) ژنوم‌های کوچکی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی دارا می‌باشند. تعدادی از مطالعات بیان ژن در ابتدا با مطالعه بر روی این موجودات به دست آمدند. مخمر ساکارومایسیس سرویزیه (c) سازمان یا بی سلولی یک یوکاریوت را دارد اما موجود تک‌سلولی نسبتاً ساده‌ای می‌باشد که برای رشد کردن و دست کاری ژنتیکی آسان می‌باشد. در کرم نماتود کانورابدیتیس الگانس (d) که در آن تعداد کوچکی سلول مرتب شده در یک الگوی تقریباً برابر در هر کرم وجود دارد، تشکیل هر سلول ویژه می‌تواند ردیابی شود. مگس میوهٔ دروزوفیلاملانوگاستر (e) که اولین موجود بکار برده شده برای کشف ویژگی‌های کروموزوم‌ها بود، به طور خاصی در تعیین ژن‌هایی که توسعه جنین را کنترل می‌نمودند باارزش می‌باشد. تعدادی از این ژن‌ها به طور تکاملی در انسان‌ها حفظ شده‌اند. گورخرماهی (دانیورریو) (f) برای غربال‌های ژنتیکی سریع به منظور تعیین ژن‌هایی که اندام‌زایی و توسعه را کنترل می‌نمایند بکار برده می‌شود. از سیستم‌های حیوانی آزمایشگاهی، موش (موس موسولوس) (g) از نظر تکاملی به انسان‌ها نزدیک‌ترین می‌باشد و مدل‌هایی را برای مطالعه تعدادی از بیماری‌های عفونی و ژنتیکی انسان‌ها مهیا می‌کند. علفی از خانوادهٔ کلم بنام آرابیدوپسیس تالیانا که بعضی اوقات به عنوان دروزوفیلای سلسلهٔ گیاهی توصیف می‌شود، برای غربال‌های ژنتیکی به منظور تعیین ژن‌های لازم در تقریباً هر جنبه از زندگی گیاهی بکار گرفته می‌شود. تعیین توالی ژنوم تعدادی از ویروس‌ها و گونه‌های باکتریایی، مخمر ساکارومایسیس سرویزیه، کرم حلقوی الگانس، مگس میوه ملانوگاستر، انسان و گیاه آرابیدوپسیس تالیانا تکمیل شده و تقریباً برای موش‌ها و گورخرماهی در حال تکمیل شدن است و برای سایر موجودات به ویژه قورباغه‌ها، توتیای دریایی، جوجه‌ها و کَپَک لجن که برای تحقیقات زیست‌شناسی سلول بسیار باارزش می‌باشند، ادامه دارد . انواع وسیعی از گونه‌های دیگر، مخصوصاً برای مطالعات تکامل سلول‌ها و مکانیسم‌ها بطور فزاینده‌ای، بکار گرفته می‌شوند.

بیوفیزیک، ژنتیک و ژنومیک روش‌هایی در مطالعهٔ سلول‌ها در طول تکوین می‌باشند.

انتخاب صحیح موجود زندهٔ آزمایشگاهی برای کار و تحقیق

فهم رایج ما از عملکرد مولکولی سلول‌ها متکی بر مطالعات انجام گرفته بر روی ویروس‌ها، باکتری‌ها، مخمر، آغازیان، کپک‌های لجن، گیاهان، قورباغه‌ها، توتیای دریایی، کرم‌ها، حشرات، ماهی‌ها، جوجه‌ها، موش‌ها و انسان‌ها می‌باشد. با دلایل گوناگون، بعضی موجودات برای جوابگویی به سئوالات ویژه مناسب‌تر از سایرین می‌باشند. در نتیجهٔ حفظ تکاملی ژن‌ها، پروتئین‌ها، اندامک‌ها، انواع سلول‌ها و غیره، کشفیاتی دربارهٔ عملکردها و ساختارهای زیستی یک موجود آزمایشگاهی که اغلب با سایرین به کار برده می‌شود به دست آمده است. بنابراین محققین معمولاً با موجودی که مناسب‌تر و به طور سریع‌تر و به طور کاملتری جوابگوی سئوال مطرح شده می‌باشد، به مطالعات جهت می‌دهند و مشخص شده که نتایج به دست آمده در یک موجود به طور کلی قابل تعمیم به موجودات دیگر و انسان می‌باشد. شکل ۲۵ـ۱ کاربردهای آزمایشگاهی شاخص موجودات گوناگون را که ژنوم آنها به طور کامل یا تقریباً کامل، تعیین توالی شده است خلاصه می‌کند. قابل دسترس بودن توالی‌های ژنوم این موجودات به طور ویژه آنها را برای علم ژنتیک و مطالعات ژنومیک مفید می‌سازد.

باکتری‌ها چندین مزیت را به عنوان موجودات آزمایشگاهی دارا می‌باشند. آنها سریع رشد می‌نمایند، مکانیسم‌های زیادی را برای کنترل فعالیت ژن دارا می‌باشند، و ژنتیک توانمندی دارند. این ویژگی اخیر به خاطر اندازهٔ کوچک ژنوم‌های باکتریایی، آسان بودن به دست آوردن جهش، دسترسی به تکنیک‌هایی جهت انتقال ژن‌ها به باکتری‌ها و اطلاعات زیاد دربارهٔ کنترل ژن و عملکردهای پروتئینی باکتریایی و سادگی نقشه‌برداری ژن‌های مربوط به ژنوم آن‌ها نسبت به ژنوم موجودات دیگر می‌باشد. مخمرهای تک‌سلولی نه تنها بعضی از همان مزایای باکتری‌ها را دارند بلکه سازمان‌یابی سلولی قابل ملاحظه و برجسته‌ای شامل وجود هسته و اندامک‌ها که مشخصهٔ تمامی یوکاریوت‌ها می‌باشد را نیز دارا می‌باشند.

مطالعه سلول‌ها در بافت‌های ویژه، استفاده از «مدل‌های» گیاهی و جانوری را مطرح می‌کند، یعنی اینکه موجودات آزمایشگاهی با صفاتی شاخص از بین تعدادی دیگر مشخص می‌شوند. برای مثال سلول‌های عصبی و سلول‌های عضله، ابتدا در پستانداران یا در جانورانی با سلول‌های بخصوص بزرگ یا در دسترس، مانند سلول‌های عصبی بزرگ هشت پا و خرگوش دریایی یا عضلات پروازی پرنده‌ها مطالعه شده بودند. اخیراً تکوین عصب و عضله به طور گسترده‌ای در مگس‌های میوه (دروزوفیلا ملانوگاستر)، کرم‌های پهن (کانورابدیتیس الگانس)، و گور خرماهی (دانیورریو) که در آنها جهش یافته‌ها به آسانی می‌توانند جدا شوند مورد مطالعه قرار گیرند. موجوداتی با جنین‌های فراوان سلولی که در بیرون از بدن مادر رشد می‌کنند (مانند قورباغه‌ها، توتیاهای دریایی، ماهی‌ها و جوجه‌ها) بی‌نهایت برای ردیابی سرنوشت‌های سلولی (مانند سلول هایی که

بافت‌های مختلفی را تشکیل می‌دهند) و برای استخراج در مطالعات بیوشیمیایی، مفید و سودمند می‌باشند. برای مثال، یکی از پروتئین‌های کلیدی در تنظیم میتوز اولین بار در مطالعه بر روی جنین‌های قورباغه و توتیای دریایی شناخته شد و بعداً از عصاره‌های آن تخلیص گردید (فصل ۲۰).

با کاربرد تکنیک‌های DNA نوترکیب، محققین می‌توانند ژن‌های حاوی جهش‌هایی که تولید پروتئین‌های رمزشده را غیرفعال یا افزایش می‌دهند، مهندسی نمایند. این قبیل ژن‌ها می‌توانند به درون جنین کرم‌ها، مگس‌ها، قورباغه‌ها، توتیاهای دریایی، جوجه‌ها، موش‌ها، گیاهان گوناگون و موجودات دیگر وارد شوند و اجازه دهند که اثرات فعال‌کنندگی یک ناهنجاری ژنی یا بازدارندگی عملکرد یک ژن طبیعی ارزیابی شوند. این شیوه به طور وسیع برای تولید انواع موش‌های حاوی بیماری‌های ژنتیکی انسان بکار گرفته شده است. غیرفعال شدن ژن‌های ویژه به وسیلهٔ قطعات کوتاه RNA مداخله‌گر، بررسی آزمایش‌های سریع عملکردهای ممکن ژن در تعدادی از موجودات را فراهم کرده است. گسترش پروژه‌های ژنوم اهمیت برجسته‌ای در بیماری موجودات مانند مالاریا و برای موجوداتی که دورهٔ درخت تکاملی آنها افق‌های جدیدی را برای پزشکی و دانش‌های جدید گشوده است پیدا کرده است.

موش‌ها مزیت بزرگی نسبت به سایر موجودات آزمایشگاهی دارند: آنها از جنبه توانمندی‌های ژنتیکی نزدیک‌ترین حیوانات به انسان‌ها می‌باشند. ژن‌های مهندسی شدهٔ موش جهش‌هایی شبیه به آنهایی که همراه با یک بیماری وراثتی ویژه در انسان‌ها که می‌تواند وارد سلول‌های بنیادی (ES) جنینی موش گردد حمل می‌کنند. این سلول‌ها می‌توانند به درون یک جنین اولیه تزریق شوند. سپس این سلول‌ها در درون یک موش باردار کاذب (موشی که با هورمون‌هایی تیمار شده تا تغییرات فیزیولوژیکی لازم برای بارداری در آن ایجاد شود) کاشته می‌شوند (فصل ۵). اگر موشی که از سلول‌های ES تزریق شده، رشد و توسعه یابد، بیماری شبیه بیماری انسانی را نشان می‌دهد. هنگامیکه مدل‌های موشی از بیماریهای انسانی در دسترس باشد مطالعات بیشتر روی نقایص مولکولی ایجادکنندهٔ بیماری‌ها انجام شده و درمان‌های جدید می‌توانند آزمایش گردند و در نتیجه قراردادن انسان در معرض درمان‌های آزمایش نشده به حداقل می‌رسد. غربال‌گری‌های ژنتیکی در مقیاس وسیع انجام شده تا مزیت ترانسپوزون‌های جهش‌زایی که جدیداً طراحی شده را تفسیر کنند. ترانسپوزون‌ها اجازه تولید کافی موش‌های جهش یافته و تشخیص سریع ژنی راکه در هر یک تحت تأثیر قرار گرفته، می‌دهند.

یک غربال ژنتیکی پیوسته در جمعیت‌هایی برای هزاران سال در انسان انجام شده است. چیزی که ما در نظر می‌گیریم این است که تمام انواع تفاوت‌های انسانی رخ داده و مشاهده شده‌اند، از اینرو آنها تأثیر ویژگی‌های قابل مشاهده و چشم‌گیر را تحت تأثیر قرار داده‌اند. هزاران صفت به ارث رسیده تشخیص داده شده‌اند و اخیراً، نقشه‌برداری موقعیت‌ها و مکان‌ها بر روی کروموزوم‌ها انجام شده است. بعضی از این صفات تمایلات طبیعی برای به دست آوردن یک بیماری وراثتی هستند؛ بقیه رنگ چشم، یا دیگر ویژگی‌های کوچک می‌باشند. تفاوت‌های ژنتیکی در هر جنبه از زیست‌شناسی سلول که می‌تواند در جمعیت‌های انسانی یافت شوند، امکان مطالعاتی را در حالات طبیعی و بیماری و سلول‌های گوناگون در محیط کشت می‌دهد.

موجودات آزمایشگاهی که کمتر استفاده می‌شوند، امکاناتی را برای بررسی‌های بی‌نظیر یا ویژگی‌های خارجی سلول‌ها و برای مطالعه ویژگی‌های استاندارد سلول‌هایی که در یک مدل مفید در حیوان بخصوصی انباشته شده‌اند، فراهم می‌کند. برای مثال، انتهاهای کروموزوم‌ها، (**تلومرها**)، به طور گسترده‌ای در بیشتر سلول‌ها کاهش می‌یابند. سلول‌های انسانی به طور نمونه شامل ۹۲ تلومر (دو انتهای هر کروموزوم) می‌باشند. برعکس، بعضی از آغازیان دارای کروموزوم‌های غیرمعمولی تکه‌تکه شده بوده و میلیون‌ها تلومر در هر سلول دارند. مزیت به دست آمده از ویژگی‌های بی‌نظیر این موجود آزمایشگاهی منتخب، منجر به کشفیات زیادی در مورد ساختار تلومر شده است.

نتیجه‌بخش‌ترین مطالعات زیستی از شیوه‌های مختلفی استفاده می‌کنند

ما پنج دیدگاه مختلف را برای مسائل زیستی مورد بحث قرار دادیم: زیست‌شناسی سلول، بیوشیمی و بیوفیزیک، ژنتیک، ژنومیک، و زیست‌شناسی تکاملی. هر کدام از آنها انواع آزمایشات مربوط به خود را دارا بوده و بسیاری از مسائل زیستی، بیشتر از یک دیدگاه را برای رسیدن به یک فهم رضایت‌بخشی از مکانیسم احتیاج دارند. حالا ما بررسی خواهیم کرد که چگونه برای مطالعه این دیدگاهها در فرآیند تقسیم سلول آزمایش‌های گوناگونی مورد استفاده قرار گرفتند.

تقسیم سلول توسط بعضی از اولین کاربران میکروسکوپ، بررسی و کشف گردید. اخیراً انواعی از میکروسکوپ‌ها، شامل میکروسکوپ هم‌کانون و میکروسکوپ الکترونی و تصویربرداری

تنزل زمانی[1] (فصل ۹)، برای مشخص کردن مراحل چرخهٔ سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. بیشتر پدیده‌های زیست‌شناختی با این نوع مشاهده (یعنی با میکروسکوپ) شروع می‌شود، سپس قسمت‌هایی که باید آزمایش شوند دست کاری می‌گردند. آنتی بادی‌ها بر ضد پروتئین‌هایی که نقش‌های مهم در تقسیم سلولی داشته و یا پروتئین‌هایی که در عملکرد این پروتئین‌ها مداخله می‌کنند، ساخته شده‌اند. پروتئین‌های کلیدی با پروتئین‌های فلورسنت ادغام شده و بنابراین (پروتئین فلورسنت سبز ژله ماهی (GFP) اولین پروتئین برای این منظور بود) پروتئین‌های کلیدی در سلول‌های زنده می‌توانستند تعقیب شوند. و همچنین سئوالاتی در مورد این که چه وقت و کجا پروتئین‌های کلیدی عمل می‌کنند می‌توانستند با این روش‌ها بررسی شده و عملکردشان ارزیابی شود.

ماشین تقسیم سلولی، مانند دوک میتوزی و سایر کمپلکس‌های پروتئینی، با کاربرد علوم بیوشیمی و بیوفیزیک، تخلیص و آنالیز شدند. هر پروتئین برای یافتن این‌که چگونه این پروتئین قسمتی از یک کمپلکس پروتئین‌های متصل به همدیگر به صورت یک ماشین است، تخلیص می‌شود و ساختار پروتئین‌های کلیدی با استفاده از کریستالوگرافی اشعهٔ X و سایر روش‌ها تعیین گردید (فصل ۳). قبلاً فعالیت‌های ناشناختهٔ آنزیمی در استخراج مثلاً بوسیلهٔ اندازه‌گیری اتصال گروه‌های فسفات به پروتئین‌های تنظیمی تقسیم سلول به وسیلهٔ کیناز ارزیابی شده بودند. سپس کینازهای مناسب می‌توانستند تخلیص شوند.

کشف یک پروتئین جدید در کمپلکسی از پروتئین‌ها که در تقسیم سلول لازم است آن را یک عامل خوب می‌سازد که پروتئین عمل مهمی را انجام می‌دهد. ژنتیک می‌تواند برای تشخیص جهش یافته‌هایی که جدیداً در پروتئین یافت شده‌اند، استفاده شود. اگر تقسیم سلول در یک موجود زنده وقتی که پروتئین کار نمی‌کند ناتوان باشد، شما نقش پروتئین جدید را درک می‌کنید. ژنتیک همچنین راهی برای تعیین ژن‌های قبلاً ناشناخته می‌باشد و این قبیل غربال‌گری‌های پروتئین‌ها می‌توانند (خصوصاً در باکتری‌ها و مخمرها، همچنین در بیشتر موجودات آزمایشگاهی پیچیده) برای جستجوی تمام ژن‌هایی که برای تقسیم سلول مورد نیاز می‌باشند، انجام شوند. پروتئین‌های جدیداً کشف شده می‌توانند در یک تصویر کلی از مکانیسم‌های تشکیلات تقسیم سلول مشارکت داده شوند.

ژنومیک مسیر دیگری را برای جستجوی اجزاء ماشین دستگاه تقسیم سلولی آماده می‌نماید. از اینرو اغلب صحیح است که mRNA و پروتئین‌ها فقط وقتی که آنها مورد نیاز می‌باشند، تولید شوند. کاربرد ریزآرایه‌ها برای جستجوی تمامی ژن‌هایی که بیان آنها در چرخهٔ سلولی تغییر می‌کند، یک جنبهٔ توانمند برای تشخیص کاندیداهایی برای تنظیم کننده‌های تقسیم سلول می‌باشد.

با داشتن ژن‌هایی جدیداً شناخته شده که برای تقسیم سلول نیاز می‌باشند، بایستی دریافت چگونه محصولات پروتئینی این ژن‌ها کار می‌کنند. صرفاً شناخت یک مادهٔ پروتئینی برای دانستن مکانیسم کافی نمی‌باشد. بنابراین مراجعه به جنبه‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی برای انجام کارهای زیست‌شناسی مولکولی و زیست‌شناسی سلولی در بررسی موقعیت و حرکات پروتئین ضروری می‌باشد.

سرانجام، تقسیم سلول در یک خلأ رخ نمی‌دهد بلکه در متن چرخهٔ زندگی موجود اتفاق می‌دهد. برای ارزیابی کامل از نحوهٔ تنظیم عملکرد تقسیم سلول، از علم زیست‌شناسی تکوینی برای بررسی زمان و مکان تقسیم سلولی استفاده می‌شود. در این آزمایشات زمان و مکان تقسیم سلول در طول تکوین موجود بررسی و سپس پیام‌هایی که تقسیم سلولی را تحریک یا مهار می‌کنند مطالعه شدند. خطاهای موجود در کنترل تکوینی تقسیم سلول توسط مطالعه جهش یافته‌ها آشکار می‌گردد که در غیر این صورت این خطاها، می‌توانند باعث شوند که اندام‌ها و بافت‌ها در اندازه‌ای نادرست ایجاد شده و یا سرطان ایجاد شود.

انواع دیدگاههایی که برای تقسیم سلول در نظر گرفته می‌شوند می‌توانند برای تعدادی از رویدادهای زیستی دیگر مانند چگونگی تشکیل و عملکرد عضلات یا عملکرد مغز بکار گرفته شوند.

۱-۵ چشم‌انداز تکامل ژنومی

مطالعات جامع ژن‌ها و پروتئین‌های تعدادی از موجودات یک مدرک فوق‌العاده از تاریخ زندگی به ما می‌دهد. طبیعت آزمایشگاهی است که آزمایشات را برای میلیاردها سال جهت داده است و همان بهترین ژنوم‌های ایجاد شده الان با ما هستند. ما با یوکاریوت‌های دیگر در هزاران پروتئین خاص، صدها دستگاه ماکرومولکولی و بیشتر اندامک‌هایمان مشترک می‌باشیم، که همه به عنوان نتیجه‌ای از تاریخ تکاملی مشترک ما می‌باشد. بررسی‌های جدید در زیست‌شناسی مولکولی سلول حاصل از ژنومیک به درک بیشتر از دستگاه‌های مولکولی بزرگ که در طول میلیاردها سال از تجمع ژنتیک و انتخاب تکاملی برای کارآمدترین طرح‌های دقیق، منتج

1-Time lapse imaging

می‌شود. به خاطر پیرایش متناوب RNA، تعداد پروتئین‌ها بیشتر از ژن‌ها می‌باشند، و عملکردهای تعدادی از این پروتئین‌های گوناگون و تجمعات پروتئینی هنوز کشف نشده‌اند. از اینرو با در دسترس داشتن یک شرح کامل‌تر از سلول‌ها، ما برای بررسی کامل‌تر و پویایی سیستم‌های زنده آماده خواهیم شد.

پروتئین‌های متابولیک، رمز ژنتیکی و ساختار اندامک‌ها تقریباً جامع و همگانی می‌باشند

حتی موجوداتی که به طور غیرقابل قبولی متفاوت به نظر می‌رسند در تعدادی از ویژگی‌های بیوشیمیایی مشترک می‌باشند. برای مثال، آنزیم‌ها که تجزیه قندها و تعدادی از واکنش‌های سادهٔ دیگر را در سلول‌ها کاتالیز می‌کنند، در بیشتر موجودات زنده ساختارها و مکانیسم‌های مشابهی را دارا می‌باشند. رمز ژنتیک که به کمک آن توالی‌های نوکلئوتیدی mRNA توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین‌ها را تعیین می‌نمایند می‌توانند توسط یک سلول باکتریایی و یک سلول انسان، یکسان خوانده شوند. در نتیجهٔ طبیعت همگانی و جهانی رمز ژنتیکی، کارخانه‌های باکتریایی می‌توانند برای ساخت فاکتورهای رشد، انسولین، فاکتورهای منعقد کننده و سایر پروتئین‌های انسانی با کاربردهای درمانی طراحی شوند. شباهت‌های بیوشیمیایی در میان موجودات همچنین به اندامک‌های یافت شده در سلول‌های یوکاریوتی توسعه یافته است. ساختارهای اساسی و عملکردهای این اجزای تحت سلولی در تمامی یوکاریوت‌ها به طور وسیعی محافظت شده‌اند.

آنالیز کامپیوتری اطلاعات توالی DNA، برای شماری از گونه‌های باکتریایی و چندین یوکاریوت قابل دسترسی می‌باشند که می‌توانند موقعیت و مکان ژن‌های به رمز درآورندهٔ پروتئین را در درون ژنوم‌ها پیدا کنند. باکمک رمز ژنتیکی، توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین‌ها می‌توانند از توالی‌های متشابه ژنی تعیین شوند. اگر چه با تصوّری ساده، پیدا کردن ژنها و استنباط توالی‌های اسیدآمینه پروتئین‌های به رمز درآمده آنها در عمل به علت پیچیده بودن برخی از نواحی DNA مشکل است (فصل ۵) اما با وجود مشکلات و ابهامات اتفاقی در توالی‌های آنالیز شدهٔ DNA، مقایسه ژنوم تعداد زیادی از موجودات، شواهد حیرت انگیزی را در خصوص حفظ مکانیسم‌های مولکولی که موجودات را ساخته و تغییر می‌دهند فراهم می‌کند و همچنین تاریخ تکاملی انواع گونه‌ها را آشکار می‌سازد.

عقاید و افکار داروین دربارهٔ تکامل تمامی حیوانات مربوط به ژن‌ها می‌باشد

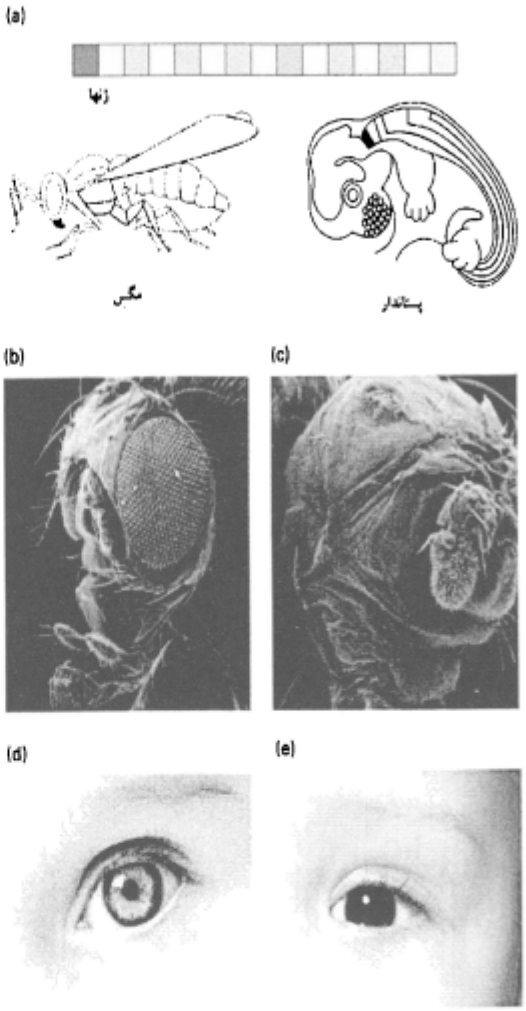
داروین نمی‌دانست که ژن‌ها وجود دارند یا چگونه آنها تغییر می‌کنند، اما ما می‌دانیم: ماشین همانندسازی DNA یک خطا ایجاد می‌کند، یا یک عامل جهش‌زا (موتاژن) باعث جابجایی یک نوکلئوتید با دیگری یا شکست در یک کروموزوم می‌شود. بعضی از تغییرات در ژنوم بی‌خطر هستند، بعضی به طور ملایم مضر هستند، بعضی مهلک و کشنده می‌باشند، تعدادی هم بسیار سودمند و مفید می‌باشند. جهش‌ها می‌توانند توالی ژن‌ها را به گونه‌ای تغییر دهند که فعالیت پروتئین‌های تولیدشده توسط آنها تغییر یابد و یا زمان، مکان و مقدار پروتئین تولیدشده در بدن را تغییر دهند.

تغییرات توالی ژن‌هایی که مضر می‌باشند از جمعیتی از موجودات از دست خواهد رفت زیرا افراد متأثر نمی‌توانند زنده باقی بمانند. این فرآیند انتخاب به درستی همان چیزی است که داروین بدون شناخت از مکانیسم‌های که باعث می‌شود موجودات اختلاف داشته باشند، توصیف کرد. بنابراین انتخاب تمام موجودات برای بقاء در حقیقت انتخاب ژن‌ها یا درست‌تر، مجموعه‌ای از ژن‌ها می‌باشد. جمعیتی از موجودات اغلب تفاوت‌هایی دارند که همگی این تفاوتها تقریباً به طور برابر برای شرایط خوب سازگار می‌باشند. وقتی که شرایط تغییر می‌کند (مثلاً یک آتش‌سوزی، یک سیل، فقدان تأمین غذای ترجیحی، تغییر هوا) موجودات گوناگونی که قادر به وفق دادن خود می‌باشند زنده خواهند ماند و آنهایی که سازگاری به شرایط جدید را از دست داده‌اند شروع به محوشدن و مُردن می‌کنند. در این مسیر، ترکیب ژنتیکی جمعیت موجودات هر بار می‌تواند تغییر کند.

تعدادی از ژن‌های کنترل کنندهٔ رشد به طور قابل ملاحظه‌ای در انسان‌ها و سایر حیوانات شبیه به هم می‌باشند

درباره انسانها، ما شاید یک دید تا اندازه‌ای مبالغه‌آمیز و تحت تأثیر واقع شده از وضعیت‌مان در سلسلهٔ حیوانات داشته باشیم. این غرور در داشتن مغز پیشرفته ما قرار دارد و این به همراه قابلیت‌های ذهنی ممکن است چشم ما را به توانایی‌های قابل ملاحظه از گونه‌های دیگر ببندد. دریانوردی پرندگان، سیستم ارتعاشی خفاش‌ها، مقصدیابی ماهی آزاد، یا پرواز یک مگس، مثال‌هایی از توانایی‌های شگفت‌انگیز در موجودات دیگر می‌باشد.

با وجود این که تمامی شواهد برای پیوستگی تکاملی در سطوح سلولی و فیزیولوژیکی وجود دارد، ولی هر یک از ژن‌های تنظیم کنندهٔ



◀ شکل ۲۶ـ۱ ژن‌های مشابه محافظت شده، در طول تکامل فرآیندهای تکوینی متعددی را در حیوانات گوناگون تنظیم می‌کنند. تخمین زده شده است که حشرات و پستانداران یک نیای مشترک در حدود نیم میلیارد سال قبل داشته‌اند. آنها ژن‌های مشترکی دارند که فرآیندهای مشابهی را مانند رشد قلب، چشم‌ها و سازمان‌یابی طرح بدن کنترل می‌کنند، که بر حفظ و نگهداری عملکرد آنها از زمان‌های دیرین دلالت می‌نماید. (a) ژن‌های Hox به صورت دسته‌هایی روی کروموزوم‌های بیشتر یا تمامی حیوانات یافت شده است. ژن‌های Hox پروتئین‌های مربوطه‌ای را که فعالیت سایر ژن‌ها را کنترل می‌نمایند به رمز در می‌آورند. ژن‌های Hox رشد و نمو قسمت‌های مختلف در طول محور سر به دم تعدادی از حیوانات که توسط رنگ‌های مشابه مشخص شده را اداره می‌کنند. هر ژن در یک ناحیهٔ ویژه در طولِ محور سر به دم فعال شده (به طور رونویسی) و رشد بافت‌ها را در آنجا کنترل می‌نماید. برای مثال، در موش‌ها، ژن‌های Hox مسئول اشکال مجزای مهره‌داران می‌باشند. جهش‌هایی که ژن‌های Hox را در مگس‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهند باعث می‌شوند که قسمت‌هایی از بدن در مکان‌هایی به اشتباه تشکیل شوند مثلاً پاها به جای شاخه‌ها، روی سر تشکیل شوند. این ژن‌ها یک نشانی سر به دم را فراهم می‌نمایند که برای هدایت و راهنمایی تشکیل ساختارهای صحیح در مکان‌های صحیح بکار می‌برند. (b) توسعه و رشد چشم‌های مرکب درشت در مگس‌های میوه ژنی را که eyeless (برای فنوتیپ‌های جهش یافته نامگذاری شده است) نامیده می‌شود نیاز دارد. (c) مگس‌هایی با کمبود ژن‌های eyeless، فاقد چشم می‌باشند. (d) چشم‌های انسان طبیعی به ژن انسانی، که Pax6 نامیده می‌شود و معادل ژن eyeless است نیاز دارد. (e) اشخاص فاقد عملکرد مناسب Pax6، بیماری ژنتیکی aniridia را دارند که در آن عنبیه در چشم‌ها وجود ندارد. Pax6 و eyeless پروتئین‌های بسیار مرتبطی را که فعالیت‌های سایر ژن‌ها را تنظیم می‌کنند به رمز در می‌آورند که از یک ژن اجدادی به ارث رسیده‌اند.

تکوین حیوان مورد نظر، به شدت از یک شاخه به شاخهٔ بعدی متفاوت خواهد بود. بعد از همه، حشرات و توتیای دریایی و پستانداران همین قدر متفاوت به نظر می‌رسند. ما باید تعدادی پروتئین بی‌نظیر برای ایجاد یک مغزی مانند مغز خودمان داشته باشیم. ثمرات تحقیق در ژنتیک تکوینی در طول دو دههٔ گذشته آشکار می‌نماید که حشرات و پستانداران که یک نیای مشترک دارند در حدود نیم میلیارد سال قبل، چندین ژن تنظیم کنندهٔ رشد و نمو متشابه را داشته‌اند (شکل ۲۶ـ۱). به راستی به نظر می‌رسد تعداد بسیاری از این ژن‌ها در تعدادی و شاید تمامی حیوانات محافظت شده‌اند. به طور قابل ملاحظه‌ای، عملکردهای پروتئین‌های به رمز درآمده به وسیلهٔ این ژن‌ها هم نیز حفاظت شده‌اند. برای مثال، بعضی پروتئین‌های مورد نیاز نمو چشم در حشرات به تنظیم کننده‌های نمو چشم در پستانداران مرتبط می‌باشند. همین طور برای نمو قلب، روده، شش‌ها، و مویرگ‌ها و برای جایگیری قسمت‌های بدن در طول سر به دم و پشت به جلو محورهای بدن نیز، پروتئین‌ها مرتبط می‌باشند (فصل ۱۹).

این قضیه نمی‌گوید که تمام ژن‌ها یا پروتئین ها به طور تکاملی محافظت شده‌اند. چندین مثال قابل توجه از پروتئین‌هایی که در تصور ما کاملاً غایب و ناپیدا هستند در بعضی دودمان‌های حیوانات وجود دارند. گیاهان، به طور شگفت‌انگیزی، تفاوت زیادی از حیوانات بعد از یک میلیارد سال جدایی در تکاملشان، نشان می‌دهند. با این حال بعضی پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA بین نخود و گاوها فقط در دو اسیدآمینه از ۱۰۲ اسیدآمینه تفاوت دارند!

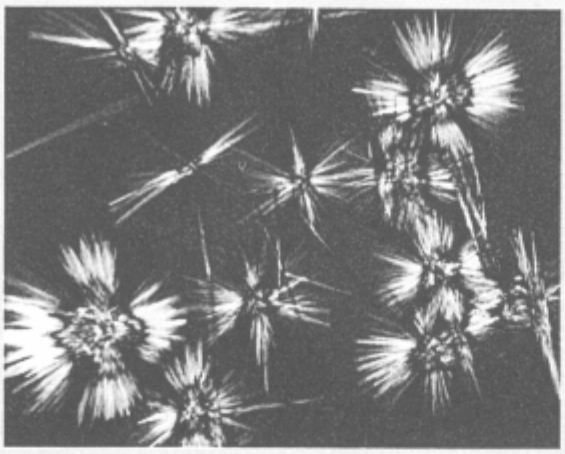
علم پزشکی انسانی توسط تحقیق بر روی سایر موجودات زندهٔ دیگر ایجاد شده است

جهش‌هایی که در بعضی از ژن‌ها در طول دوره‌ای از زندگی رخ می‌دهند به تشکیل سرطان‌های مختلف انسانی کمک می‌کنند. اشکال طبیعی، «نوع وحشی» ژن‌های ایجاد کنندهٔ سرطان عموماً پروتئین‌هایی را به رمز در می‌آورند که به تنظیم تکثیر یا مرگ سلول کمک می‌کنند (فصل ۲۱). ما همچنین می‌توانیم کپی‌های جهش یافته‌ای از ژن‌های دخیل در دیستروفی عضلانی، کم خونی سلول داسی شکل، و بیماری هانتینگتون را از والدین به ارث ببریم. خوشبختانه همچنین می‌توانیم ژن‌هایی که ما را به طور قدرتمندی در برابر بیماری‌ها مقاوم می‌سازد به ارث ببریم. تعدادی قابل ملاحظه‌ای از ژن‌های همراه با سرطان و دیگر بیماری‌های انسانی در فاصلهٔ تکاملی حیوانات ارائه می‌شوند. برای مثال، مطالعه‌ای اخیراً نشان می‌دهد که بیش از سه چهارم ژن‌های بیماری شناخته شدهٔ انسان مربوط به ژن‌هایی می‌باشند که در مگس میوه دروزوفیلا یافت شده‌اند.

با تشخیص ژن‌های بیماریزای انسان در موجودات دیگر، مطالعات آزمایشگاهی در موجودات آزمایشگاهی باید به پیشرفت‌های سریعی در فهم عملکردهای طبیعی ژن‌های مربوط به بیماری منجر شود. برعکس حالت‌های بیماری خودمان یک آنالیز ژنتیکی با فنوتیپ‌های خوب مطالعه شده را تشکیل می‌دهند. تمام این ژن‌هایی که با ایجاد یک بیماری معین ممکن است گروهی از پروتئین‌های عملکردی را به رمز در آورند تغییر یافته‌اند. بنابراین سرنخ‌هایی دربارهٔ عملکردهای طبیعی پروتئین‌ها در بیماری‌های انسانی به دست می‌آیند و می‌توانند برای هدایت و راهنمایی مکانیسم‌ها در تحقیقات بکار روند. برای مثال، ژن‌های شناخته شده مربوط به سرطان در انسان‌ها، می‌توانند در بررسی رشد و نمو طبیعی مدل‌های حیوانی مورد استفاده قرار گیرند و دیدگاههایی جدیدی را درباره عملکردهای این پروتئین‌ها در اختیار ما قرار دهند.

فصل ۲

ساختارهای شیمیایی



تصویر میکروسکوپ نور پلاریزه از کریستال‌های ATP که هیدرولیز آن منبع اولیه انرژی در راه‌اندازی اغلب واکنش‌های سلولی است.

رئوس مطالب

۲-۱- پیوندهای کوالان و میانکنش‌های غیرکوالان

۲-۲- واحدهای ساختاری شیمیایی سلول‌ها

۲-۳- تعادل شیمیایی

۲-۴- انرژتیک بیوشیمیایی

حیات سلول وابسته به واکنش‌ها و میانکنش‌های شیمیایی است که بطور بدیعی با یکدیگر، از نظر زمانی، فضایی و تحت تاثیر دستورات ژنتیک و محیط اطراف سلول هماهنگ می‌شوند. با فهم این میانکنش‌ها و واکنش‌ها در سطح مولکولی، ما می‌توانیم شروع به پاسخ دادن به سوالاتی درباره حیات سلول نمائیم؛ چگونه یک سلول مواد غذایی ضروری و اطلاعات را از محیط پیرامونش به دست می‌آورد؟ چگونه سلول انرژی ذخیره شده در مواد غذایی را به کار (حرکت، ساخت ترکیبات ضروری) تبدیل می‌کند؟ چگونه سلول مواد غذایی را به ساختارهای لازم برای زنده ماندنش (دیواره سلولی، هسته، اسیدهای نوکلئیک ، پروتئین‌ها، اسکلت سلولی) تبدیل می‌کند؟ چگونه سلول خود را به سلول دیگر جهت تشکیل بافت، متصل می‌کند؟ چگونه سلول‌ها با همدیگر ارتباط برقرار می‌کنند تا یک ارگانیسم پیچیده و کارا از لحاظ عملکردی بتواند ایجاد شود و رشد نماید؟ یکی از اهداف زیست‌شناسی مولکولی سلول، فراهم نمودن پاسخ‌هایی برای این نوع سوال‌ها و سوال‌های دیگری درباره ساختار و عملکرد سلول‌ها و ارگانیسم‌ها از دید مشخصات فردی مولکول‌ها و یون‌ها می‌باشد.

به عنوان مثال خواص یک مولکول همچون آب، تکامل، ساختار و عملکرد سلول را کنترل می‌کند. شما بدون توجه به ویژگی‌های آب که شیمی حیات را کنترل می‌نماید، نمی‌توانید زیست‌شناسی را درک کنید. حیات، اول از محیط‌های آبی شروع شد. آب ۷۰ تا ۸۰ درصد از وزن اغلب سلول‌ها را تشکیل می‌دهد و فراوان‌ترین مولکول در سیستم‌های زیستی است. در درون این محیط آبکی مولکول‌های کوچک و یون‌ها وجود دارند که ۷ درصد از وزن ماده زنده را تشکیل می‌دهند. این مواد به صورت ماکرومولکول‌های بزرگتر مجتمع می‌شوند و اجتماعات ماکرومولکولی، ماشین و معماری سلولی و همچنین باقیمانده وزن موجود زنده را تشکیل می‌دهند. این مولکول‌های کوچک شامل اسیدهای آمینه (واحدهای ساختاری پروتئین‌ها)، نوکلئوتیدها (واحدهای ساختاری DNA و RNA)، لیپیدها (واحدهای ساختاری غشاهای زیستی) و قندها (واحدهای ساختاری نشاسته و سلولز) می‌باشند.

اغلب مولکول‌های زیستی (همچون قندها) به راحتی در آب حل می‌شوند؛ این مولکول‌ها آبدوست (**هیدروفیلیک**)[1] نامیده می‌شوند. بقیه (همچون کلسترول) که مواد روغنی و شبه چربی می‌باشند، از آب گریزانند؛ به این مولکول‌ها آبگریز (**هیدروفوب**)[2] گفته می‌شود. سایر مولکول‌ها (همچون فسفولیپیدها) دوحالتی هستند، یعنی هم نواحی آبدوست و هم آبگریز دارند؛ این مولکول‌ها **آمفی پاتیک**[3] نامیده می‌شوند. فسفولیپیدها در ساخت غشاهای انعطاف‌پذیر استفاده می‌گردند. این غشاها مرزهای دیوار مانند سلول‌ها و اندامک‌های داخل آنها را تشکیل می‌دهند. علمکرد روان سلول‌ها، بافت‌ها و موجودات زنده از کوچک تا بزرگ وابسته به همه این

1- Hydrophilic 2- Hydrophobic

3- Amphipathic

مولکول‌ها است. در حقیقت شیمی پروتون ساده (H^+) می‌تواند برای زنده ماندن یک سلول انسانی که حاوی یک DNA خیلی بزرگ و حمل کننده اطلاعات ژنتیکی است (جرم مولکول DNA در کروموزوم ۱ انسان $۸/۶\times۱۰^{۱۰}$ برابر یک پروتون است!) مهم باشد. گرچه انواع زیادی از مولکول‌های زیستی در مسیرهای زیاد و پیچیده‌ای میانکنش و واکنش می‌دهند تا سلول‌های موجودات زنده دارای عملکرد را ایجاد نمایند، اما خوشبختانه، شمار نسبتاً کمی از اصول شیمیایی برای درک فرآیندهای سلولی در سطح مولکولی، مورد نیاز است (شکل ۱-۲). در این فصل این اصول کلیدی راکه بعضی از آنها را شما به خوبی می‌شناسید، مرور می‌کنیم. ما با پیوندهای کووالان شروع می‌کنیم. پیوندهای کووالان اتم‌ها را به هم مرتبط می‌سازد تا یک مولکول تشکیل شود و نیروهای غیرکووالان گروههایی از اتم‌ها را به صورت ساختارهای عملکردی در درون و بین مولکول‌ها پایدار می‌سازند. سپس مشخصات کلیدی واحدهای ساختاری شیمیایی ماکرومولکول‌ها و تجمعات ماکرمولکولی را مورد توجه قرار می‌دهیم. بعد از مرور جنبه‌هایی از تعادل شیمیایی که اغلب مربوط به سیستم‌های زیست شناختی است، این فصل را با مبانی انرژتیک بیوشیمیایی خاتمه می‌دهیم، این قسمت شامل نقش اساسی ATP (آدنوزین‌تری فسفات) در گرفتن و انتقال انرژی در متابولیسم سلولی است.

۲-۱ پیوندهای کوالان و میانکنش‌های غیرکووالان

نیروهای جاذبه قوی و ضعیف بین اتم‌ها همچون "چسبی" است که آنها را کنار همدیگر در مولکول‌ها نگه می‌دارد و اجازه میانکنش بین مولکول‌های زیستی مختلف را می‌دهد. نیروهای قوی با به اشتراک گذاشتن یک جفت (تک پیوند) یا چندین جفت الکترون (پیوند دوگانه، سه گانه و غیره) **پیوندهای کووالان** را تشکیل می‌دهند. نیروهای جاذبه ضعیف یعنی **میانکنش‌های غیرکووالان** در تعیین خواص و عملکرد مولکول‌های زیستی، همچون پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها، اهمیت دارند. ما اول پیوندهای کووالان را مرور می‌کنیم و سپس چهار نوع از میانکنش غیرکووالان اصلی یعنی پیوندهای یونی، پیوندهای هیدروژنی، میانکنش‌های واندروالس و اثر آبگریزی را مورد بحث قرار می‌دهیم.

ساختار الکترونی یک اتم تعداد و موقعیت پیوندهای کووالانی آن اتم را تعیین می‌کند

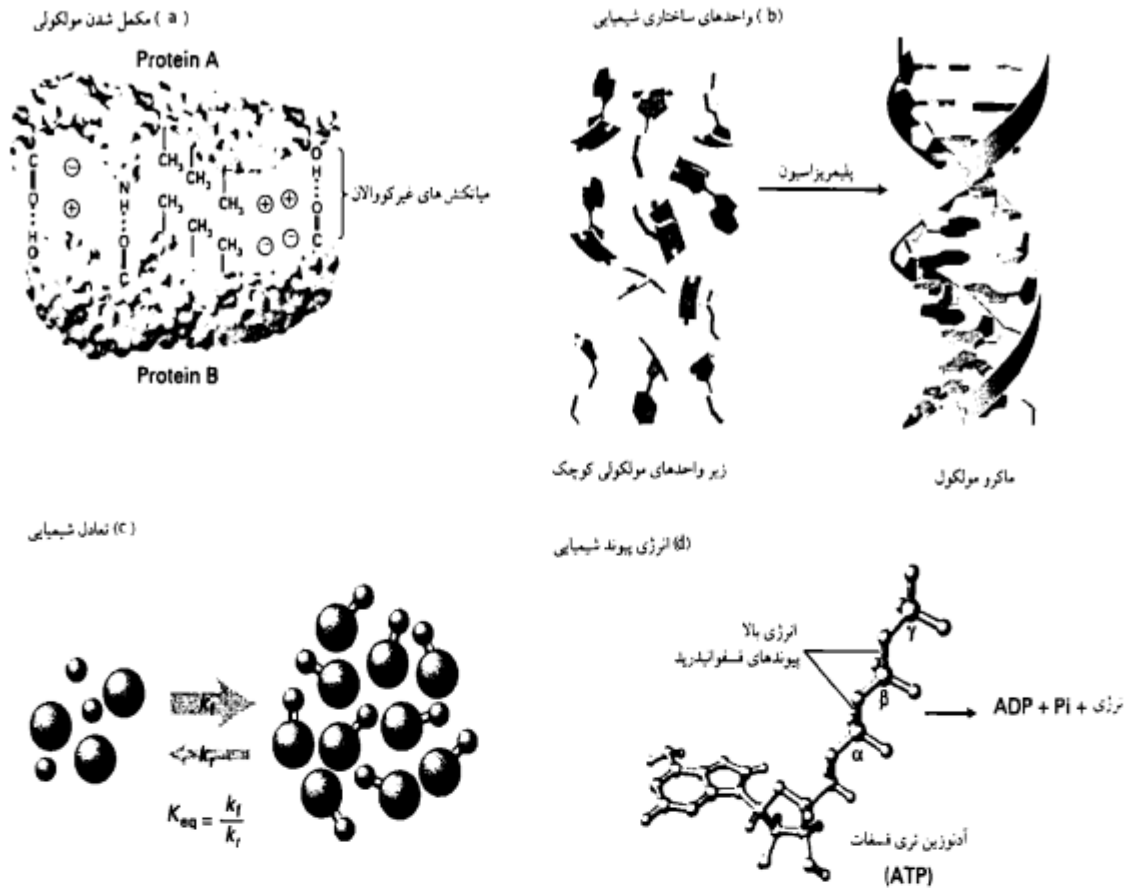
هیدروژن، اکسیژن، کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد عناصری هستند که در مولکول‌های زیستی به مقدار زیادی یافت می‌شوند. این اتم‌ها با اینکه بطور مجزا کم هستند، با استفاده از الکترون‌ها در اوربیتال‌های بیرونی‌شان، به راحتی می‌توانند پیوند کووالان ایجاد می‌کنند. به عنوان یک قاعده، هر اتم تعداد مشخصی پیوند کووالان با سایر اتم‌ها ایجاد می‌کند. این پیوندها دارای موقعیت مشخصی می‌باشد که بوسیله اندازه اتم، توزیع الکترون‌های اطراف هسته و تعداد الکترون‌های به اشتراک گذاشته شده، تعیین می‌شوند. در بعضی موارد (همچون کربن) تعداد پیوندهای پایدار تشکیل شده، ثابت می‌باشد و در بعضی موارد (همچون گوگرد) تعداد متفاوتی پیوند کووالان ممکن است ایجاد شود.

همه واحدهای ساختاری زیستی، اطراف اتم کربن سازمان می‌یابند. اتم کربن چهار پیوند کووالان با سه یا چهار اتم دیگر ایجاد می‌کند. همانطوریکه در شکل ۲-۳a برای فرمالدئید نشان داده شده است، کربن می‌تواند با سه اتم دیگر پیوند ایجاد نماید. همه این پیوندها در یک صفحه قرار می‌گیرند. اتم کربن دو پیوند با دو اتم و یک پیوند دوگانه (دو جفت الکترون به اشتراک گذاشته شده) با اتم سوم ایجاد می‌نماید. هنگامیکه مانعی وجود نداشته باشد، اتم‌هایی که به وسیله یک پیوند به هم متصل شده‌اند می‌توانند به طور آزادانه حول محور پیوند بچرخند، اما اگر آنها توسط دو پیوند به هم متصل باشند، دیگر نمی‌توانند چرخش نمایند. این سختی ساختاری حاصل از پیوندهای دوگانه اهمیت زیادی در شکل و انعطاف پذیری مولکول‌های زیستی همچون فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دارد.

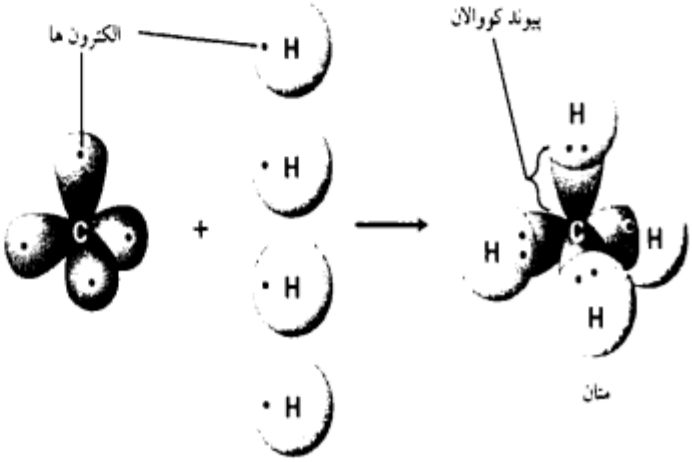
کربن می‌تواند به چهار اتم نیز متصل شود. همانطوریکه در مورد مولکول متان (CH_4) در شکل دیده می‌شود، هنگامیکه کربن به چهار اتم دیگر متصل می‌گردد، زاویه بین دو پیوند $۱۰۹/۵^\circ$ می‌شود و موقعیت اتم‌های متصل شونده، رئوس یک چهار وجهی را تشکیل می‌دهد (شکل ۲-۳b). این وضعیت ساختاری، ساختار اغلب مولکول‌های زیستی را تعیین می‌کند. به اتم کربنی (یا هر اتم دیگر) که به چهار اتم یا گروه متفاوت در یک ساختار غیرصفحه‌ای متصل شده باشد، نامتقارن گفته می‌شود. جهت‌گیری چهاروجهی پیوندهای تشکیل شده توسط **اتم کربن نامتقارن**[1]، به دو طریق متفاوت در فضای سه بعدی آرایش یافته و باعث تشکیل مولکول‌هایی می‌شود که تصویر آینه‌ای یکدیگر می‌باشند. این خصوصیت را **کایرالیته**[2] (از لغت یونانی کایر[3] به معنی دست) می‌نامند (شکل ۲-۴). چنین

1- Asgm metric carbon atom

2- Chirality 3- Cheir



▲ **شکل ۱-۲ (شکل رنگی) شیمی حیات: چهار نکته کلیدی.** (a) مکمل شدن مولکولی در قلب همه میانکنش‌های مولکول‌های زیستی قرار می‌گیرد، مثلا وقتی دو پروتئین با شکل و خواص شیمیایی مکمل، کنار هم قرار می‌گیرند کمپلکس محکمی را تشکیل می‌دهند. (b) مولکول‌های کوچک به عنوان واحدهای ساختاری ساختارهای بزرگ عمل می‌نمایند، به عنوان مثال برای تشکیل مولکول DNA که حامل اطلاعات است، چهار واحد ساختاری کوچک نوکلئوتیدی به همدیگر متصل شده و زنجیره‌های (پلیمرهای) طویلی را تشکیل می‌دهند، سپس این زنجیره‌ها به دور هم پیچ خورده و مارپیچ دوتایی را تشکیل می‌دهند. (c) واکنش‌های شیمیایی برگشت‌پذیر بوده و توزیع مواد شیمیایی بین مواد شروع کننده (سمت چپ) و محصولات واکنش‌ها (راست) وابسته به ثابت‌های سرعت رفت (K_F، بالای پیکان) و برگشت (K_r، پائین پیکان) واکنش هاست. نسبت اینها، Keq، معیار یا ارزشی از مقدار نسبی محصولات و واکنشگرهای در حال تعادل با هم، فراهم می‌سازد. (d) در اغلب موارد، منبع انرژی واکنش‌های شیمیایی در سلول‌ها، هیدرولیز مولکول ATP است. این انرژی هنگامی آزاد می‌شود که پیوند بین فسفات‌های β و γ در مولکول ATP (قرمز) با افزودن مولکول آب شکسته و ADP و Pi تشکیل شود.

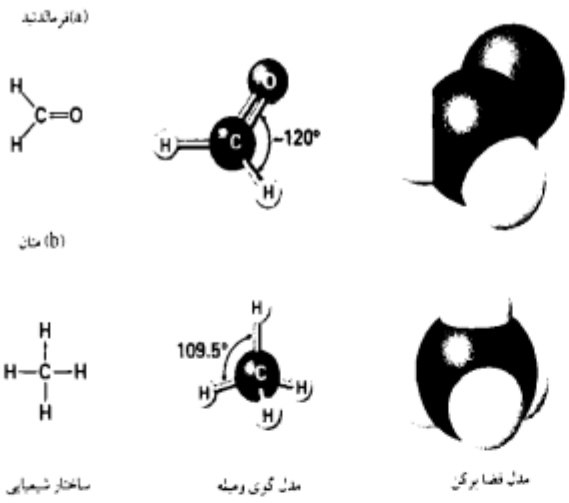


◀ **شکل ۲-۲ پیوندهای کووالان با به اشتراک گذاشتن الکترون‌ها تشکیل می‌گردند.** پیوندهای کووالان، نیروهای قوی هستند که اتم‌ها را در داخل مولکول‌ها کنار یکدیگر نگه می‌دارند و هنگامی تشکیل می‌شوند که اتمها الکترون‌های موجود در بیرونی‌ترین اربیتال‌هایشان را به اشتراک می‌گذارند. هر اتم پیوندهای کووالانی با موقعیت و تعداد مشخص تشکیل می‌دهد.

مولکولهایی ایزومرهای نوری یا **ایزومرهای فضایی**[۱] نامیده می‌شوند. بیشتر مولکول‌هایی که در سلول‌ها وجود دارند، حداقل یک کربن نامتقارن دارند. این کربن، اغلب کربن **کایرال** نامیده می‌شود. ایزومرهای فضایی متفاوت یک مولکول، معمولاً فعالیت زیستی کاملا متفاوت از همدیگر دارند زیرا در این مولکول‌ها آرایش اتم‌ها در درون ساختارشان متفاوت است و باعث می‌شود این مولکول‌ها با توانایی متفاوت از همدیگر، با سایر مولکول‌ها میانکنش داده و یا وارد واکنش شیمیایی می‌شوند.

بعضی از داروها حاوی مخلوطی از ایزومرهای فضایی از یک مولکول کوچک می‌باشند که فقط یک ایزومر فضایی فعالیت زیستی دلخواه را دارد. استفاده از ایزومر فضایی خالص به جای مخلوط آنها، باعث ایجاد داروی قوی، و با اثرات جانبی کمتر خواهد شد. به عنوان مثال یک ایزومر از داروی ضدالتهاب سیتالوپرام[۲] (سلکسا[۳]) ۱۷۰ مرتبه قوی‌تر از بقیه ایزومرهایش است. بعضی ایزومرهای فضایی فعالیت خیلی متفاوتی دارند. دراوون[۴] یک تسکین دهنده درد است. با این وجود ایزومر فضایی آن یعنی نووارد[۵] (از نظر املایی بالعکس دراوون) فرونشاننده سرفه است. یک ایزومر فضایی از کتامین، بیهوش کننده بوده در حالیکه ایزومر دیگری از آن توهمزا است.

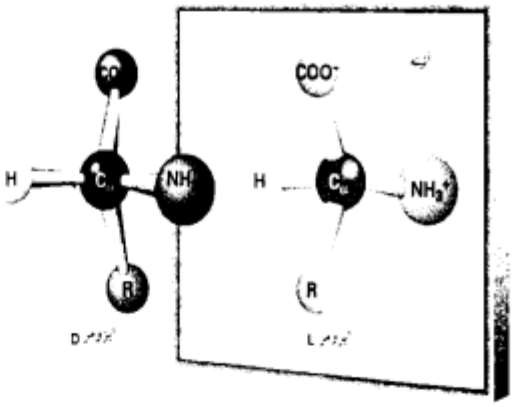
تعداد پیوندهای کووالانی که توسط سایر اتم‌ها تشکیل می‌شود، در جدول ۱-۲ نشان داده شده است. اتم هیدروژن فقط یک پیوند کووالان ایجاد می‌کند. اتم اکسیژن معمولاً فقط دو تا پیوند کووالان ایجاد می‌کند. اکسیژن دوجفت الکترون دیگر دارد که در میانکنش‌های غیرکووالان می‌توانند شرکت کنند. گوگرد دو پیوند کووالان در سولفیدهیدروژن (H_2S) ایجاد می‌کند اما می‌تواند شش پیوند کووالان مثلا در اسیدسولفوریک (H_2SO_4) و مشتقات سولفات آن ایجاد نماید. نیتروژن و فسفر هر کدام ۵ الکترون برای به اشتراک گذاشتن دارند. در آمونیاک (NH_3)، اتم نیتروژن سه پیوند کووالان ایجاد می‌کند؛ جفت الکترون‌های اطراف اتم نیتروژن در پیوند کووالان شرکت نمی‌کند بلکه می‌توانند در میانکنش‌های غیرکووالان شرکت نمایند. در یون آمونیوم (NH_4^+)، نیتروژن چهار پیوند کووالان با آرایش چهاروجهی ایجاد می‌کند. فسفر معمولاً پنج پیوند کووالان ایجاد می‌کند، مثلا در اسید فسفریک(H_3PO_4) و مشتقات فسفات آن ستون فقرات اسیدهای نوکلئیک را تشکیل می‌دهد. گروههای فسفاتی که بطور کووالان به پروتئین‌ها متصل می‌شوند، نقش تنظیم فعالیت اغلب پروتئین‌ها را برعهده دارند و مولکول اصلی در انرژتیک



▲ **شکل ۳-۲ موقعیت پیوندها هنگامیکه کربن به صورت کووالان به سه یا چهار اتم دیگر متصل می‌باشد.**(a) یک اتم کربن می‌تواند به سه اتم متصل گردد، مثلاً در فرمالدئید (CH_2O). الکترون‌های پیوندی کربن در دو تک پیوند و یک پیوند دوگانه شرکت می‌کنند و در یک صفحه قرار می‌گیرند. اتم‌هایی که توسط یک پیوند به هم متصل می‌شوند حول محور پیوند می‌توانند چرخش نمایند. ولی اتم‌های اتصال یافته با پیوند دوگانه نمی‌توانند بچرخند. (b) وقتی اتم کربن چهار پیوند جداگانه ایجاد می‌کند، (همانطوریکه درباره متان (CH_4) دیده می‌شود) اتم‌های متصل شده به آن (در این مورد همه Hها) در فضا به صورت یک چهاروجهی جهت‌گیری می‌نمایند. شکل نشان داده شده در سمت چپ به وضوح ترکیب اتمی مولکول و الگوی پیوند را نشان می‌دهد. مدل گوی و میله نشان داده شده در وسط شکل، آرایش اتم‌ها و پیوندها را نشان می‌دهد. اما قطر گوی‌ها نشان دهنده اتم‌ها و الکترون‌های غیرپیوندی است که به صورت مصنوعی کوچکتر از طول پیوندها می‌باشد. اندازه ابرهای الکترونی در مدل فضاپرکن در سمت راست، صحت زیادی در نشان دادن ساختار سه بعدی دارد.

سلولی یعنی ATP، حاوی سه گروه فسفات است (قسمت ۴-۲ را ملاحظه کنید). خلاصه‌ای از اتصالات کووالان و گروههای عملکردی (قسمت‌هایی از مولکول‌ها که خواص شیمیایی متفاوتی دارند) در جدول ۲-۲ دیده می‌شود.

1- Stereoisomers
2- Citalopram
3- Celexa
4- Dravon
5- Novard



▲ **شکل ۴-۲ ایزومرهای فضایی.** اغلب مولکول‌ها در سلول‌ها حداقل دارای یک اتم کربن نامتقارن هستند. جهت‌گیری چهاروجهی پیوندها که بوسیله اتم کربن نامتقارن ایجاد می‌شود، می‌تواند در فضای سه بعدی به دو طریق آرایش یابد و تولید تصویرهای آینه‌ای یا ایزومرهای فضایی را نمایند. شکل نشان داده شده در اینجا یک اسیدآمینه را با کربن نامتقارن مرکزی و چهار گروه متصل شده نشان می‌دهد که شامل گروه R بوده و در قسمت ۲-۲ توضیح داده شده است. اسیدهای آمینه به دو صورت تصویر آینه‌ای L و D وجود دارند. با وجود اینکه خصوصیات شیمیایی این دو ایزومر فضایی یکسان است، اما فعالیت زیست‌شناختی آنها از هم متفاوت است. فقط اسیدآمینه L در پروتئین‌ها یافت می‌شود.

جدول ۱-۲ خصوصیات پیوندی اتم‌هایی که فراوانی زیادی در مولکول‌های زیستی دارند.

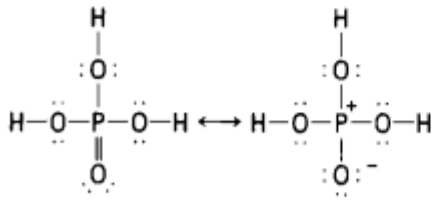
اتم ها والکترونهای بیرونی	تعداد پیوندهای کوالان	هندسه پیوند
H	1	H
:Ö:	2	O
:S̈:	2, 4, or 6	S
:N̈:	3 or 4	N
:P̈:	5	P
:C̈:	4	C

الکترون‌ها بطور مساوی یا نامساوی در پیوندهای کووالان شرکت می‌نمایند

مقدار توانایی یک اتم در جذب الکترون **الکترونگاتیویته**[1] آن اتم نامیده می‌شود. در پیوندهایی، همچون C-C و C-H که بین دو اتم با الکترونگاتیویته یکسان یا مشابه ایجاد می‌شود، الکترون‌های پیوندی به صورت مساوی بین دو اتم به اشتراک گذاشته شده‌اند. چنین پیوندهایی، **غیرقطبی**[2] نامیده می‌شوند. در بیشتر مولکول‌ها، اتم‌های پیوند یافته، الکترونگاتیویته‌های متفاوتی داشته و باعث اشتراک نامساوی الکترون‌ها شده و پیوند بین آنها **قطبی**[3] نامیده می‌شود.

در پیوند قطبی یک انتها بطور جزئی بار منفی (δ^-) و انتهای دیگر بطور جزئی بار مثبت (δ^+) دارد. به عنوان مثال در پیوند O-H، اکسیژن با الکترونگاتیویته بیشتر نسبت به هیدروژن باعث می‌شود، الکترون‌ها زمان بیشتری را اطراف اکسیژن در مقایسه با هیدروژن صرف نمایند. پس پیوند O-H دارای یک دوقطبی الکتریکی با بار مثبت و به همان اندازه بار منفی می‌باشد. مقدار بار σ^- بر روی اتم اکسیژن دوقطبی O-H تقریباً ۲۵ درصد یک الکترون است و به مقدار δ^+ بار مثبت نیز بر روی اتم هیدروژن قرار دارد. به دلیل اینکه پیوندهای O-H در اطراف اکسیژن، بطور کامل در جهت مخالف هم نیستند، مولکول‌های آب (H_2O) دوقطبی‌هایی هستند (شکل ۵-۲) که می‌توانند میانکنش غیرکووالان الکترواستاتیک با یکدیگر و با سایر مولکول‌ها برقرار نمایند. این میانکنش‌ها تقریباً در میانکنش‌های بیوشیمیایی نقش اساسی را بازی کرده و بنابراین در زیست‌شناسی مولکولی، میانکنش‌هایی اساسی هستند.

قطبیت پیوند دوگانه O=P در H_3PO_4 باعث ایجاد **هیبرید رزونانس**[4] می‌شود، که ساختاری بین دو فرم نشان داده شده در زیر است. در اینجا جفت الکترون‌ها توسط نقطه‌هایی نشان داده شده‌اند.



در هیبرید رزونانسی که در سمت راست می‌باشد الکترون‌های پیوند دوگانه در اطراف اتم O جمع شده، بار منفی به آن می‌دهند و الکترون

1- Electronegativity
2- Nonpolar
3- Polar
4- Resonance hybrid

FUNCTIONAL GROUPS

—OH Hydroxyl (alcohol)	O ‖ —C—R Acyl (triacylglycerol)	O ‖ —C— Carbonyl (ketone)	O ‖ —C—O⁻ Carboxyl (carboxylic acid)
—SH Sulfhydryl (Thiol)	—NH_2 or —$\overset{+}{N}H_3$ Amino (amines)	O ‖ —O—P—O⁻ | O⁻ Phosphate (phosphorylated molecule)	O O ‖ ‖ —O—P—O—P— | | O⁻ O⁻ Pyrophosphate (diphosphate)

LINKAGES

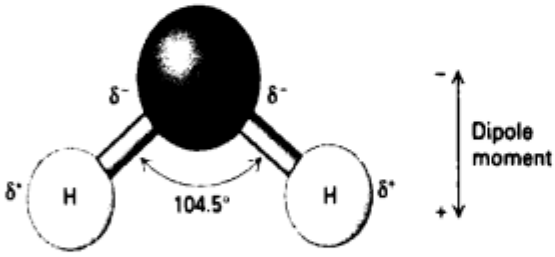
O ‖ —C—O—C— Ester	—C—O—C— Ether	O ‖ —N—C— Amide

با ترک اتم P باعث ایجاد بار مثبت می‌شوند. این بارها در میانکنش‌های غیرکووالان مهم هستند.

پیوندهای کووالان بسیار قوی‌تر و پایدارتر از میانکنش‌های غیرکووالان می‌باشند

پیوندهای کووالان بسیار پایدارند (به عنوان پیوند قوی هستند) زیرا انرژی مورد نیاز جهت شکستن آنها بسیار بیشتر از انرژی حرارتی موجود در دمای اتاق (۲۵°C) یا دمای بدن (۳۷°C) است. به عنوان مثال انرژی حرارتی در ۲۵°C تقریباً ۰/۶ کیلوکالری بر مول (kcal/mol) است و این در حالی است که انرژی لازم برای شکستن یک پیوند بین کربن - کربن (C-C) در اتاق حدود ۱۴۰ برابر بیشتر از آن است (شکل ۶-۲). بنابراین در دمای اتاق (۲۵°C) کمتر از ۱ در 10^{12} مولکول اتان به یک جفت مولکول CH_3. شکسته می‌شود که هر کدام حاوی یک الکترون جفت نشده و غیرپیوندی است (و رادیکال نامیده می‌شود).

پیوندهای یگانه کووالان مولکول‌های زیستی انرژی مشابه با انرژی پیوند C-C در اتاق را دارند. اما در پیوندهای دوگانه چون هر الکترون بیشتری به اشتراک گذاشته می‌شود، انرژی بیشتری برای شکستن آنها نسبت به پیوندهای یگانه مورد نیاز است. به عنوان مثال برای شکستن پیوند یگانه در C-O ، ۸۴ کیلوکالری بر مول انرژی لازم



▲ **شکل ۵-۲ طبیعت دوقطبی مولکول آب.** نشانه δ بار جزئی (بار ضعیف‌تر از بار یک الکترون یا پروتون) را نشان می‌دهد. بدلیل اختلاف در الکترونگاتیویته O و H هر یک از پیوندهای H-O در آب، یک دو قطبی است. اندازه و جهت هر پیوند، فاصله و مقدار جدایی بار یا **ممان دو قطبی**[1] مولکول را تعیین می‌کند.

است. اما برای شکستن پیوند دوگانه در C=O ، ۱۷۰ کیلوکالری بر مول نیاز است. پیوندهای دوگانه رایج در مولکول‌های زیستی

1- Dipole Moment

C=O، C=N، C=C و P=O هستند.

انرژی مورد نیاز جهت شکستن میانکنش‌های غیرکووالان فقط ۵-۱ کیلوکالری بر مول بوده و بسیار کمتر از انرژی پیوندهای کووالان است. (شکل ۶-۲ را ملاحظه کنید). در حقیقت میانکنش‌های غیرکووالان به قدری ضعیف هستند که بطور مداوم در دمای اتاق تشکیل می‌شوند و می‌شکنند. گرچه این میانکنش‌ها ضعیف‌اند و بصورت گذرا در دماهای فیزیولوژیک (۳۷°C-۲۵) وجود دارند اما همانطوریکه خواهیم دید، مقدار زیادی از این پیوندها با همدیگر می‌توانند تجمعات اختصاصی و پایداری را بین قسمت‌های مختلف یک مولکول بزرگ یا بین ماکرومولکول‌ها ایجاد کنند. در زیر ما چهار نوع میانکنش غیرکووالان اصلی را مرور می‌کنیم و سپس نقش آنها را در اتصال مولکول‌های زیستی به یکدیگر و سایر مولکول‌ها مورد توجه قرار می‌دهیم.

میانکنش‌های یونی نیروهای جاذبه‌ای هستند که بین یونهای با بار مخالف ایجاد می‌شود.

میانکنش‌های یونی[1] حاصل جاذبه بین یون با بار مثبت (**کاتیون**[2]) و یون با بار منفی (**آنیون**[3]) می‌باشد. به عنوان مثال در کلرید سدیم، الکترون به اشتراک گذاشته شده بوسیله اتم سدیم بطور کامل به اتم کلر منتقل می‌شود. (شکل ۷a-۲). برخلاف پیوندهای کووالان، میانکنش‌های یونی جهت‌گیری ثابت یا خاصی ندارند زیرا زمینه الکترواستاتیک یک یون (و تمایل آن برای بار مخالف) در همه جهت به یک شکل است. در NaCl جامد، بسیاری از یون‌ها بطور محکمی کنار هم قرار می‌گیرند، الگوی قرارگیری طوری است که امکان قرار گرفتن یون‌ها با بار مخالف در کنار یکدیگر را می‌دهد و بنابراین یک آرایش فوق‌العاده منظم کریستالی را ایجاد می‌کند (کریستال‌های نمک) (شکل ۷b-۲).

هنگامیکه نمک‌های جامد در آب حل می‌شوند، یون‌ها از همدیگر جدا می‌شوند و بوسیله میانکنش با مولکول‌های آب پایدار می‌شوند. در محلول آبی، یون‌های ساده و مهم از نظر زیستی همچون Na^+، K^-، Ca^{2+}، Mg^{2+} و Cl^-، آبپوشی (هیدراته) شده و توسط لایه‌ای پایدار از مولکول‌های آب پوشیده می‌شوند. در اینجا یون در مرکز قرار می‌گیرد و مولکول‌های آب از طرف قسمت باردار خود که بار مخالف با یون دارد با یون میانکنش می‌دهند. (شکل ۷c-۲). اغلب ترکیبات یونی به راحتی در آب حل می‌شوند چون انرژی آبپوشی شدن (انرژی آزاد شده هنگام اتصال محکم مولکول‌های آب) بسیار بیشتر از انرژی شبکه‌ای است که ساختار کریستال را پایدار می‌کند. همه یا قسمتی از **لایه آبپوشی**[4] بایستی هنگام میانکنش مستقیم با پروتئین‌ها، از روی یون‌ها برداشته شود. به‌عنوان مثال، هنگامیکه یون‌ها در هدایت عصبی، از منافذ پروتئینی در غشا سلولی عبور می‌کنند، آب آبپوشی کننده خود را از دست می‌دهند.

قدرت نسبی میانکنش بین دو یون، A^- و C^+ وابسته به غلظت سایر یون‌ها در محلول است. غلظت بالای یون‌های دیگر (همچون Na^+ و Cl^-) شانس میانکنش یونی A^- و C^+ را با سایر یون‌ها افزایش می‌دهد و بنابراین انرژی مورد نیاز برای شکستن میانکنش بین A^- و C^+ را کاهش می‌دهد. پس در نتیجه با افزایش غلظت نمک‌ها مثل NaCl در محلول مولکول‌های زیستی، میانکنش‌های یونی که مولکول‌های زیستی را کنار هم نگه می‌دارند، می‌توانند تضعیف شده و یا حتی بشکنند.

پیوندهای هیدروژنی قابلیت حلالیت مولکول‌های بدون بار را تعیین می‌کنند

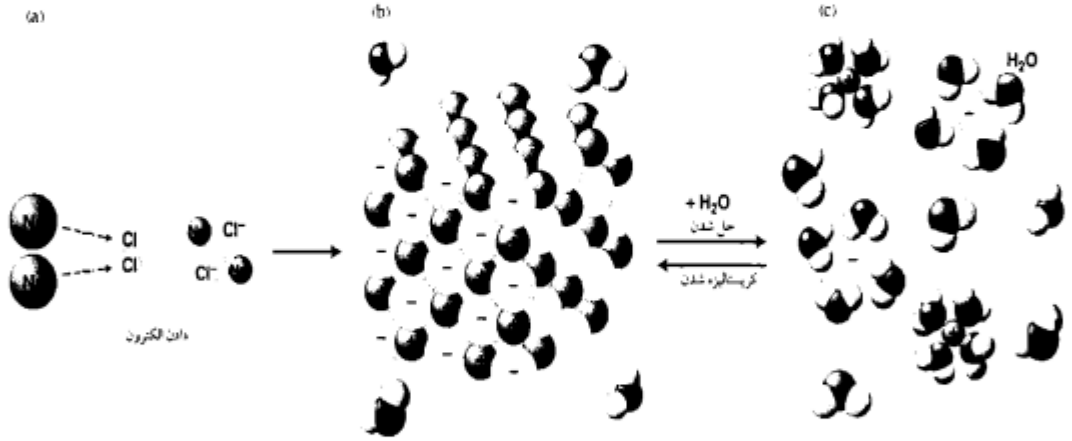
یک **پیوند هیدروژنی** میانکنش بین اتم هیدروژن با بار جزئی مثبت در مولکول دوقطبی (مثل آب) و الکترون‌های جفت نشده از اتم دیگر در همان مولکول (**درون مولکولی**[5]) و یا با مولکول دیگر (**بین مولکولی**[6]) است. معمولاً اتم هیدروژن یک پیوند کووالان با یک اتم دیگر می‌دهد، با این حال اتم هیدروژنی که بطور کووالان به اتم دهنده[7] D الکترونگاتیو متصل شده است ممکن است میانکنش ضعیفی (پیوند هیدروژنی) با یک اتم گیرنده[8] A ایجاد نماید. این اتم گیرنده بایستی یک جفت الکترون غیرپیوندی قابل دسترس برای میانکنش داشته باشد.

$$D^{\delta-}-H^{\delta+} + :A^{\delta-} \rightleftharpoons \underbrace{D^{\delta-}-H^{\delta+}\cdots\cdots:A^{\delta-}}_{\text{پیوند هیدروژنی}}$$

طول پیوند کووالان D-H کمی بلندتر از زمانی خواهد بود که پیوند هیدروژنی وجود ندارد زیرا اتم گیرنده، هیدروژن را از اتم دهنده می‌کشد. خصوصیت مهم پیوندهای هیدروژنی، جهت‌دار بودن آنهاست. در پیوندهای هیدروژنی قوی، اتم دهنده، اتم هیدروژن و اتم گیرنده، همه در یک خط راست قرار می‌گیرند. پیوندهای هیدروژنی غیرخطی ضعیف‌تر از پیوندهای خطی هستند. با این حال مقدار

1- Ionic Interactions
2- Cation
3- Anion
4- Hydration shell
5- Interamolecular
6- Interamolecular
7- Donor
8- Acceptor

▲ **شکل ۶-۲- انرژی‌های نسبی پیوندهای کووالان و میانکنش‌های غیرکووالان.** انرژی پیوند، انرژی لازم جهت شکستن پیوند است. پیوندهای کووالان تک پیوندی (C-C) و دوگانه کربن (C=C) ۱۰ به توان یک یا دو بار قویتر از میانکنش‌های غیرکووالان هستند. بعضی مواقع انرژی میانکنش‌های غیرکووالان بیشتر از انرژی حرارتی محیط در دمای اتاق (۲۵°C) می‌باشد. اغلب فرآیندهای زیستی با انرژی حاصل از هیدرولیز پیوند فسفواتیدریدی در ATP جفت می‌شوند.



▲ **شکل ۷-۲ میانکنش‌های الکترواستاتیک یون‌های با بار مخالف نمک (NaCl) در کریستال‌ها و در محلول آبی.** (a) در کریستال نمک، اتم‌های سدیم با از دست دادن یک الکترون، به یونهایی با بار مثبت تبدیل می‌شوند (Na^+)، در حالیکه اتم‌های کلر با گرفتن یک الکترون، صاحب بار منفی (Cl^-) می‌شوند. (b) در فرم جامد، ترکیبات یونی آرایش منظم مرتب یا کریستال‌ها را تشکیل می‌دهند که در آن یون‌ها بطور محکم کنار هم قرار گرفته و بارهای مثبت و منفی همدیگر را خنثی می‌کنند. (c) هنگامی که کریستال‌ها در آب حل می‌شوند، یون‌ها جدا شده و بارهای مخالف نزدیک هم تاثیر چندانی بر هم ندارند و توسط میانکنش با آب قطبی پایدار می‌شوند. مولکول‌های آب و یون‌ها با میانکنش‌های الکترواستاتیک کنار هم قرار می‌گیرند. این میانکنش‌ها بین بارهای روی یون‌ها و بارهای جزئی موجود روی اتم اکسیژن و هیدروژن مولکول آب، ایجاد می‌شوند. در محلول‌های آبی، همه یون‌ها توسط یک لایه آبپوشی از مولکول‌های آب احاطه می‌شوند.

▲ **شکل ۸-۲ پیوند هیدروژنی آب با خود و با سایر ترکیبات.** هر جفت از الکترون‌های بیرونی غیرپیوندی در اتم اکسیژن یا نیتروژن می‌توانند در پیوند هیدروژنی، یک اتم هیدروژن بگیرند. گروههای هیدروکسیل و آمین هم می‌توانند پیوند هیدروژنی با آب تشکیل دهند. (a) در آب مایع هر مولکول آب پیوند هیدروژن گذرایی با مولکول‌های آب دیگر برقرار می‌کنند، این عامل یک شبکه پویا از مولکولهایی که پیوند هیدروژنی تشکیل داده‌اند، ایجاد می‌کند. (b) آب همچنین می‌تواند پیوند هیدروژنی با الکل‌ها و آمین‌ها برقرار نموده و بدین ترتیب باعث حلالیت بالای این ترکیبات شود. (c) گروههای پپتید و استری که در مولکول‌های زیستی وجود دارند، معمولاً در پیوند هیدروژنی با مولکول آب و با گروههای قطبی در مولکول‌های دیگر شرکت می‌جویند.

زیادی از پیوندهای هیدروژنی غیرخطی به پایدارسازی ساختار سه بعدی اغلب پروتئین‌ها کمک می‌کنند.

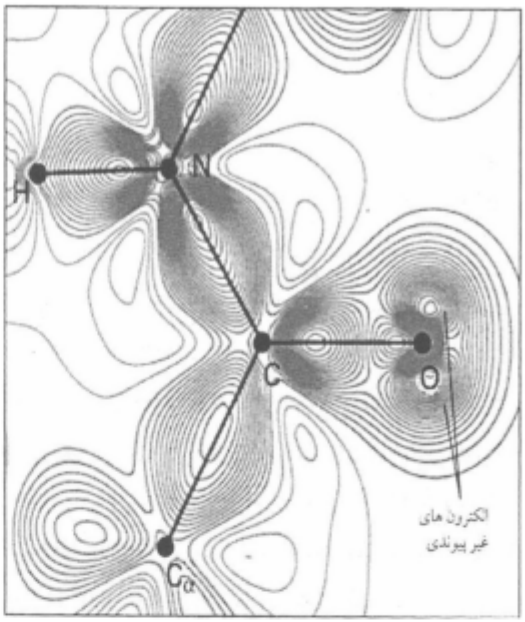
پیوندهای هیدروژنی هم طولانی‌تر و هم ضعیف‌تر از پیوندهای کووالان بین همان اتم‌ها است. به عنوان مثال در آب، فاصله بین هسته اتم‌های هیدروژن و اکسیژن در مولکولهایی که با پیوند هیدروژنی به هم متصل شده‌اند، حدود ۰/۲۷ نانومتر یعنی حدود دو برابر طویل‌تر از پیوندهای کووالان O-H در درون یک مولکول آب، می‌باشد (شکل ۸a-۲). گرچه قدرت پیوند هیدروژنی بین مولکول‌های آب (تقریباً ۵ کیلوکالری بر مول) خیلی ضعیف‌تر از پیوند کووالان O-H (۱۱۰ کیلوکالری بر مول) می‌باشد اما قدرت آن بیشتر از سایر پیوندهای هیدروژنی در مولکول‌های زیستی (۲-۱ کیلوکالری بر مول) است. وسعت پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب، عامل بسیاری از خصوصیات کلیدی این ترکیب شامل نقاط ذوب و جوش بالای غیرمعمول و توانایی آن برای میانکنش (مثلا حل کردن) با اغلب مولکول‌های دیگر به شمار می‌رود.

حلالیت مواد بدون بار در محیط آبی، اغلب وابسته به توانایی آنها برای تشکیل پیوند هیدروژنی با آب می‌باشد. به عنوان مثال گروه هیدروکسیل (-OH) در الکل (XCH_2OH) و گروه آمینو ($-NH_2$) در آمین‌ها (XCH_2NH_2) می‌توانند پیوندهای هیدروژنی متعددی با آب ایجاد کرده و این مولکول‌ها را قادر سازد تا با غلظت‌های بالایی در آب حل شوند (شکل ۸b-۲). در کل مولکول‌هایی با پیوندهای قطبی که به راحتی پیوند هیدروژنی با آب ایجاد می‌کنند و همچنین مولکول‌های باردار و یونی که با مولکول دوقطبی آب میانکنش می‌دهند، به راحتی در آب حل می‌شوند. این مواد آبدوست هستند. علاوه بر گروههای آمینو و هیدروکسی، اغلب مولکول‌های زیستی حاوی گروههای پپتیدی و استری هستند که از طریق الکترون‌های غیرپیوندی اکسیژن‌های کربونیل خود، با آب پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند (شکل ۸c-۲). همانطوریکه در شکل ۹-۲ نشان داده شده است، کریستالوگرافی اشعه x به همراه آنالیز محاسباتی، امکان ترسیم صحیح توزیع الکترون‌های بیرونی غیرپیوندی اتم‌ها و همچنین الکترون‌های پیوندهای کووالان را می‌دهد.

میانکنش‌های واندروالس به وسیله دوقطبی‌های لحظه‌ای ایجاد می‌شوند

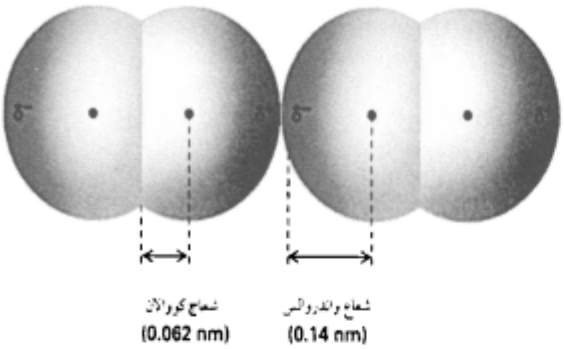
هنگامیکه دو اتم کنار یکدیگر قرار می‌گیرند نیروی جاذبه ضعیف و غیراختصاصی ایجاد می‌کنند که **میانکنش واندروالس**[1] نامیده می‌شود. این میانکنش‌های غیراختصاصی ناشی از نوسانات تصادفی لحظه‌ای در توزیع الکترون‌های یک اتم است که باعث ایجاد توزیع نامتعادل الکترون‌ها می‌شود. اگر دو اتم که بین‌شان پیوند کووالان وجود ندارد، به اندازه کافی به هم نزدیک شوند، الکترون‌های یک اتم الکترون‌های اتم دیگر را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این اثر یک دوقطبی لحظه‌ای در اتم دوم ایجاد کرده و دو تا دو قطبی همدیگر را به طور ضعیفی جذب خواهند کرد (شکل ۱۰-۲). بطور مشابه، یک پیوند کووالان قطبی در یک مولکول، یک دو قطبی با جهت مخالف را در مولکول دیگر جذب خواهد کرد.

1- Vander waals interaction



▲ **شکل ۹-۲ (شکل رنگی) توزیع الکترون‌های پیوندی و غیرپیوندی بیرونی در گروه پپتید.** پیوند پپتیدی را در پروتئین کرامبین نشان می‌دهد که دو تا اسیدآمینه را در داخل پروتئین به هم متصل می‌کنند. خطوط قرمز (منفی) و آبی (مثبت) کانتور[1] بارها را نشان می‌دهند که بوسیله روش‌های محاسباتی و کریستالوگرافی اشعه x تعیین شده‌اند. تعداد زیاد خطوط در کانتور، بار بیشتر را نشان می‌دهد. چگالی بالای خطوط کانتور قرمز بین اتم‌ها، نشان دهنده پیوندهای کووالان (جفت الکترون‌های به اشتراک گذاشته شده) است. دو سری از خطوط کانتور قرمز از اکسیژن نشأت می‌گیرند و بر روی پیوند کووالان (خط سیاه) نمی‌افتند، این خطوط نشان دهنده جفت الکترون‌های غیرپیوندی بوده و برای شرکت در پیوند هیدروژنی در دسترس هستند. چگالی بالای خطوط کانتور آبی نزدیک هیدروژن (H) متصل شده به نیتروژن (N) بار مثبت جزئی را نشان می‌دهد و حاکی از این است که این H می‌تواند به عنوان دهنده در پیوند هیدروژنی باشد.

میانکنش‌های واندروالس شامل دوقطبی‌های لحظه‌ای القا شده یا دوقطبی‌های دائمی بوده و در همه مولکول‌های قطبی و غیرقطبی ایجاد می‌شوند. میانکنش‌های واندروالس عامل‌پیوستگی مولکول‌های غیرقطبی همچون هپتان ($CH-(CH_2)_5-CH_3$) است که نمی‌توانند با مولکول‌های دیگر میانکنش‌های هیدروژنی یا یونی برقرار نمایند. قدرت میانکنش‌های واندروالس با افزایش فاصله به سرعت کاهش می‌یابد. بنابراین این میانکنش تنها زمانی که اتم‌ها کاملاً به هم نزدیک هستند، می‌توانند ایجاد شوند. با این حال اگر اتم‌ها بیش از حد به هم نزدیک شوند، بوسیله بارهای منفی الکترون هایشان همدیگر را دفع می‌کنند. هنگامیکه جاذبه بین اتم‌ها با دافعه



▲ **شکل ۱۰-۲ (شکل رنگی) دو مولکول اکسیژن در تماس واندروالس.** در این مدل رنگ قرمز، بار منفی و رنگ آبی، بار مثبت را نشان می‌دهد. دوقطبی‌های لحظه‌ای در ابرهای الکترونی همه اتم‌ها، باعث ایجاد نیروهای جاذبه ضعیف می‌شوند. این نیروها **میانکنش‌های واندروالس** نامیده می‌شوند. هر اتمی شعاع واندروالس خاصی دارد که در آن شعاع، میانکنش‌های واندروالس با سایر اتم‌ها مطلوب می‌باشد. به دلیل وجود الکترون‌های لایه بیرونی در اتم‌ها که در پیوند کووالان شرکت نمی‌کنند، اتم‌ها وقتی بیش از حد به هم نزدیک می‌شوند، همدیگر را دفع می‌کنند. بنابراین شعاع واندروالس، اندازه ابر الکترونی اطراف اتم را نشان می‌دهد.

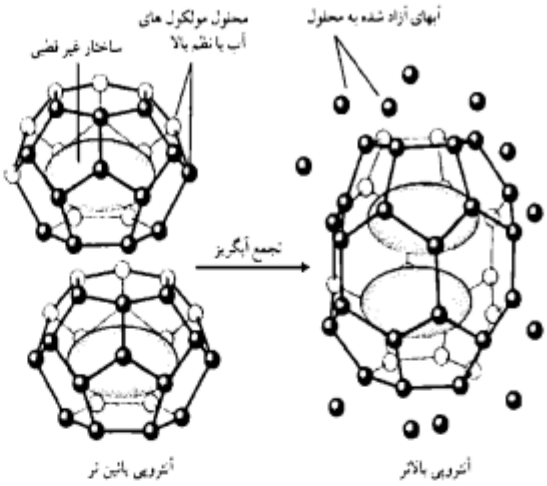
بین ابرهای الکترونی آنها کاملاً به تعادل رسید، گفته می‌شود اتم‌ها در تماس واندروالس هستند. قدرت میانکنش واندروالس حدود ۱ کیلوکالری بر مول است که ضعیف‌تر از پیوندهای هیدروژنی رایج بوده و فقط اندکی بالاتر از میانگین انرژی حرارتی مولکول‌ها در ۲۵°C است. بنابراین برای تحت تاثیر قرار دادن چشمگیر پایداری در تماس‌های بین مولکول یا درون مولکولی، چندین میانکنش واندروالس یا یک میانکنش واندروالس به همراه چند میانکنش غیرکووالان و یا هر دو مورد نیاز هستند.

اثر آبگریزی باعث می‌شود مولکول‌های غیرقطبی به همدیگر بچسبند

چون مولکول‌های غیرقطبی بار و ممان دوقطبی ندارند و یا آبپوشی نمی‌شوند، در آب نامحلول یا تقریباً نامحلول اند پس آنها آبگریز هستند. پیوندهای کووالان بین دو اتم کربن و بین اتم‌های هیدروژن و کربن، پیوندهای کووالان غیرقطبی در سیستم‌های زیستی می‌باشند.

---

۱ - کانتور به محدوده و کرانه اطلاق می‌شود. (مترجم)



▲ **شکل ۱۱-۲ تصویری از اثر آبگریزی.** محفظه‌های مولکول‌های آب که اطراف مولکول‌های غیرقطبی در محلول تشکیل می‌شوند، بسیار منظم‌تر از حالت مولکول‌های آب در داخل مایع [در داخل محلول بدون حضور مولکول‌های غیرقطبی] است. تجمع مولکول‌های غیرقطبی، تعداد مولکول‌های شرکت کننده در محفظه‌های خیلی منظم را کاهش داده و باعث افزایش آنتروپی می‌شود. بنابراین این حالت (سمت راست) از لحاظ انرژی بسیار مساعدتر از حالت غیرمجتمع (سمت چپ) است.

هیدروکربن‌ها[1] (مولکول‌هایی که فقط از کربن و هیدروژن ساخته شده‌اند) در آب نامحلول هستند. تری‌گلیسرول‌های (یا تری‌گلیسریدهای) بزرگ که چربی‌های جانوران و روغن‌های گیاهی را می‌سازند نیز در آب نامحلول اند و همانطور که بعدا خواهیم دید، قسمت زیادی از این مولکول‌ها در ساختارشان حاوی زنجیره‌های بلند هیدروکربن هستند. بعد از اینکه تری‌گلیسریدها در آب تکان داده شوند، فاز جداگانه‌ای را ایجاد می‌کنند. مثال آشنا، جدا شدن روغن از آب حاوی سرکه، در سس سالاد روغن و سرکه است.

مولکول‌های غیرقطبی یا قسمت‌های غیرقطبی مولکول‌ها تمایل دارند در آب و در نتیجه پدیده **اثر آبگریزی** با هم جمع شوند. چون مولکول‌های آب نمی‌توانند با مواد غیرقطبی پیوند هیدروژنی تشکیل دهند، تمایل دارند که محفظه‌های[2] نسبتاً سخت حاصل از پیوند هیدروژنی را اطراف مولکول‌های غیرقطبی ایجاد نمایند. این محفظه‌ها پنج وجهی یا شش وجهی هستند (شکل ۱۱-۲ سمت چپ). این حالت به دلیل کاهش بی‌نظمی (آنتروپی[3]) جمعیت مولکول‌های آب، از لحاظ انرژی نامساعد است (نقش آنتروپی در سیستم‌های شیمیایی در قسمت بعد توضیح داده شده است). اگر مولکول‌های غیرقطبی در محیط آبی با همدیگر از طریق سطوح آبگریز تجمع یابند، سطوح آبگریز در معرض آب کاهش می‌یابد (شکل ۱۱-۲ سمت راست). در نتیجه آب کمتری برای تشکیل محفظه‌ها در اطراف مولکول‌های غیرقطبی لازم بوده و آنتروپی این حالت (حالت مطلوبتر از لحاظ انرژی) نسبت به حالتی که مولکول‌های غیرقطبی تجمع نمی‌یابند، افزایش می‌یابد. پس آب مولکول‌های غیرقطبی را تحت فشار قرار می‌دهد تا بطور خودبخود تجمع یابند. برخلاف سایر حالت‌ها همچون پیوند هیدروژنی که نیروی جاذبه باعث ایجاد آن می‌شود، اثر آبگریز نتیجه اجتناب از یک حالت ناپایدار (محفظه‌های آبی زیاد اطراف هر مولکول غیرقطبی) می‌باشد.

مولکول‌های غیرقطبی بطور ضعیفی از طریق میانکنش‌های واندروالس نیز می‌توانند با هم تجمع یابند. نتیجه میانکنش‌های واندروالس و آبگریز این است که مولکول‌های غیرقطبی تمایل بسیار قدرتمندی برای میانکنش با همدیگر داشته و با آب میانکنش نمی‌دهند. پس می‌توان به سادگی گفت، **همجنس، همجنس را حل می‌کند**[4]. مولکول‌های قطبی در حلال‌های قطبی همچون آب و مولکول‌های غیرقطبی در حلال‌های غیرقطبی همچون هگزان حل می‌شوند.

مکمل شدن مولکولی که از طریق میانکنش‌های غیرکووالان تسهیل می‌شود، باعث اتصال محکم و اختصاصی مولکول‌های زیستی می‌شود

هم در درون و هم در بیرون سلول‌ها، یون‌ها و مولکول‌ها دائما با یکدیگر برخورد می‌کنند، هر قدر مقدار دو نوع مولکول در واحد حجم افزایش یابد (مثلا با افزایش غلظت‌شان)، احتمال برخورد آنها با همدیگر افزایش می‌یابد. هر گاه دو مولکول با همدیگر برخورد کنند، به احتمال زیاد به راحتی از کنار هم می‌گذرند، زیرا میانکنش‌های غیرکووالانی که در دمای فیزیولوژیک با هم ایجاد می‌کنند، ضعیف بوده و بصورت لحظه‌ای ایجاد می‌شوند. با این حال مولکول‌هایی که **مکمل شدن مولکولی**[5] را نشان می‌دهند، یک نوع تناسب قفل و کلید بین شکل، بار یا سایر خواص فیزیکی آنها وجود داشته و می‌توانند در محدوده کوچکی باعث تشکیل چندین میانکنش غیرکووالان شوند. هر گاه دو مولکول که اینچنین از لحاظ ساختاری مکمل هستند، با همدیگر برخورد کنند، به همدیگر متصل می‌شوند (می‌چسبند).

1- Hydrocarbons
2- Cages
3- Entropy
4- Like dissolves like
5- Molecular Complementarity

شکل ۱۲-۲ نشان می‌دهد، چگونه چند پیوند ضعیف مختلف می‌تواند دو پروتئین را به همدیگر متصل نماید. تقریباً هر آرایش دیگر از این گروه‌ها روی دو سطح، اجازه اتصال محکمی را به آنها نخواهد داد. اینچنین میانکنش‌های اختصاصی و چندگانه بین نواحی مکمل در درون پروتئین اجازه می‌دهد تا پروتئین به صورت ساختار سه بعدی‌اش درآید (فصل ۳) و همچنین باعث می‌شوند دو زنجیره DNA در مارپیچ دوگانه کنار هم قرار گیرند (فصل ۴). میانکنش‌های مشابهی باعث می‌شود که مولکول‌ها به صورت کمپلکس‌های چند مولکولی تجمع یابند. این امر منجر به تشکیل فیبرهای عضلانی، تجمعات چسب مانند بین سلول‌ها در بافت‌های خشک و تعداد زیادی ساختارهای سلولی دیگر می‌شود.

بسته به تعداد و قدرت میانکنش‌های غیرکووالان بین دو مولکول و محیط اطرافشان، اتصال آنها ممکن است محکم (قوی) یا شل (ضعیف) باشد و در نتیجه پیوندها می‌توانند ماندگار یا لحظه‌ای باشند. هر قدر تمایل[1] دو مولکول به هم بیشتر باشد، تناسب بین آنها بیشتر بوده و میانکنش‌های غیرکووالان بیشتری بین آنها شکل گرفته و آنها بطور محکم می‌توانند به هم متصل شوند. مقدار کمی تمایل با ثابت تجزیه K_d اندازه‌گیری می‌شود که ارزشمند بوده و بعداً توضیح داده می‌شود.

همانطوریکه در فصل ۳ توضیح خواهیم داد، تقریباً همه واکنش‌های شیمیایی که در سلول‌ها اتفاق می‌افتند به مشخصات اتصالی آنزیم‌ها بستگی دارند. این پروتئین‌ها هم با سرعت زیاد واکنش‌ها را کاتالیز می‌کنند و هم این عمل کاتالیز را با **ویژگی**[2] بالا انجام می‌دهند که انعکاسی از توانایی آنها برای اتصال محکم با یک یا چند مولکول محدود می‌باشد. ویژگی واکنش‌ها و میانکنش‌های بین مولکولی (که وابسته به مکمل شدن مولکولی است) برای اغلب فرآیندهای مهم حیات، لازم است.

نکات کلیدی بخش ۱-۲

پیوندهای کووالان ومیانکنش‌های غیرکووالان

■ پیوندهای کووالان، اتم‌های تشکیل‌دهنده یک مولکول را در آرایش ثابتی به هم متصل می‌کنند. این پیوندها حاوی جفت الکترون‌هایی هستند که بوسیله دو اتم به اشتراک گذاشته شده‌اند. آنها در سیستم‌های زیستی پایدارند چون برای شکستن آن‌ها انرژی نسبتاً بالایی (۲۰۰-۵۰ کیلوکالری) مورد نیاز است. این مقدار انرژی بسیار بالاتر از انرژی جنبشی حرارتی موجود در دمای اتاق (۲۵°C) یا بدن (۳۷°C) است.

■ اغلب مولکول‌ها در سلول حداقل یک کربن نامتقارن دارند که به چهار اتم متفاوت متصل می‌شود. چنین مولکول‌هایی ایزومرهای نوری (تصاویر آینه‌ای) دارند و با علائم D و L نشان داده می‌شوند (شکل ۴-۲ را ملاحظه کنید) این ایزومرها فعالیت زیستی متفاوتی دارند. در سیستم‌های زیستی تقریباً همه قندها به صورت ایزومرهای D و تقریباً همه اسیدهای آمینه به صورت ایزومر L می‌باشند.

■ الکترون‌ها ممکن است بطور مساوی یا نامساوی در پیوندهای کووالان شرکت کنند. اگر الکترونگاتیویته اتم‌های شرکت‌کننده در پیوند کووالان متفاوت باشد، پیوند کووالان قطبی را تشکیل می‌دهند. در این نوع پیوند الکترون‌ها به صورت نامساوی توزیع می‌شوند. یک انتهای پیوند قطبی به صورت جزئی بار مثبت و انتهای دیگر به صورت جزئی منفی می‌باشد (شکل ۲-۵ را ملاحظه کنید).

■ میانکنش‌های غیرکووالان بین اتم‌ها، بطور قابل ملاحظه‌ای ضعیف‌تر از پیوندهای کووالان می‌باشند. این میانکنش‌ها انرژی پیوندی حدود ۵-۱ کیلوکالری بر مول دارند (شکل ۶-۲ را ملاحظه کنید).

■ چهار نوع میانکنش غیرکووالان در سیستم‌های زیستی وجود دارد؛ پیوندهای یونی، پیوندهای هیدروژنی، میانکنش‌های واندروالس و میانکنش‌هایی که در اثر آبگریزی ایجاد می‌شوند.

■ پیوندهای یونی دراثر جاذبه الکتروستاتیک بین بارهای مثبت و منفی یون‌ها هستند. در محیطهای آبی همه کاتیون‌ها و آنیون‌ها توسط لایه‌ای از مولکول‌های آب احاطه می‌شوند (شکل ۷c-۲ را ملاحظه کنید). افزودن غلظت نمک (مثل NaCl) یک محلول می‌تواند قدرت پیوندهای یونی بین مولکولهای زیستی را تضعیف نموده و یا حتی از بین ببرد.

■ در پیوند هیدروژنی اتم هیدروژنی که بصورت کووالان به اتم الکترونگاتیو پیوند یافته با یک اتم گیرنده میانکنش می‌دهد. این اتم گیرنده دارای الکترون‌های غیرپیوندی می‌باشد که هیدروژن را جذب می‌نمایند (شکل ۸-۲ را ملاحظه کنید)

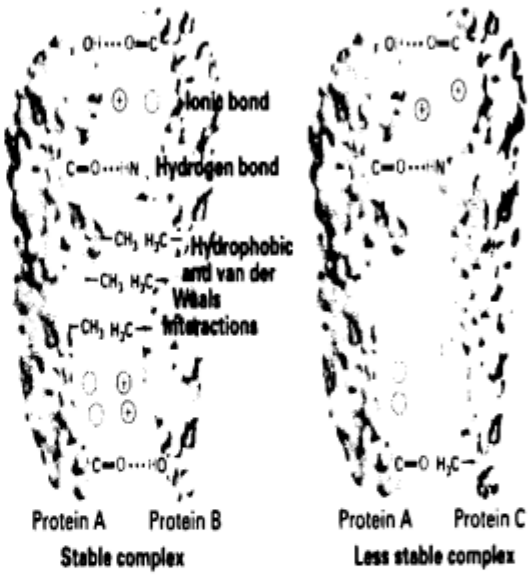
■ میانکنش‌های واندروالس ضعیف و نسبتاً غیراختصاصی هنگامی ایجاد می‌شوند که دو اتم نزدیک هم قرار می‌گیرند. آنها حاصل جاذبه بین دو قطبی‌های لحظه‌ای با مولکول‌های دیگر می‌باشند (شکل ۱۰-۲ را ملاحظه کنید).

■ در محیط آبی مولکول‌های غیرقطبی یا قسمت‌های غیرقطبی مولکول‌های بزرگ توسط اثر آبگریزی به سمت یکدیگر رانده می‌شوند. بنابراین میزان تماس مستقیم آنها با مولکول‌های آب کاهش می‌یابد (شکل ۱۱-۲ را ملاحظه کنید).

1- Affinity 2- Specificity

■ مکمل شدن مولکولی تناسب قفل و کلید بین مولکول‌ها می‌باشد. این مکمل شدن می‌تواند از لحاظ شکل، بار و دیگر خواص فیزیکی باشد. چندین میانکنش غیرکووالان می‌توانند بین مولکول‌های مکمل ایجاد شده و باعث اتصال محکم آنها گردند. در حالیکه این اتصال بین مولکول‌هایی که مکمل نیستند، انجام نمی‌گیرد.

■ میزان بالای اتصال اختصاصی نتیجه مکمل شدن مولکولی بوده و یکی از جنبه‌هایی است که مبنای میانکنش‌های بین مولکولی می‌باشد. پس برای اغلب فرآیندهای ضروری حیات، لازم می‌باشد.



▲ **شکل ۱۲-۲: مکمل شدن مولکولی و اتصال پروتئین‌ها از طریق چندین میانکنش غیر کووالان :** مکمل شدن از لحاظ شکل، بار، قطبیت و آبگریزی در سطح دو پروتئین امکان ایجاد چندین میانکنش ضعیف را می‌دهد که در کل این میانکنش‌ها، میانکنش قوی و اتصال محکمی را ایجاد می‌کنند. چون انحراف از مکمل شدن مولکولی باعث تضیف اتصالات می‌شود، یک ناحیه سطحی از یک مولکول زیستی معمولاً می‌تواند به یک یا تعداد محدودی مولکول دیگر بطور محکم متصل شود. مکمل شدن دو مولکول پروتئین در سمت چپ به آنها امکان می‌دهد که محکم‌تر از دو پروتئین مکمل در سمت راست به همدیگر متصل شوند.

۲-۲ واحدهای ساختاری شیمیایی سلول‌ها

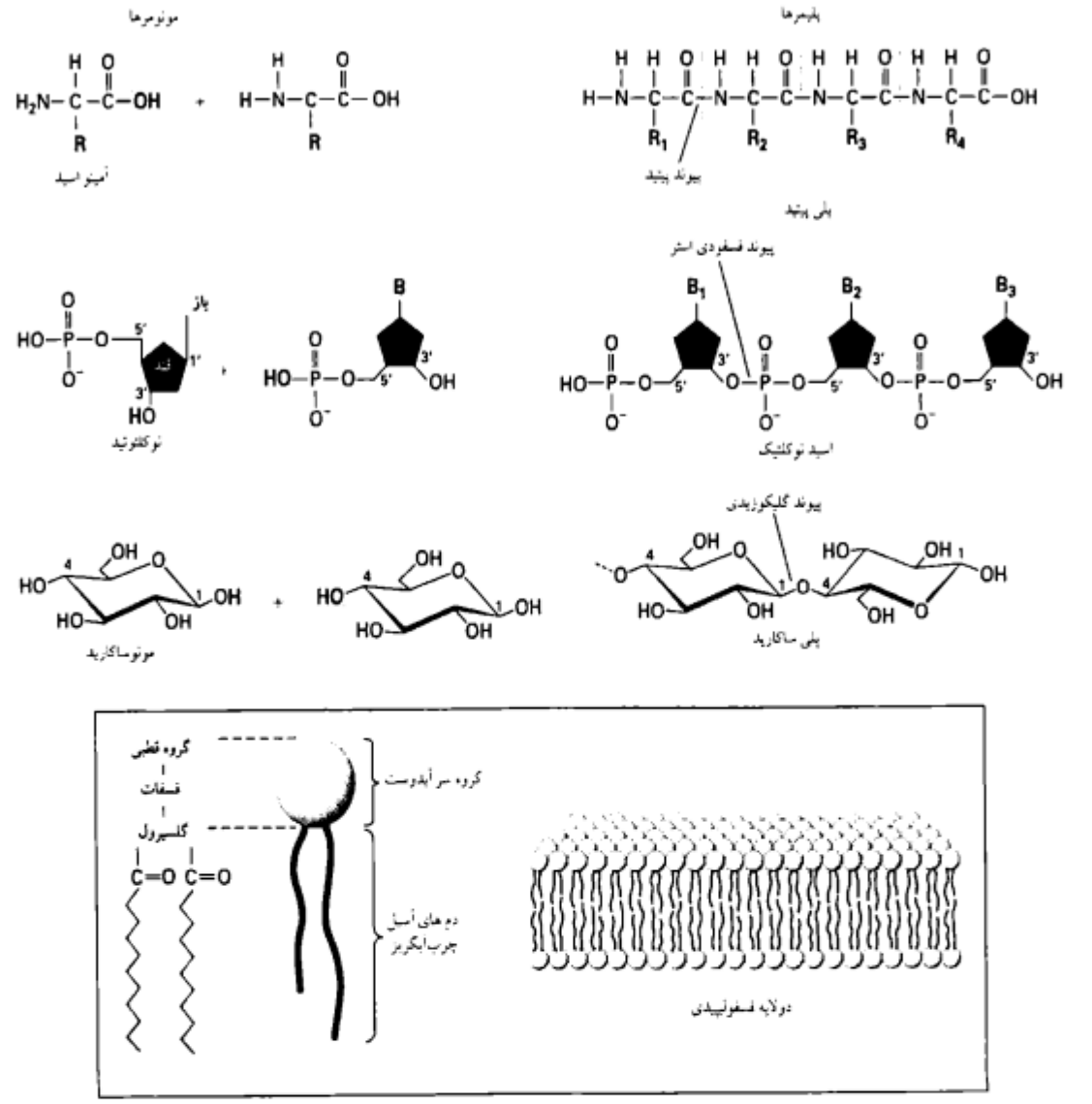
یک موضوع متداول در زیست‌شناسی، ساخته شدن مولکول‌ها **ماکرومولکول‌ها)** و ساختارهای بزرگ بوسیله پیوندهای کووالان یا غیرکووالان از مولکول‌های کوچکتر است. این مولکول‌ها می‌توانند شبیه و یا یکسان باشند. سه گروه فراوان و مهم از مولکول‌های زیستی **(پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پلی ساکاریدها)** پلیمرهایی هستند که واحدهای ساختاری آنها توسط چندین پیوند کووالان، به هم متصل شده‌اند. این واحدهای ساختاری، مولکول‌های کوچک یا **مونومر**[1] می‌باشند (شکل ۱۳-۲). پروتئین‌ها، پلیمرهای خطی با ۱۰ تا چندین هزار اسیدآمینه هستند که بوسیله **پیوند پپتیدی** به هم متصل می‌شوند. اسیدهای نوکلئیک پلیمرهای خطی با صدها تا میلیون‌ها نوکلئوتید می‌باشند که با پیوندهای **فسفودی استری** به هم متصل می‌شوند. پلی ساکاریدها، پلیمرهای خطی یا شاخه دار از مونوساکاریدهایی (قندها) همچون گلوکز بوده و بوسیله پیوند گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند. با اینکه مکانیسم‌های تشکیل پیوندهای کووالان بین مونومرها پیچیده است و بعداً توضیح داده می‌شود، اما معمولاً تشکیل پیوند کووالان بین دو مولکول مونومر، شامل از دست دادن یک هیدروژن (H) از یک مونومر و یک هیدروکسیل (OH) از مونومر دیگر (یا از دست دادن یک مولکول آب) بوده و بنابراین می‌توان گفت، یک **واکنش دهیدراسیون**[2] است. این پیوندها تحت شرایط زیستی معمول (دمای ۳۷°C، pH خنثی) پایدارند و بنابراین این پلیمرهای زیستی پایدارند و می‌توانند طیف وسیعی از کارها را در سلول انجام دهند (ذخیره اطلاعات، کاتالیز واکنش‌های شیمیایی، به عنوان عناصر ساختاری در تعیین شکل و تحرک سلولی و غیره).

ساختارهای ماکرومولکولی می‌توانند با استفاده از میانکنش‌های غیرکووالان نیز تجمع یابند. ساختارهای دولایه ماکرومولکولی در غشاهای سلولی بوسیله تجمع غیرکووالان هزاران مولکول کوچک ساخته می‌شوند. این مولکول‌های کوچک فسفولیپید[3] نامیده می‌شوند (شکل ۱۳-۲ را ملاحظه کنید). در این فصل، ما بر روی خصوصیات واحدهای ساختاری مونومری (اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک، قندها و فسفولیپیدها) متمرکز خواهیم شد. ساختار، عملکرد و تجمع پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، پلی ساکاریدها و مولکول‌های زیستی در فصل‌های بعدی توضیح داده می‌شود.

اسیدهای آمینه‌ای که فقط در زنجیره‌های جانبی با هم تفاوت دارند، پروتئین‌ها را می‌سازند.

واحدهای ساختاری مونومری پروتئین‌ها، ۲۰ **اسیدآمینه** است. این

1- Monomer
2- Dehydration reaction
3- Phospholipid



▲ **شکل ۱۳-۲ مروری بر واحدهای ساختاری شیمیایی سلول.** (بالا) سه نوع عمده از ماکرومولکول‌های زیستی که هر کدام بوسیله پلیمریزه شدن چندین مولکول کوچک (مونومرها) از یک نوع خاص ایجاد می‌شوند: پروتئین‌ها از اسیدهای‌آمینه (فصل ۳)، اسیدهای نوکلوئیک از نوکلئوتیدها (فصل ۴) و پلی ساکاریدها از مونوساکاریدها (قندها)، تشکیل شده‌اند. هر مونومر بطور کووالان با واکنشی که در نتیجه آن یک مولکول آب از دست داده می‌شود(دهیدراسیون)، به پلیمر متصل می‌شود. (پائین) مونومرهای فسفولیپید بطور غیرکووالان تجمع می‌یابند تا ساختار دولایه‌ای ایجاد نمایند. این ساختار اساس همه غشاهای سلولی را تشکیل می‌دهد.

اسیدهای آمینه وقتی در داخل پلیمر پروتئین قرار می‌گیرند، **رزیدو**[1] (ریشه) نامیده می‌شوند. همه اسیدهای‌آمینه ساختاری مشخصی دارند که شامل **یک اتم کربن** ($C\alpha$) **آلفا**(α)[2] مرکزی متصل به چهار گروه شیمیایی متفاوت می‌باشند: یک گروه آمینو (NH_2) و یک گروه اسیدکربوکسیلیک یا کربوکسیل (COOH) (نام اسیدآمینه هم از این دو گروه گرفته شده است) و یک گروه متغیر که **زنجیره جانبی**[3] یا گروه R نامیده می‌شود. چون کربن α در همه اسیدهای آمینه به غیر از گلیسین، نامتقارن است، پس این مولکول‌ها به دو فرم تصویر آینه‌ای وجود دارند و بصورت قراردادی ایزومرهای D (دکسترو[4]) و L (لوو[5]) نامیده می‌شوند (شکل ۴-۲ را ملاحظه کنید). این دو ایزومر بدون شکستن پیوند نمی‌توانند به هم تبدیل شوند (یک ایزومر بطور مشابه با دیگری ساخته می‌شود) و بنابراین برای تبدیل به

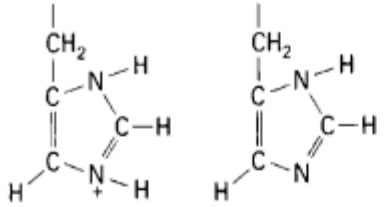
1- Residue
2- Alpha(α) Carbonatom ($C\alpha$)
3- Side chain
4- Dextro
5- Levo

یکدیگر بایستی یک پیوند شیمیایی در آنها شکسته و دوباره تشکیل گردد. به غیر از استثناهای خیلی کم، فقط فرم L اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها یافت می‌شود.

برای فهم ساختار سه بعدی و عملکرد پروتئین‌ها (در فصل ۳ با جزئیات بیشتری توضیح داده شده است)، شما بایستی با بعضی از خواص اسیدهای آمینه آشنا باشید، این خواص بوسیله زنجیره جانبی اسیدهای آمینه تعیین می‌گردد. برای فهم چگونگی عملکرد پروتئین‌ها، لازم نیست جزئیات ساختاری هر نوع از زنجیره جانبی را حفظ کنید زیرا اسیدهای آمینه براساس اندازه، شکل، بار، آبگریز بودن (میزان محلول بودن در آب) و واکنش‌پذیری زنجیره‌های جانبی، به چند گروه بزرگ طبقه بندی می‌شوند (شکل ۱۴-۲). با این حال شما بایستی با خواص عمومی هر گروه آشنا باشید.

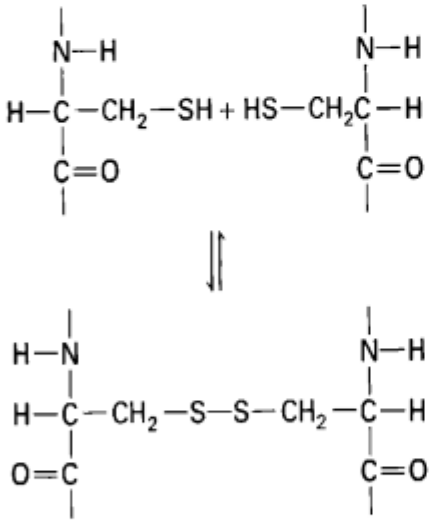
اسیدهای آمینه با زنجیره‌های جانبی غیرقطبی، آبگریزند و خیلی کم در آب حل می‌شوند. هر قدر زنجیره جانبی غیرقطبی، بزرگتر باشد اسیدآمینه آبگریزتر (کمتر در آب حل می‌شود) است. زنجیره‌های جانبی غیرحلقوی اسیدهای‌آمینه **آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین** (آلیفاتیک نامیده می‌شوند) و همچنین **متیونین** (غیر از گوگرد متیونین) کاملا از هیدروکربن ساخته شده و همگی غیرقطبی هستند. **فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان** زنجیره‌های جانبی بزرگ و آروماتیک دارند. در فصل بعد، با جزئیات بیشتری خواهیم دید که چگونه زنجیره‌های جانبی آبگریز تحت تاثیر اثر آبگریزی در داخل پروتئین قرار می‌گیرند و یا در پروتئین‌های قرار گرفته در نواحی آبگریز غشاهای زیستی چگونه این زنجیره‌های جانبی آبگریز در سطح قرار می‌گیرند.

اسیدهای آمینه با زنجیره‌های جانبی قطبی، آبدوست هستند؛ آبدوست بودن این اسیدهای آمینه اغلب به دلیل باردار بودن (یونیزه بودن) زنجیره‌های جانبی آنها در pH (pH≅7) درون و بیرون سلول است (قسمت ۳-۲ را ملاحظه کنید). **آرژنین و لیزین** زنجیره‌های جانبی با بار مثبت داشته و اسیدهای آمینه بازی نامیده می‌شوند؛ **اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک** به دلیل داشتن گروه اسید کربوکسیلیک در زنجیره جانبی‌شان، دارای بار منفی‌اند (فرمهای یونیزه آنها آسپارتات و گلوتامات نامیده می‌شوند) و بنابراین اسیدهای آمینه اسیدی نامیده می‌شوند. اسیدآمینه پنجم یا هیستیدین، زنجیره جانبی حلقوی با دو نیتروژن دارد که ایمیدازول نامیده می‌شود. این گروه می‌تواند بسته به تغییرات کوچک در حالت اسیدی محیط از بار مثبت تا بدون بار تغییر کند.



فعالیت بسیاری از پروتئین‌ها بوسیله تغییرات اسیدیته محیطی تغییر می‌کند که طی آن زنجیره جانبی هیستیدین پروتونه می‌شود و یا پروتونش را از دست می‌دهد. **آسپاراژین و گلوتامین** زنجیره‌های بدون بار ولی قطبی دارند که حاوی گروه‌های آمید با توانایی وسیع در تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشند. همچنین، **سرین و ترئونین** بدون بارند اما گروههای هیدروکسیل قطبی دارند که در پیوند هیدروژنی با سایر مولکول‌های قطبی مشارکت می‌کنند.

در آخر، سیستئین، گلیسین و پرولین نقش خاصی را در پروتئین‌ها ایفاء می‌کنند، زیرا زنجیره‌های جانبی آنها خواص منحصر به فردی دارند. زنجیره جانبی **سیستئین** حاوی یک **گروه سولفیدریل**[1] (-SH) واکنش‌پذیر است. این گروه اکسید می‌شود و پیوند کووالان دی سولفیدی (-S-S-) با سیستئین دوم ایجاد می‌کند.



نواحی درون یک زنجیره پروتئین (درون مولکولی) یا در زنجیره‌های جداگانه (بین مولکولی) گاهی اوقات از طریق پیوندهای دی سولفیدی به هم متصل می‌شوند. پیوند دی سولفیدی ساختار این پروتئین‌ها را پایدار می‌کند. گلیسین کوچکترین اسیدآمینه است. و گروه R آن یک اتم هیدروژن می‌باشد. اندازه کوچک این اسیدآمینه به آن امکان قرارگیری در فضاهای فشرده را می‌دهد. برخلاف سایر اسیدهای‌آمینه، در **پرولین** زنجیره جانبی خم شده و با ایجاد پیوند

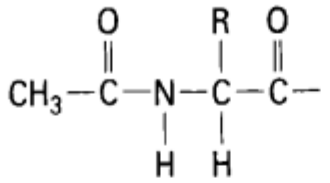
1- Solfhydryl group

کووالان با اتم نیتروژن (گروه آمینو) متصل به $C\alpha$، یک حلقه را تشکیل می‌دهد. در نتیجه پرولین خیلی سخت بوده و یک پیچ خوردگی ثابتی را در زنجیره پروتئین ایجاد می‌کند و حالات تاخوردن پروتئین را در نواحی رزیدوهای پرولین محدود می‌سازد.

بعضی از اسیدهای آمینه فراوانی بیشتری در پروتئین‌ها دارند. سیستئین، تریپتوفان و متیونین، اسیدهای آمینه‌ای هستند که کمتر در پروتئین‌ها دیده می‌شوند و در جمع نزدیک به ۵ درصد از اسیدهای‌آمینه را در پروتئین تشکیل می‌دهند. لوسین، سرین، لیزین و اسیدگلوتامیک، چهار اسیدآمینه‌ای هستند که فراوانی زیادی دارند و جمعاً ۳۲ درصد رزیدوهای اسیدآمینه‌ای یک پروتئین را تشکیل می‌دهند. با این حال ترکیب اسیدآمینه‌ای می‌تواند خیلی متفاوت از این مقادیر باشد.

اگرچه در سنتز اولیه پروتئین ۲۰ اسیدآمینه نشان داده شده در شکل ۱۴-۲ شرکت می‌کنند، اما آنالیز پروتئین‌های سلولی نشان می‌دهد که پروتئین‌ها تا ۱۰۰ اسیدآمینه متفاوت می‌توانند داشته باشند. تغییرات شیمیایی اسیدهای آمینه، عامل این تفاوت‌ها به شمار می‌رود. گروههای استیل (CH_3CO) و تعداد زیادی از گروه‌های شیمیایی دیگر می‌توانند به اسیدهای آمینه قرار گرفته در داخل پروتئین، افزوده شوند (شکل ۱۵-۲). یک تغییر شیمیایی مهم، افزوده شدن فسفات (PO_4، فسفریله شدن[1]) به گروه‌های هیدروکسیل در رزیدوهای سرین، ترئونین و تیروزین می‌باشد. ما با مثال‌های زیادی از پروتئین‌ها مواجه خواهیم شد که فعالیت آنها بوسیله فسفریله و دفسفریله شدن برگشت‌پذیر تنظیم می‌شود. فسفریله شدن نیتروژن در زنجیره‌های جانبی در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان دیده می‌شود ولی احتمالا به دلیل ناپایدار بودن هیستیدین این نوع فسفوپلاسیون، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. این نوع فسفریله شدن، ظاهراً در پستانداران به ندرت اتفاق می‌افتد. زنجیره‌های جانبی آسپاراژین، سرین و ترئونین جایگاه گلیکوزیله شدن بوده و طی آن زنجیره خطی و شاخه دار کربوهیدراتی به این اسیدهای آمینه متصل می‌شود. اغلب پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشایی حاوی رزیدوهای گلیکوزیله می‌باشند. سایر تغییرات اسیدهای آمینه در پروتئین‌های خاص یافت می‌شوند و شامل هیدروکسیله شدن رزیدوهای پرولین و لیزین در کلاژن (فصل ۱۹)، متیله شدن رزیدوهای هیستیدین در گیرنده‌های غشایی و γ-کربوکسیلاسیون گلوتامات در فاکتورهای انعقاد خون[2] همچون پروترومبین[3]، می‌باشد.

استیله شدن[4] (افزوده شدن یک گروه استیل) گروه آمینوی رزیدوی انتهای N، معمولترین نوع این تغییرات شیمیایی می‌باشد و حدوداً ۸۰ درصد همه پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد:



انتهای N استیله

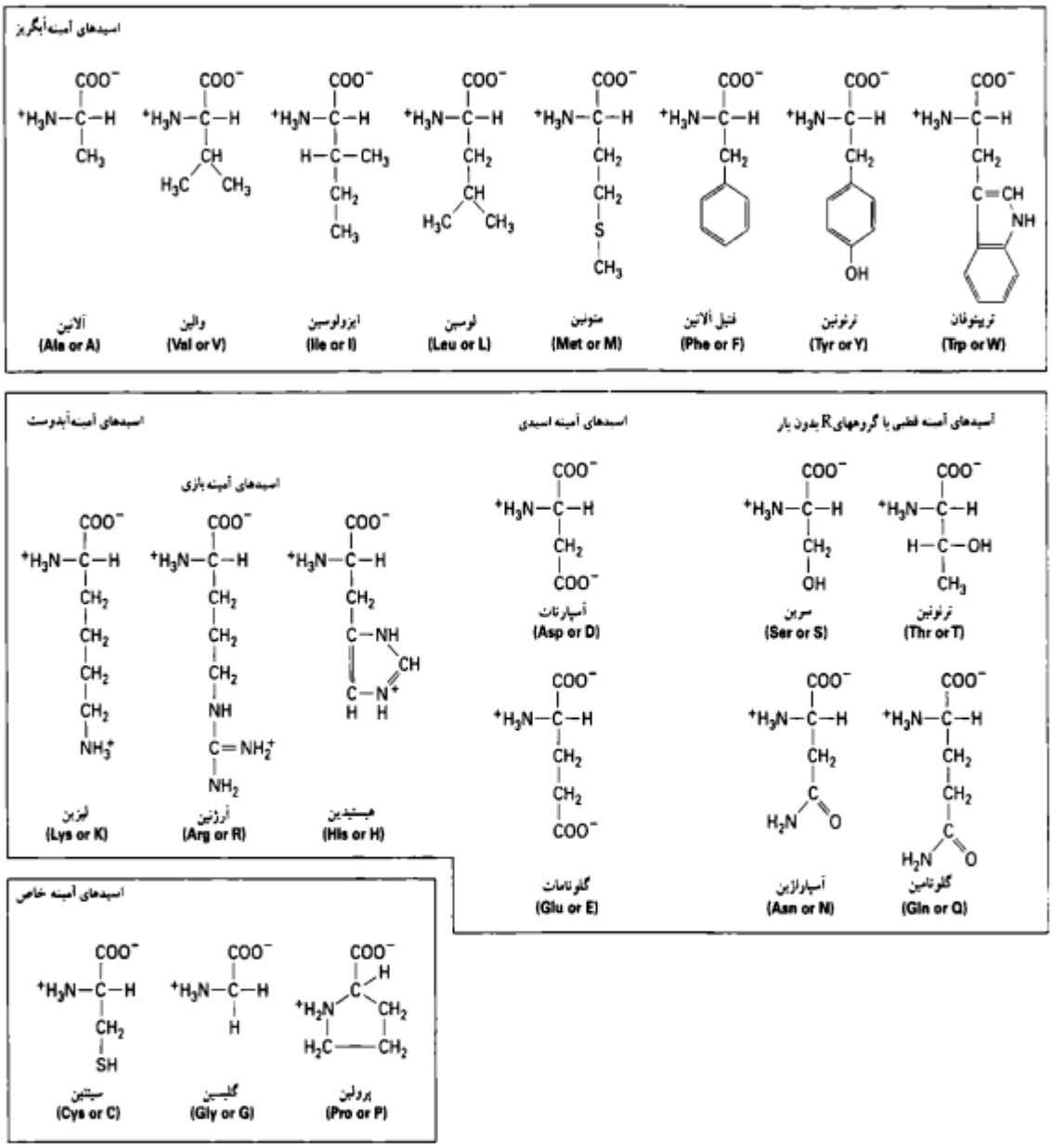
این تغییر ممکن است نقش مهمی را در کنترل طول عمر پروتئین‌های سلول بازی کنند زیرا پروتئین‌های غیراستیله بطور سریع تجزیه می‌شوند.

پنج نوکلئوتید مختلف برای ساخت اسیدهای نوکلئیک به کار می‌روند.

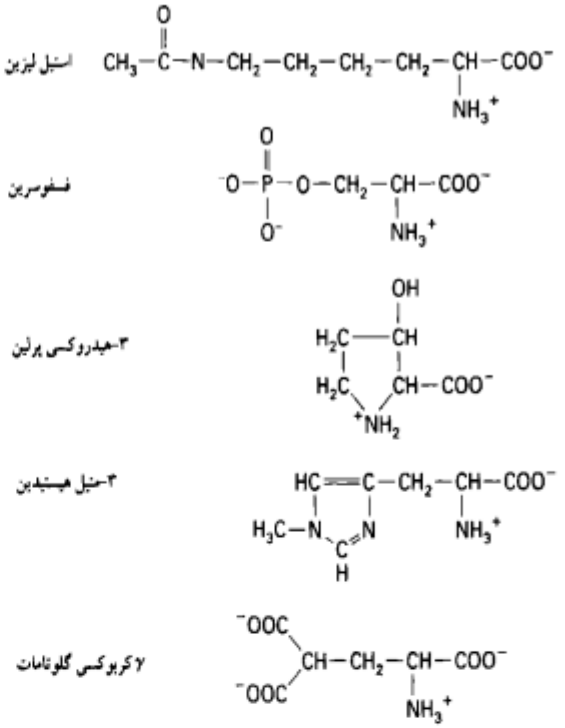
دو نوع از اسیدهای نوکلئیک مشابه یعنی **DNA (دئوکسی ریبونوکلئیک اسید**[5]) و **RNA (ریبونوکلئیک اسید**[6]) مولکول‌های اصلی در انتقال اطلاعات ژنتیکی در سلول می‌باشند. پلیمرهای DNA و RNA از مونومرهایی تشکیل شده‌اند که **نوکلئوتید**[7] نامیده می‌شوند. همه این نوکلئوتیدها ساختار مشترکی دارند که در آن گروه فسفر بوسیله پیوند فسفودی استر به پنتوز (یک مولکول قند پنج کربنه) متصل و این پنتوز خود به یک ساختار حلقوی حاوی نیتروژن و کربن متصل می‌شود که به آن باز اطلاق می‌گردد (شکل ۱۶a-۲). در RNA پنتوز، ریبوز و در DNA ، پنتوز، دئوکسی ریبوز است که جایگاه ′۲ به جای هیدروکسیل در ریبوز، پروتون دارد (شکل ۱۶b-۲)، بازهای **آدنین**[8]، **گوانین**[9] و **سیتوزین**[10] (شکل ۱۷-۲) هم در DNA و هم در RNA یافت می‌شوند، اما **تیمین**[11] فقط در DNA و **یوراسیل**[12] فقط در RNA وجود دارند.

آدنین و گوانین، **پورین**[13] هستند و دارای یک جفت حلقه ادغام شده در هم می‌باشند؛ سیتوزین، تیمین و یوراسیل پیریمیدین بوده و حاوی یک حلقه می‌باشند (شکل ۱۷-۲ را ملاحظه کنید). این بازها اغلب به

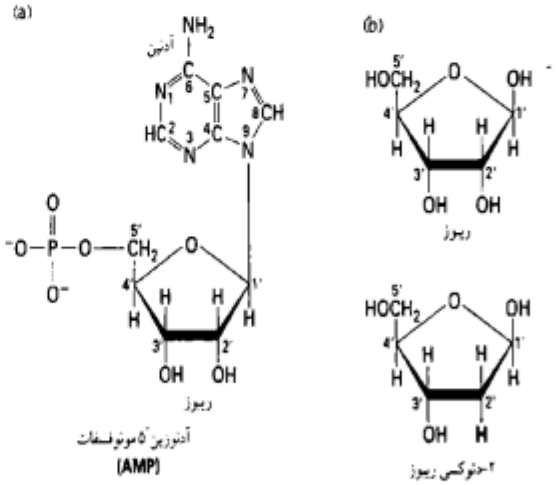
1- Phosphorylation
2- Blood-clotting factors
3- Prothrombon
4- Acetylation
5- Deoxyribonucleic acid
6- Ribonucleic acid
7- Nucleotide
8- Adenine
9- Guanine
10- Cytosine
11- Thymine
12- Uracil
13- Purine



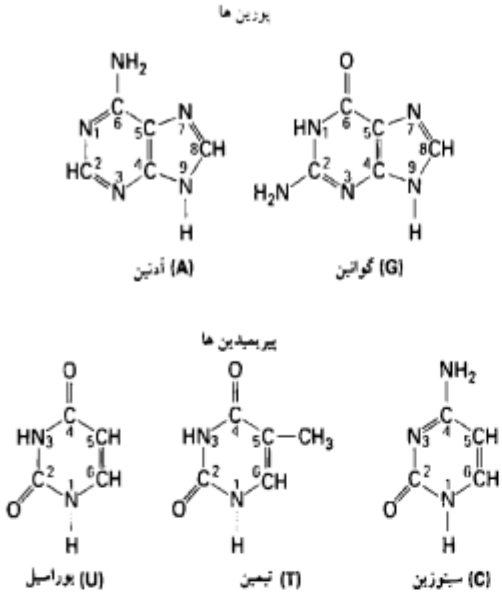
▲ **شکل ۱۴-۲(شکل رنگی) ۲۰ اسیدآمینه‌ای که برای ساخت پروتئین‌ها استفاده می‌شوند.** زنجیره جانبی (گروه R؛ قرمز) مشخصات هر اسیدآمینه را تعیین می‌کند و اساس طبقه‌بندی اسیدهای آمینه به سه گروه اصلی، آبدوست، آبگریز و خاص می‌باشد. شکل نشان داده شده، فرم‌های یونیزه اسیدهای آمینه را در pH سیتوزول (pH≃۷) نشان می‌دهد. در داخل پرانتزها نام‌های اختصاری سه حرفی و یک حرفی اسیدهای آمینه دیده می‌شود.



▲ **شکل ۱۵-۲ (شکل رنگی)تغییرات معمول زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها.** این رزیدوهای تغییر یافته و مقدار زیادی از رزیدوهای تغییر یافته دیگر با افزوده شدن گروههای شیمیایی مختلف (قرمز) به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه تشکیل می‌شوند. افزوده شدن گروههای شیمیایی می‌تواند در حین و یا بعد از سنتز زنجیره پلی پپتیدی انجام گیرد.



▲ **شکل ۱۶-۲ (شکل رنگی) ساختار نوکلئوتیدها.** (a) آدنوزین ۵′-فسفات (AMP) نوکلئوتیدی که در RNA وجود دارد براساس قاعده، اتم‌های کربن قند پنتوز در نوکلئوتیدها با پریم، شماره گذاری می‌شوند. در نوکلئوتیدهای طبیعی اتم کربن ۱′، با اتصال β به باز (در این مورد آدنین) متصل می‌شود. هم باز (آبی) و هم فسفات (قرمز) بر روی هیدروکسیل ۵′ در طرف بالای صفحه حلقه قندی قرار می‌گیرند. (b) ریبوز و دئوکسی ریبوز به ترتیب پنتوزهای RNA و DNA هستند.

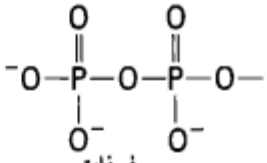


▲ **شکل ۱۷-۲ (شکل رنگی) ساختار شیمیایی بازهای اصلی در اسیدهای نوکلئیک.** در اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتیدها، نیتروژن ۹ پورین‌ها و نیتروژن ۱ پیریمیدین‌ها (قرمز) به کربن ۱′ ریبوز یا دئوکسی ریبوز متصل می‌شوند. U فقط در RNA و T فقط در DNA وجود دارد. DNA و RNA هر دو A، G و C دارند.

طور اختصار به ترتیب با A، G، C، T و U نشان داده می‌شوند. این حروف اختصاری معمولاً برای نشان دادن نوکلئوتیدها در پلیمرهای اسید نوکلئیک به کار می‌روند. در نوکلئوتیدها، اتم کربن ۱′ قند (ریبوز یا دئوکسی ریبوز) به نیتروژن در موقعیت ۹ پورین (N_9) یا به نیتروژن در موقعیت ۱ پیریمیدین (N_1) متصل می‌شود. خاصیت اسیدی نوکلئوتیدها به دلیل گروه فسفات است که تحت شرایط طبیعی درون سلولی یون‌های هیدروژن را آزاد نموده و بنابراین فسفات با بار منفی ایجاد می‌شود (شکل ۱۶a-۲ را ملاحظه کنید). اغلب اسیدهای نوکلئیک سلول بوسیله بار منفی فسفات، پیوندهای یونی با پروتئین ایجاد کرده و با آنها مجتمع می‌شوند.

سلول‌ها و مایعات برون سلولی در موجودات زنده حاوی غلظت کمی از **نوکلئوزیدها**[1] هستند. نوکلئوزیدها ترکیبی از باز و قند بدون فسفات می‌باشند. نوکلئوتیدها، نوکلئوزیدهایی هستند که هیدروکسیل ۵′ با یک، دو و یا سه گروه فسفات، استریفیه شده است. نوکلئوزید مونوفسفات‌ها یک فسفات استریفیه دارند (شکل ۱۶a-۲ را ملاحظه کنید)؛ نوکلئوزید دی فسفات‌ها حاوی یک گروه پیروفسفات هستند: و نوکلئوزیدتری فسفات‌ها، سه فسفات دارند. جدول ۳-۲ اسامی

1- Nucleosides

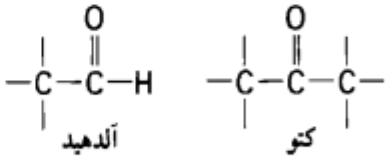


پیروفسفات

نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها در اسیدهای نوکلئیک و اشکال مختلف نوکلئوزید فسفات‌ها را نشان می‌دهد. نوکلئوزید تری فسفات در سنتز اسیدهای نوکلئیک به کار می‌رود که در فصل ۴ مورد بحث قرار می‌گیرد. از میان عملکردهای دیگر نوکلئوتیدها درسلول، GTP در انتقال پیام‌های درون سلولی شرکت می‌نماید و همچنین به عنوان منبع انرژی مخصوصا در سنتز پروتئین، عمل می‌نماید. ATP که بعدا در این فصل توضیح داده می‌شود، بصورت حامل انرژی زیستی بوده، و بطور گسترده‌ای استفاده می‌شود.

مونوساکاریدها بوسیله پیوندهای گلیکوزیدی به هم ملحق می‌شوند و پلی ساکاریدهای خطی و شاخه دار را تشکیل می‌دهند

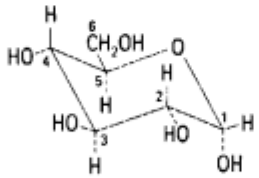
واحدهای ساختاری پلی ساکاریدها، قندهای ساده یا **مونوساکاریدها** هستند. مونوساکاریدها **کربوهیدرات‌هایی** هستند که حاصل ترکیب کووالانی، با نسبت یک به یک از کربن و آب می‌باشند. در $(CH_2O)_n$، n می‌تواند ۳، ۴، ۵، ۶ یا ۷ باشد. **هگزوزها**[1] (n=۶) و **پنتوزها**[2] (n=۵) بیشترین نوع مونوساکاریدها هستند. همه مونوساکاریدها حاوی گروه‌های هیدروکسیل (-OH) و همچنین یک گروه آلدئیدی یا کتونی می‌باشند.



آلدهید کتو

قند قندهای مهم از لحاظ زیستی همچون گلوکز، مانوز و گالاکتوز، هگزوز هستند (شکل ۱۸-۲). مانوز شبیه گلوکز است با این تفاوت که جهت‌گیری گروههای متصل به کربن ۲ برعکس جهت‌گیری آنها در گلوکز است. همچنین، گالاکتوز قند دیگری است که با گلوکز در گروههای متصل به کربن ۴، تفاوت دارد. تبدیلات بین گلوکز، مانوز و گالاکتوز نیازمند شکستن و تشکیل پیوند کووالانی است. چنین واکنش‌هایی بوسیله آنزیم‌ها انجام می‌شود. این آنزیم‌ها اپی‌مرازها نامیده می‌شوند.

D-گلوکز $(C_6H_{12}O_6)$ منبع انرژی بیرونی اصلی برای اغلب سلول‌های موجودات زنده عالی است و می‌تواند به سه شکل وجود داشته باشد. یک ساختار خطی و دو ساختار متفاوت حلقوی همی‌استال (شکل ۱۸a-۲). اگر گروه آلدئید روی کربن ۱ با گروه هیدروکسیل در کربن ۵ واکنش دهد، همی‌استال حاصله، یعنی D-گلوکو پیرانوز یک حلقه شش ضلعی خواهد بود. همانطوریکه در شکل ۱۸a-۲ دیده می‌شود، در آنومر α از D-گلوکو پیرانوز، جهت گروه هیدروکسیل متصل به کربن یک به طرف «پایین» و در مورد آنومر β جهت هیدروکسیل به طرف «بالا» است. در محلول آبی، آنومرهای α و β خودبخود به هم تبدیل می‌شوند. در حالت تعادل، یک سوم آنومر α و دو سوم آنومر β و مقدار خیلی کمی فرم خطی وجود دارد. چون آنزیم‌ها می‌توانند بین آنومرهای α و β گلوکز تمایز قائل شوند، بنابراین این اشکال از لحاظ زیستی نقش‌های متفاوتی دارند. اتصال گروه هیدروکسیل کربن ۴ گلوکز خطی با گروه آلدئیدش باعث تولید D-گلوکو فورانوز می‌شود که یک همی استال حلقوی پنج ضلعی است. گرچه هر سه شکل گلوکز [خطی، شکل پیرانوز و شکل فورانوز] در سیستم‌های زیستی وجود دارد، اما مقدار پیرانوز خیلی بیشتر است. حلقه پیرانوز در شکل ۱۸a-۲ به صورت مسطح نشان داده شده است. اما در حقیقت به دلیل آرایش چهار وجهی اطراف اتم‌های کربن، پایدارترین ساختار حلقه پیرانوز، شکلی غیرمسطح و شبیه به صندلی دارد. در این ساختار، هر پیوند از کربن‌های حلقه با اتم‌های بیرون از حلقه (مثل H یا O) بصورت تقریباً عمود بر حلقه (a) یا در سطح حلقه (e) خواهند بود. این پیوندها با a و e که به ترتیب برگرفته از کلمات محوری[3] و استوایی[4] است، نشان داده می‌شوند.



پیرانوز

α-D-گلوکوپیرانوز

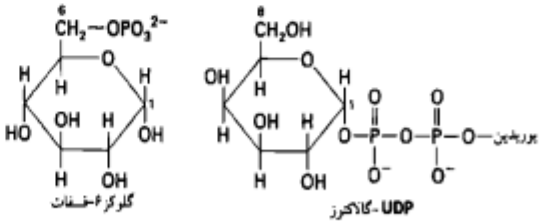
دی ساکاریدها[5] از دو مونوساکارید تشکیل می‌شود و ساده‌ترین پلی ساکاریدها هستند. دی ساکارید لاکتوز از گالاکتوز و گلوکز تشکیل می‌شود و قند اصلی شیر است. دی ساکارید ساکارز هم از گلوکز و فروکتوز تشکیل شده و محصول اصلی فتوسنتز در گیاهان است. این دو دی ساکارید از قندهای معمول در جیره غذایی هستند (شکل ۱۹-۲).

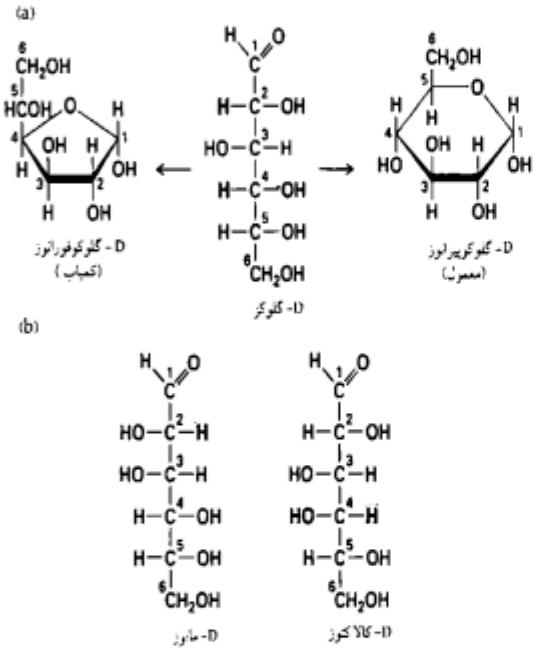
پلی ساکاریدهای بزرگتر حاوی دوازده تا صدها واحد مونوساکاریدی بوده و می‌توانند به عنوان ذخیره گلوکز، عناصر ساختاری و یا به عنوان چسب‌های نگهدارنده سلول‌ها کنار یکدیگر در بافت، عمل نمایند.

1- Hexoses
2- Pentoses
3- Axial
4- Equatorial
5- Disacharides

	پورین‌ها		پیریمیدین‌ها	
بازها	آدنین (A)	گوانین (G)	سیتوزین (C)	یوراسیل (U) تیمین (T)
نوکلئوزیدها در RNA	آدنوزین	گوانوزین	سیتیدین	یوریدین
نوکلئوزیدها در DNA	دئوکسی آدنوزین	دئوکسی گوانوزین	دئوکسی سیتیدین	دئوکسی تیمیدین
نوکلئوتیدها در RNA	آدنیلات	گوانیلات	سیتیدیلات	یوریدیلات
نوکلئوتیدها در DNA	دئوکسی آدنیلات	دئوکسی گوانیلات	دئوکسی سیتیدیلات	دئوکسی تیمیدیلات
نوکلئوزید مونوفسفات‌ها	AMP	GMP	CMP	UMP
نوکلئوزید دی‌فسفات‌ها	ADP	GDP	CDP	UDP
نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها	ATP	GTP	CTP	UTP
دئوکسی نوکلئوزید مونو، دی و تری فسفات‌ها	dAMP و بقیه	dGMP و بقیه	dCMP و بقیه	dTMP و بقیه

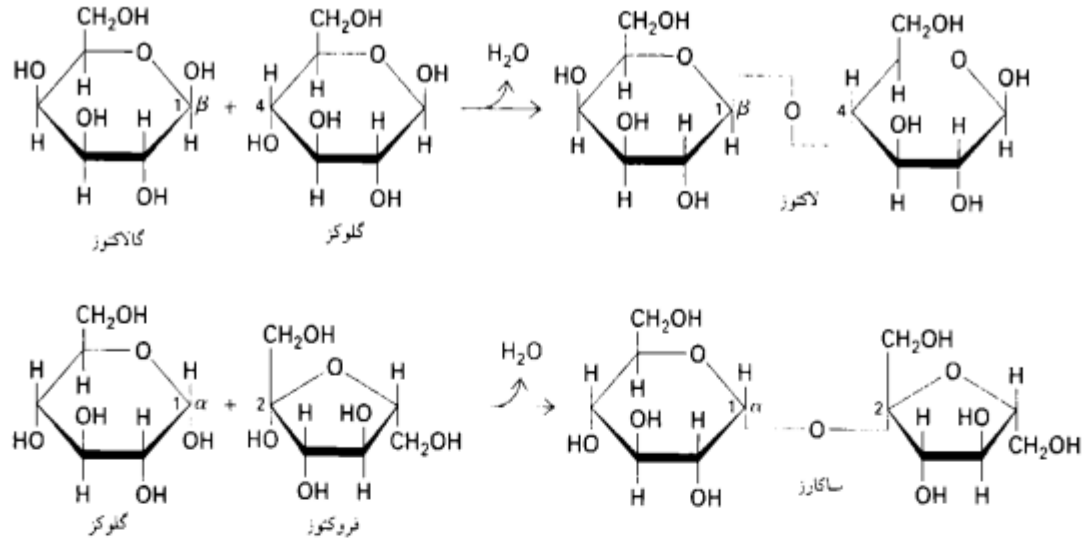
ذخیره کربوهیدراتی رایج در سلول‌های جانوری **گلیکوژن**[1] است. گلیکوژن، پلیمری بسیار طویل و شاخه‌دار از گلوکز می‌باشد. ۱۰ درصد وزن کبد، می‌تواند گلیکوژن باشد. ذخیره کربوهیدراتی اصلی در گیاهان **نشاسته**[2] است. نشاسته نیز پلیمر گلوکز بوده و به دو فرم بدون شاخه (آمیلوز[3]) و شاخه‌دار (آمیلوپکتین[4]) وجود دارد. نشاسته و گلیکوژن هر دو از آنومرهای آلفای گلوکز تشکیل شده‌اند. اما در عوض **سلولز**[5] از آنومرهای بتای گلوکز تشکیل شده است. سلولز، سازنده اصلی دیواره سلول‌های گیاهی (فصل ۱۹) بوده و یک پلیمر بی‌شاخه است. آنزیم‌های گوارشی انسان می‌توانند پیوندهای α گلیکوزیدی را در نشاسته بشکنند اما قادر به شکستن پیوند β - گلیکوزیدی سلولز نمی‌باشند. اغلب گونه‌های گیاهان، باکتریها و کپک‌ها، آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز را تولید می‌کند. گاوها و موریانه‌ها به دلیل داشتن باکتریهای تجزیه کننده سلولز در روده‌شان، قادر به شکستن سلولز هستند. آنزیم‌هایی که پیوندهای گلیکوزیدی اتصال دهنده مونوساکاریدها را در درون پلی ساکاریدها ایجاد می‌کنند برای آنومرهای α یا β روی یک قند و گروه هیدروکسیل روی قند دیگر اختصاصی می‌باشند. بطور کلی، دو مولکول قند به طرق متفاوتی می‌توانند به هم متصل شوند زیرا هر مونوساکاریدی چند گروه هیدروکسیل دارد که می‌تواند در تشکیل پیوند گلیکوزیدی شرکت کند. علاوه بر این هر مونوساکاریدی



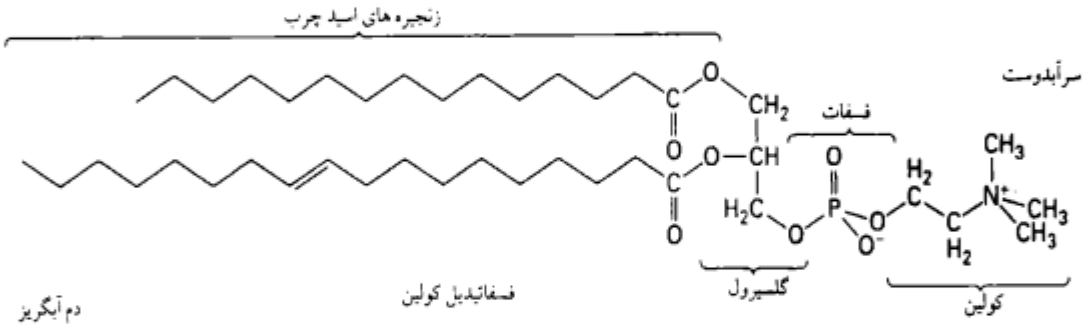


▲ **شکل ۱۸-۲ (شکل رنگی) ساختارهای شیمیایی هگزوزها.** همه هگزوزها فرمول شیمیایی مشابهی ($C_6H_{12}O_6$) داشته و حاوی یک گروه آلدئیدی یا کتونی می‌باشند. (a) فرم‌های حلقوی D-گلوکز بوسیله واکنش بین آلدئید در کربن ۱ با گروههای هیدروکسیل در کربن‌های ۴ و یا ۵ از فرم خطی ایجاد می‌شوند. این سه فرم به راحتی به همدیگر تبدیل می‌شوند، اما مقدار فرم پیرانوز (سمت راست) در سیستم‌های زیستی غالب است. (b) در D-مانوز و D-گالاکتوز، ترتیب اتصال H (سبز) و OH (آبی)، در یک کربن با گلوکز تفاوت دارد. این قندها مثل گلوکز معمولاً به صورت پیرانوز هستند.

1- Glycogen
2- Starch
3- Amylose
4- Amylopectine
5- Cellulose



▲ **شکل ۱۹-۲ تشکیل دی ساکاریدهای لاکتوز و ساکارز.** در یک اتصال گلیکوزیدی، کربن آنومری یک قند (چه به صورت α و چه به صورت β) به اکسیژن گروه هیدروکسیل در یک مولکول قند دیگر متصل می‌شود. این اتصالات براساس پیوند ایجاد شده، نامگذاری می‌شوند. بنابراین لاکتوز حاوی پیوند $\beta(1\rightarrow4)$ و ساکارز حاوی پیوند $\alpha(1\rightarrow2)$ است.



▲ **شکل ۲۰-۲ (شکل رنگی) فسفاتیدیل کولین به عنوان یک فسفوگلیسرید شاخص.** همه فسفوگلیسریدها فسفولیپیدهای آمفی پاتیک بوده و دارای دم آبگریز (زرد) و سر آبدوست (آبی) می‌باشند که در آنها گلیسرول از طریق گروه فسفات به یک الکل متصل می‌شود. هر کدام از زنجیره‌های اسید چرب و یا دو تا از این زنجیره‌ها در فسفوگلیسرید ممکن است اشباع یا غیراشباع باشند. در فسفاتیدیک اسید (قرمز) که ساده‌ترین فسفولیپید است، فسفات به گروه الکلی متصل نمی‌شود.

جدول ۴-۲ اسیدهای چرب غالب در فسفولیپیدها

نام اسید (فرم یونیزه در پاراتنز)	اختصار	فرمول شیمیایی
اسیدهای چرب اشباع		
میریستیک (میریستات)	$C_{14}:0$	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
پالمیتیک (پالمیتات)	$C_{16}:0$	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
استئاریک (استئارات)	$C_{18}:0$	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
اسیدهای چرب غیراشباع		

قابلیت اتصال با بیش از دو مونوساکارید دیگر را داشته و بدین ترتیب نقطه انشعاب ایجاد شده و پلیمرهای غیرخطی ایجاد می‌شوند. پیوندهای گلیکوزیدی معمولاً بین زنجیره پلی ساکاریدی در حال رشد و مونوساکارید تغییر یافته به صورت کووالان تشکیل می‌شوند. این مونوساکاریدهای تغییر یافته حاوی فسفات (مثل گلوکز ۶-فسفات) یا نوکلئوتید (مثل UDP- گالاکتوز) می‌باشند.

آنزیم‌های اپی‌مراز مونوساکاریدهای مختلف را به همدیگر تبدیل می‌کنند و اغلب به جای قندهای آزاد از قندهای نوکلئوتیدی استفاده می‌کنند.

اغلب پلی ساکاریدهای پیچیده حاوی قندهای تغییر یافته بوده و به صورت کووالان به گروه‌های کوچک مختلف متصل شده‌اند. این گروه‌ها معمولاً گروه‌های آمینو، سولفات و استیل می‌باشند. چنین تغییراتی در **گلیکوز آمینوگلیکان‌ها**[1] فراوانند. گلیکوز آمینوگلیکان‌ها اجزای پلی ساکاریدی اصلی در ماتریکس خارج سلولی بوده و در فصل ۱۹ توضیح داده می‌شوند.

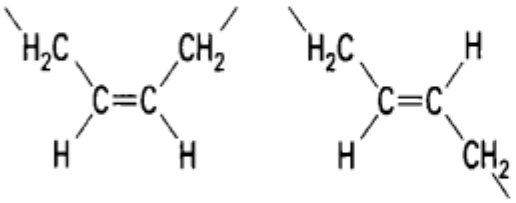
فسفولیپیدها با هم بطور غیرکووالانی جمع می‌شوند و ساختار دولایه غشاهای زیستی را تشکیل می‌دهند

غشاهای زیستی، صفحات بزرگ و انعطاف‌پذیری هستند که به عنوان مرزهای سلول‌ها و اندامک‌های درونشان عمل نموده و سطح بیرونی بعضی از ویروس‌ها را تشکیل می‌دهند. غشاها تعیین می‌کنند که چه در سلول باشد (غشا بیرونی و محتویات درون غشا) و چه در سلول نباشد (فضای خارج سلولی بیرون غشا). برخلاف پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پلی ساکاریدها، غشاها حاصل تجمع غیرکووالان واحدهای ساختاری شان می‌باشند. واحد ساختاری اولیه در همه غشاهای زیستی، **فسفولیپیدها**[2] هستند. خواص فیزیکی فسفولیپیدها عامل تشکیل ساختار صفحه مانند غشاها است. ساختار و عملکرد غشاها و همچنین مواد گوناگون موجود در آنها (همچون کلسترول، گلیکولیپیدها، پروتئین‌ها) در فصل ۱۰ توضیح داده خواهد شد.

فسفولیپیدها حاوی دو گروه اسید چرب غیرقطبی با زنجیره بلند بوده و به گروههای کوچک و شدیدا قطبی متصل (معمولاً بوسیله پیوند استری) می‌شوند. این گروههای قطبی شامل فسفات و مولکول آلی کوتاهی همچون گلیسرول (تری هیدروکسی پروپانول) است (شکل ۲-۲۰).

اسیدهای چرب[3] از یک زنجیره هیدروکربنی متصل به گروه کربوکسیل (-COOH) ساخته شده‌اند. اسیدهای چرب همانند گلوکز منبع انرژی مهم برای اغلب سلول‌ها هستند (فصل ۱۲). آنها از لحاظ طول متفاوت می‌باشند، با این حال اکثر اسیدهای چرب موجود در سلول‌ها تعداد اتم کربن زوج دارند معمولاً این اتم‌های کربن ۱۴، ۱۶، ۱۸ یا ۲۰ تا هستند. اسیدهای چرب اصلی فسفولیپیدها در جدول ۲-۴ آورده شده است. اسیدهای چرب معمولاً به صورت اختصاری C_x:y نشان داده می‌شود که در آن، x تعداد کربن در زنجیره و y تعداد پیوندهای دوگانه است. اسیدهای چربی که ۱۲ اتم کربن یا بالاتر دارند به علت زنجیره هیدروکربنی بلندشان، تقریباً در آب نامحلول‌اند.

اسیدهای چربی که پیوند دوگانه نداشته باشند، **اشباع شده**[4] گفته می‌شوند و آنهایی که حداقل دارای یک پیوند دوگانه هستند، **اشباع نشده**[5] نامیده می‌شوند. اسیدهای چربی که بیش از دو پیوند دوگانه کربن - کربن دارند **اشباع نشده چندگانه**[6] نامیده می‌شوند. پستانداران دو اسید چرب ضروری اشباع نشده چندگانه یعنی اسید لینولئیک (C18:2) و اسید لینولنیک (C18:3)، را نمی‌توانند بسازند و بایستی در رژیم غذایی آنها باشد. پستانداران سایر اسیدهای چرب را سنتز می‌کنند. دو نوع ایزومر فضایی سیس و ترانس اطراف کربن دوگانه ممکن است ایجاد شود.

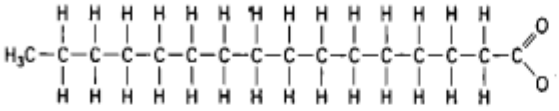


سیس ترانس

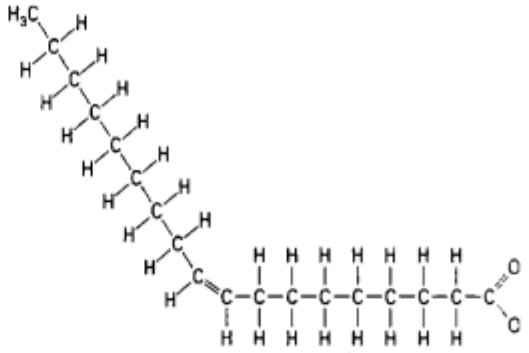
پیوند دوگانه سیس، خمیدگی محکمی را در طول زنجیره انعطاف‌پذیر اسید چرب ایجاد می‌کند (شکل ۲-۲۱).

بطور کلی، اسیدهای چرب اشباع نشده در سیستم‌های زیستی، تنها حاوی پیوندهای دوگانه سیس هستند. اسیدهای چرب اشباع شده که خمیدگی ندارند با همدیگر میانکنش محکمی داده و در نتیجه نقاط ذوب بیشتری نسبت به اسیدهای چرب اشباع نشده دارند (اسیدهای چرب اشباع شده در دمای اتاق معمولاً بیشتر از اینکه مایع باشند، جامدند). اسیدهای چرب ترانس (بطور عرف چربی‌های ترانس نامیده می‌شوند) در مارگارینی که بصورت نسبی هیدروژنه شده

1- Glycosaminoglycans
2- Phospholipids
3- Fattyauds
4- Saturated
5- Unsaturated
6- Polyunsaturated



پالمیتات
(فرم یونیزه پالمیتیک اسید)

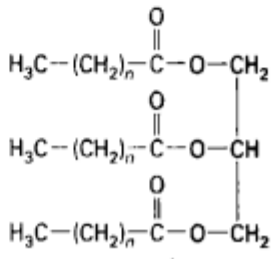


اولئات
فرم یونیزه اولئیک اسید

▲ **شکل ۲۱-۲ تاثیر پیوند دوگانه بر روی شکل اسیدهای چرب.** تصویر نشان داده شده، ساختارهای شیمیایی فرم یونیزه اسید پالمیتیک (اسید چرب اشباع شده با ۱۶ اتم کربن) و اولئیک اسید (اسید چرب اشباع نشده با ۱۸ اتم) را نشان می‌دهد. در اسیدهای چرب اشباع، زنجیره هیدروکربنی اغلب خطی است. پیوند دوگانه سیس در اولئات یک خمیدگی محکم در زنجیره هیدروکربنی ایجاد می‌کند.

(ازاین روش برای تولید مارگارین جامد استفاده می‌شود). و دیگر محصولات غذایی یافت می‌شوند. این محصولات غذایی طبیعی نیستند و از یک فرآیند کاتالیزی برای هیدروژنه کردن آنها استفاده می‌شود. اسیدهای چرب اشباع شده و ترانس، خواص فیزیکی مشابهی داشته و مصرف آنها در مقایسه با مصرف اسیدهای چرب اشباع‌نشده ، همراه با افزایش سطح کلسترول خون است.

اسیدهای چرب بوسیله واکنشی که **استریفیه شدن**[1] نامیده می‌شود، می‌توانند بطور کووالان به مولکول دیگری متصل گردند. این واکنش، یک واکنش دهیدراته شدن است و در آن OH از گروه کربوکسیل اسید چرب و H از گروه هیدروکسیل مولکول دیگر خارج می‌شوند. در مولکول ترکیبی تشکیل شده بوسیله این واکنش، قسمت حاصل از اسید چرب **گروه آسیل**[2] یا **گروه آسیل چرب**[3] نامیده می‌شود. این گروه در **فسفوگلیسیریدها** نشان داده شده است. فسفوگلیسیریدها، فسفولیپیدهای معمول بوده و در آنها دو گروه آسیل به دو گروه هیدروکسیل گلیسرول متصل می‌شود (شکل ۲۰-۲ را ملاحظه کنید). در **تری‌گلیسیریدها**[4] یا **تری آسیل گلیسرول‌ها**[5] سه گروه آسیل با گلیسرول استریفیه شده است:



تری گلیسرول

گروه آسیل چرب می‌تواند به یک مولکول چرب دیگر همچون کلسترول متصل شده و استرهای کلسترول را تشکیل دهد.

تری گلیسریدها و استرهای کلسترول، ترکیباتی شدیداً نامحلول در آب و فرم ذخیره‌ای و انتقالی اسیدهای چرب و کلسترول بوده و تری‌گلیسیریدها فرم ذخیره‌ای اسیدهای چرب در سلول‌های چربی بافت چربی هستند و همچنین ترکیبات اصلی چربی‌های خوراکی می‌باشند. استرهای کلسترول و تری گلیسیریدها، توسط جریان خون بین بافت‌ها منتقل می‌شوند. این انتقال بوسیله حامل‌های اختصاصی به نام لیپوپروتئین‌ها صورت می‌گیرد (فصل ۱۴).

در فسفوگلیسیریدها، یک گروه هیدروکسیل گلیسرول با فسفات و دو هیدروکسیل دیگر معمولاً با اسیدهای چرب استریفیه می‌شوند. ساده‌ترین فسفولیپید یعنی فسفاتیدیک اسید، تنها حاوی این ترکیبات است. در اغلب فسفولیپیدهای موجود در غشا، گروه فسفات با یک گروه هیدروکسیل از ترکیب آبدوست استریفیه می‌شود. به عنوان مثال در فسفاتیدیل کولین، کولین به فسفات متصل می‌شود (شکل ۲۰-۲ را ملاحظه کنید). بار منفی روی فسفات و گروههای قطبی یا باردار استریفیه شده می‌توانند با آب میانکنش قدرتمندی ایجاد کنند. فسفات و گروه استریفیه شده با آن (گروه سرفسفولیپید) آبدوست است در حالیکه زنجیره‌های آسیل چرب (دم‌ها) آبگریز هستند (در جدول

1- Esterification
2- Acyl group
3- Fatty acyl group
4- Triglycerides
5- Triacylglyceroles

۵-۲ یک فسفوگلیسیرید دیگر و گروههای سر آن نشان داده شده‌اند). مولکول‌هایی همچون فسفولیپیدها که هم نواحی آبگریز و هم آبدوست دارند، آمفی پاتیک نامیده می‌شوند. در فصل ۱۰، خواهیم دید چگونه خواص آمفی پاتیک فسفولیپیدها، عامل تجمع فسفولیپیدها به صورت غشاهای زیستی دولایه و صفحه مانند است. در غشاهای زیستی دمهای آسیل چرب به طرف داخل صفحه و گروه‌های سر به طرف محیط آبی جهت‌گیری می‌کنند (شکل ۱۳-۲ را ملاحظه کنید).

نکات کلیدی بخش ۲-۲

واحدهای ساختاری شیمیایی سلول

■ سه پلیمر زیستی عمده که با واکنش پلیمریزه شدن واحدهای ساختاری شیمیایی تشکیل می‌شوند، در سلول‌ها وجود دارند: پروتئین‌ها، از اسیدهای‌آمینه‌ای که بوسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل می‌گردد، تشکیل می‌شوند، اسیدهای نوکلئیک حاوی نوکلئوتیدهایی هستند که با پیوندهای فسفودی استری به هم متصل می‌گردند و پلی‌ساکاریدها حاوی مونوساکاریدهایی (قندهایی) هستند که بوسیله پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند (شکل ۱۳-۲ را ملاحظه کنید). فسفولیپیدها چهارمین واحد ساختاری شیمیایی اصلی هستند که بوسیله پیوندهای غیرکووالان تجمع یافته و غشاءهای زیستی را ایجاد می‌کنند.

■ تفاوت در اندازه و شکل بار و آبگریز بودن و واکنش پذیری زنجیره جانبی ۲۰ اسیدآمینه ، خواص شیمیایی و ساختاری پروتئین‌ها را تعیین می‌کند (شکل ۱۴-۲ را ملاحظه کنید).

■ بازهای موجود در نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده DNA و RNA حلقه‌های حاوی نیتروژن و کربن هستند که به قند پنتوز متصل می‌شوند. آنها دو گروه تشکیل می‌دهند، پورین‌ها، آدنین (A) و گوانین (G) و پیریمیدین‌ها، سیتوزین (C)، تیمین (T) و یوراسیل (U) (شکل ۱۷-۲ را ملاحظه کنید). A، G، T و C در DNA و A، G، U و C در RNA هستند.

■ گلوکز و سایر هگزوزها می‌توانند به سه شکل باشند: ساختار زنجیره خطی باز، حلقه شش ضلعی (پیرانوز) و حلقه پنج ضلعی (فورانوز) (شکل ۱۸-۲ را ملاحظه کنید). در سیستم‌های زیستی شکل پیرانوز D - گلوکز شکل غالب است.

■ پیوند گلیکوزیدی بین آنومر α یا β یک قند یا گروه هیدروکسیل قند دیگر تشکیل شده و منجر به تشکیل دی ساکاریدها و سایر پلی ساکاریدها می‌گردد (شکل ۱۹-۲ را ملاحظه کنید).

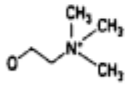
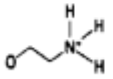
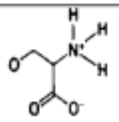
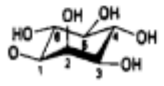
■ فسفولیپیدها مولکول‌های آمفی پاتیک هستند. آنها دارای دم آبگریزاند (اغلب دو زنجیره آسیل چرب) و بوسیله مولکول آلی کوچکی (اغلب گلیسرول) به سر آبدوست متصل می‌شوند (شکل ۲۰-۲ را ملاحظه کنید). زنجیره هیدروکربنی اسیدهای چرب ممکن است پیوند دوگانه کربن - کربن نداشته باشد (اشباع شده) یا یک یا چند پیوند دوگانه داشته باشد (اشباع نشده). پیوند دوگانه سیس، زنجیره هیدروکربنی اسیدچرب را خم می‌کند.

۲-۳ تعادل شیمیایی

حالا بحث‌مان را به واکنش‌های شیمیایی تغییر می‌دهیم، در واکنش‌های شیمیایی پیوندهای کووالان در **واکنش‌های** شیمیایی شکسته و پیوندهای جدید تشکیل می‌شود تا محصولات واکنش را بسازند. در آن واحد، چندصد نوع واکنش شیمیایی متفاوت به طور همزمان در هر سلول رخ می‌دهد و در کل اغلب مواد شیمیایی می‌توانند [در داخل سلول] متحمل چندین واکنش شیمیایی گردند. مقدار واکنش‌هایی که می‌توانند پیش روند و سرعت انجام آنها، ترکیب شیمیایی سلول‌ها را تعیین می‌کنند.

هنگامیکه واکنشگرها با هم ترکیب می‌شوند و قبل از تشکیل محصولات، سرعت واکنش در جهت تشکیل محصول (واکنش

جدول ۵-۲ فسفوگلیسریدها و گروههای سر

فسفوگلیسیریدها	گروه سر
فسفاتیدیل کولین	 Choline
فسفاتیدیل اتانول آمین	 Ethanolamine
فسفاتیدیل سرین	 Serine
فسفاتیدیل اینوزیتول	 Inositol

▲ **شکل ۲۲-۲ وابستگی سرعت واکنش‌هایی شیمیایی به زمان.** سرعت‌های رفت و برگشت یک واکنش به غلظت‌های اولیه واکنشگرها و محصولات وابسته است. سرعت واکنش رفت به موازات کاهش غلظت واکنشگرها، کاهش می‌یابد در حالیکه سرعت واکنش برگشت با افزایش غلظت محصولات، افزایش می‌یابد. در حالت تعادل، سرعت واکنش‌های رفت و برگشت یکسان بوده و غلظت واکنشگرها و محصولات ثابت باقی می‌ماند.

رفت[1]) بوسیله غلظت اولیه واکنشگرها تعیین می‌شود. غلظت اولیه احتمالا مقدار برخوردهای واکنشگرها و واکنش بین آنها را تعیین می‌کند (شکل ۲۲-۲). به موازات تجمع محصولات، غلظت واکنشگرها کاهش یافته و در نتیجه سرعت واکنش رفت نیز کم می‌شود. در این موقع مقداری از مولکول‌های محصولات در واکنش برگشت شرکت نموده و واکنشگرها را دوباره تولید می‌نماید (توانایی واکنش برای برگشت را **برگشت‌پذیری میکروسکوپی**[2] می‌نامند). این واکنش برگشت در وهله اول آهسته بوده ولی با افزایش غلظت محصولات، سرعت نیز افزایش می‌یابد. در نهایت سرعت واکنش‌های رفت و برگشت یکسان می‌شود بطوریکه غلظت‌های واکنشگرها و محصولات تغییر نمی‌کند. در این حالت گفته می‌شود سیستم در حالت **تعادل شیمیایی**[3] است.

در حالت تعادل نسبت محصولات به واکنشگرها **ثابت تعادل**[4] نامیده می‌شود. ثابت تعادل مقدار ثابتی بوده و مستقل از سرعت انجام واکنش است. سرعت واکنش‌های شیمیایی می‌تواند توسط **کاتالیزور**[5] افزایش یابد. کاتالیزور تغییرات شیمیایی (شکستن و تشکیل پیوندهای کووالان) را تسریع می‌کند، اما تغییر ماندگاری را در طی واکنش ایجاد نمی‌کند (قسمت ۴-۲ را ملاحظه کنید). در این قسمت جنبه‌های مختلف تعادل شیمیایی را مورد بحث قرار می‌دهیم. در قسمت بعدی، تغییرات انرژی در طی واکنش‌ها و ارتباط آنها با تعادل را مورد ارزیابی قرار می‌دهیم.

ثابت‌های تعادل انعکاسی از میزان واکنش شیمیایی است

ثابت تعادل K_{eq} به ماهیت واکنشگرها و محصولات، حرارت و فشار (مخصوصا در مورد گازها) بستگی دارد. تحت شرایط استاندارد فیزیکی (۲۵°C و فشار ۱ اتمسفر برای سیستم‌های زیستی) K_{eq} برای یک واکنش، با کاتالیزور و یا بدون آن، همیشه مقدار ثابتی است. برای واکنشی با سه واکنشگر و سه محصول

$$aA + bB + cC \rightleftharpoons zZ + yY + xX \qquad (۲-۱)$$

در اینجا حروف بزرگ مولکول‌ها یا اتم‌ها را نشان می‌دهند و حروف کوچک نمایانگر تعداد هر کدام از آنها در فرمول واکنش است ثابت تعادل با رابطه زیر به دست می‌آید:

$$K_{eq} = \frac{[X]^x\,[Y]^y\,[Z]^z}{[A]^a\,[B]^b\,[C]^c} \qquad (۲-۲)$$

کروشه‌ها نشان دهنده غلظت مولکول‌ها در حالت تعادل می‌باشند. سرعت واکنش رفت[6] (چپ به راست در معادله (۲-۱) به صورت زیر است:

$$Rate_{forward} = k_f\,[A]^a\,[B]^b\,[C]^c$$

k_f **ثابت سرعت**[7] برای واکنش رفت است. بطور مشابه سرعت واکنش برگشت (راست به چپ در معادله ۲-۱) به صورت زیر است: سرعت برگشت[8]

$$Rate_{forward} = k_r\,[X]^x\,[Y]^y\,[Z]^z$$

k_r ثابت سرعت واکنش برگشت است. در حالت تعادل سرعت رفت و برگشت یکسان است، بنابراین نسبت سرعت رفت به سرعت برگشت،

1- Forward realtion
2- Microscopic reversibility
3- Chemical equilibrium
4- Equilibrium Constant
5- Catalyst
6- Rate forward
7- Rate forward
8- Rate reverse

▲ **شکل ۲۳-۲ مقایسه واکنش‌ها در حالت تعادل و تعادل پایا:** (a) در لوله آزمایش واکنش بیوشیمیایی (A→B) در نهایت به تعادل رسیده و سرعت رفت و برگشت واکنش یکسان می‌شود (که با پیکان‌های با طول یکسان نشان داده شده‌اند). (b) در مسیرهای متابولیکی درون سلول، محصول B می‌تواند با تبدیل شدن به C، مصرف شود. مسیر واکنش‌هایی که به هم متصل‌اند در حالت تعادل پایا است، در حالیکه سرعت تشکیل حدواسطها (همچون B) با سرعت مصرف آنها برابر است. طول پیکان‌های ناهمسان نشان می‌دهد، مسیرهای متابولیکی به تعادل نمی‌رسند و همچنین غلظت حدواسطها در حالت تعادل پایا می‌تواند متفاوت از غلظت آنها در حال تعادل باشد.

برابر یک است. با آرایش مجدد این معادلات، می‌توانیم ثابت تعادل را به صورت نسبت ثابت سرعت‌ها بیان کنیم.

$$K_{eq}=\frac{k_f}{k_r} \qquad (۲-۳)$$

واکنش‌های شیمیایی در سلول، در حالت تعادل پایا هستند

تحت شرایط خاص و زمان مناسب، واکنش‌های بیوشیمیایی در لوله آزمایش نهایتا به تعادل خواهند رسید. در درون سلول‌ها اغلب واکنش‌ها به مسیرهایی متصل می‌شوند که در آنها محصول یک واکنش، مادهٔ اولیه واکنش دیگری بوده و یا از سلول به بیرون پمپ می‌شود. در این وضعیت پیچیده، وقتی سرعت تشکیل و مصرف یک ماده یکسان باشد، غلظت ماده مورد نظر ثابت باقی می‌ماند و سیستم پیوسته واکنش‌ها برای تولید و مصرف آن ماده گفته می‌شود در حالت **تعادل پایا**[1] است (شکل ۲۲-۲). نتیجه چنین واکنش‌های پیوسته‌ای، ممانعت از تجمع حدواسطها بوده و سلول‌ها را از اثرات مخرب آنها محافظت می‌کنند. این حد واسطها به صورت بالقوه سمی بوده و یا با افزایش غلظت، آنها سمی می‌شوند.

ثابت‌های تجزیه واکنش‌های اتصالی انعکاسی از تمایل مولکول‌هایی است که با هم میانکنش می‌دهند

نگرش تعادلی، برای اتصال یک مولکول به مولکول دیگر نیز به کار می‌رود. اغلب فرآیندهای مهم سلولی وابسته به چنین واکنش‌های اتصالی هستند که شامل تشکیل و شکسته شدن میانکنش‌های مختلف غیرکووالان می‌باشد. یک مثال بارز اتصال **لیگاند**[2] (همچون هورمون انسولین یا آدرنالین) به **گیرنده**[3] خود در سطح سلول و تشکیل تجمع چند مولکولی یا کمپلکس می‌باشد. این تجمع پاسخ زیست شناختی را شروع می‌کند. مثالی دیگر اتصال پروتئین به یک توالی خاص از جفت بازها در مولکول DNA می‌باشد که اغلب باعث می‌شود بیان ژن مجاور به آن قسمت کم یا زیاد شود (فصل ۷). اگر ثابت تعادل برای واکنش اتصالی مشخص باشد، پایداری درون سلولی کمپلکس حاصل را می‌توان پیش بینی کرد. جهت ترسیم راهکار کلی برای تعیین غلظت کمپلکس غیرکووالان ایجاد شده، مقدار پروتئین (P) را که به DNA (D) متصل شده و کمپلکس پروتئین - DNA (PD) را تشکیل می‌دهد، محاسبه خواهیم کرد:

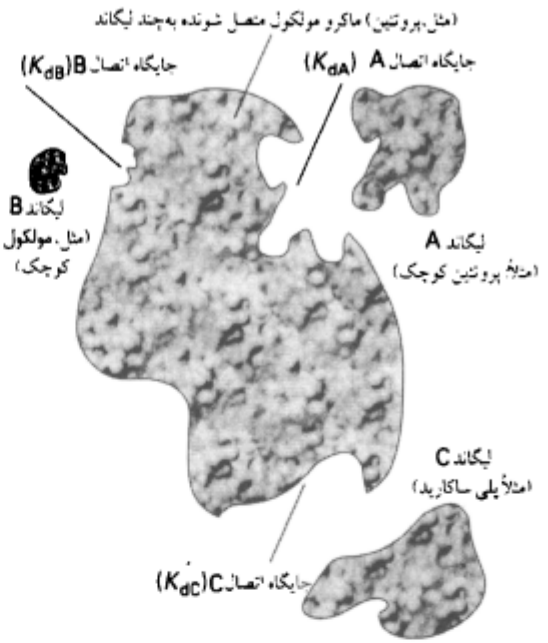
$$P + D \rightleftharpoons PD$$

غالبا، واکنش‌های اتصالی به وسیله ثابت تجزیه K_d مورد بررسی قرار می‌گیرند. ثابت تجزیه، ثابت تعادلی دوطرفه است. برای واکنش اتصالی فوق ثابت تجزیه به صورت زیر است:

$$K_d=\frac{[P]\,[D]}{[PD]} \qquad (۲-۴)$$

واکنش‌های شاخص که در آنها پروتئین به توالی اختصاصی DNA متصل می‌شود دارای K_d برابر با 10^{-10} M است (M نشاندهنده مولاریته یا مول بر لیتر است). جهت نشان دادن بزرگی این ثابت تجزیه در داخل سلول برای نسبت مولکولهای DNA متصل شده و متصل نشده اجازه دهید یک مثال ساده را مطرح نمائیم. یک سلول باکتری با حجم $1/5\times10^{-15}$ L، ۱ مولکول DNA و ۱۰ مولکول پروتئین (P) متصل شونده به DNA، با داشتن K_d برابر با 10^{-10} M، توالی اختصاصی DNA آن در ۹۹ درصد مواقع حاوی پروتئین خواهد بود و تنها ۱ درصد مواقع به آن پروتئین متصل نخواهد شد. این زمانی است که فرض بر این باشد که فقط ۱۰ مولکول پروتئین در سلول وجود دارد! واضح است که P[پروتئین] و D[DNA] خیلی محکم به هم متصل می‌شوند (دارای تمایل بالایی نسبت به هم هستند). این اتصال محکم به دلیل مقدار کم

1- Steady State 2- Ligand
3- Receptor



▲ **شکل ۲۴-۲ (شکل رنگی) ماکرومولکول‌ها می‌توانند جایگاههای جداگانه اتصال برای چند لیگاند داشته باشند.** یک مولکول بزرگ (همچون پروتئین، آبی) با سه جایگاه اتصال جداگانه (A-C) در شکل نشان داده شده است. هر جایگاه اتصال مکمل مولکولی برای یک لیگاند متفاوت (لیگاندهای A-C) می‌باشد و هر کدام دارای ثابت‌های تجزیه (K_{dA-C}) جداگانه‌ای هستند.

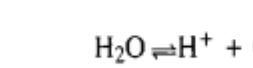
ثابت تجزیه برای واکنش اتصالی P و D می‌باشد. برای اتصال پروتئین - پروتئین و پروتئین - DNA، مقادیر K_d کمتر از $10^{-9}M$ (نانومولار)، اتصال محکم، $10^{-6}M$ (میکرومولار) اتصال کمی محکم و $10^{-3}M$ (میلی مولار) اتصال نسبتاً ضعیف در نظر گرفته می‌شود.

اندازه بزرگ ماکرومولکول‌های زیستی همچون پروتئین‌ها می‌تواند باعث در دسترس قرار گرفتن چندین سطح برای میانکنش‌های مکمل شدن بین مولکولی باشد (شکل ۲۴-۲). در نتیجه اغلب ماکرومولکول‌ها توانایی اتصال همزمان به چند مولکول دیگر را دارا می‌باشند. در چنین مواردی این میانکنش‌های اتصالی مستقل بوده و هر کدام دارای مقادیر متفاوت K_d ، می‌باشند. این مقادیر K_d ثابت هستند. در موارد دیگر، اتصال مولکول در یک جایگاه روی ماکرومولکول می‌تواند شکل سه بعدی جایگاه اتصال دیگر را تغییر دهد و در نتیجه باعث تغییر در میانکنش‌های اتصالی جایگاه مورد نظر با مولکول‌های دیگر شود. این مکانیسم مهمی برای یک مولکول می‌باشد که بتواند فعالیت مولکول دوم (همچون پروتئین) را تغییر دهد (تنظیم نماید). این عمل توسط تغییر قابلیت مولکول دوم برای میانکنش با مولکول سوم، انجام می‌شود. ما این مکانیسم تنظیمی را با جزئیات بیشتر در فصل ۳ مورد ارزیابی قرار می‌دهیم.

مایعات زیستی، مقادیر pH مشخصی دارند

حلال درون سلول‌ها و در مایعات بین سلولی آب است. خصوصیت مهم همه محلول‌های آبی، غلظت یون‌های هیدروژن (H^+) با بار مثبت و یون‌های هیدروکسیل (OH^-) با بار منفی می‌باشد. چون این یون‌ها محصول تجزیه H_2O هستند، در همه سیستم‌های زنده وجود داشته و بوسیله اغلب واکنش‌هایی که در درون سلول‌ها بین مولکول‌های آلی رخ می‌دهد، آزاد می‌شوند. این یون‌ها می‌توانند به درون یا بیرون سلول منتقل شوند، بطوریکه شیره بسیار اسیدی معده که توسط سلول‌های قرار گرفته در دیواره معده ترشح می‌شود حاصل این انتقال می‌باشد.

هنگامیکه یک مولکول آب تجزیه می‌شود، یکی از پیوندهای قطبی O-H آن شکسته شده و یون هیدروژن یا **پروتون**[1] ایجاد می‌شود. پروتون بصورت یون آزاد نیمه عمر کوتاهی داشته و سریعا با یک مولکول آب ترکیب شده، یون هیدرونیوم (H_3O^+) را ایجاد می‌نماید. به این ترتیب، با وجود اینکه غلظت یون‌های هیدروژن در محلول در واقع باید به صورت غلظت یون هیدرونیوم $[H_3O^+]$ نشان داده شوند، اما بطور قراردادی به صورت $[H^+]$ نشان داده می‌شوند. در تجزیه آب به موازات تولید یون OH^-، یون H^+ نیز تولید می‌شود. تجزیه آب واکنش برگشت‌پذیر است:



$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

در دمای ۲۵°C، $[H^+][OH^-]=10^{-14}M^2$ بوده، بنابراین در آب خالص $[H^+][OH^-]=10^{-7}M$ است. غلظت یون‌های هیدروژن محلول بطور قراردادی pH آن محلول گفته می‌شود. pH محلول به صورت منفی لگاریتم غلظت یون هیدروژن تعیین می‌شود. pH آب خالص در ۲۵°C، ۷ است.

$$pH = -\log[H^+] = \log\frac{1}{[H^+]} = \log\frac{1}{10^{-7}} = 7$$

باید به یاد داشته باشیم که تفاوت یک واحدی در pH نشان دهنده ۱۰ برابر تفاوت در غلظت پروتون می‌باشد. در مقیاس pH، ۷ خنثی،

1- Proton

مقادیر کمتر از ۷/۰ نشان دهنده محلول‌های اسیدی ($[H^+]$ بالاتر) و مقادیر بیشتر از ۷/۰، محلول‌های بازی (آلکالین[1]) است (شکل ۲۵-۲). به عنوان مثال شیره معده که غنی از اسید هیدروکلریک [HCl] است، pH ای در حدود ۱ دارد. غلظت H^+ شیره معده یک میلیون برابر بیشتر از غلظت H^+ در سیتوپلاسم با pH ای در حدود ۷/۲ است.

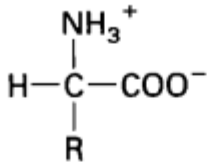
گرچه سیتوزول سلول‌ها pH حدود ۷/۲ دارد، با این حال در داخل لیزوزوم که یک اندامک درون سلول در سلول‌های یوکاریوتی است، pH خیلی پائین‌تر (حدود ۴/۵) است (فصل ۹). اغلب آنزیم‌های تجزیه‌ای درون لیزوزوم‌ها در محیط اسیدی فعالیت مطلوب دارند در حالیکه فعالیت‌شان در محیط نزدیک به خنثی در سیتوپلاسم، مهار می‌شود. این نشان می‌دهد، حفظ یک pH خاص برای عملکرد بعضی از ساختارهای سلولی ضروری می‌باشد. به بیان دیگر تغییر زیاد در pH سلولی ممکن است نقش مهمی را در کنترل فعالیت سلولی بازی کند. به عنوان مثال pH سیتوپلاسمِ سلول تخم لقاح نیافته توتیای دریایی (یک جانور آبی) ۶/۶ است. هنگام لقاح در عرض ۱ دقیقه pH تا ۷/۲ بالا می‌رود. کاهش $[H^+]$ به مقدار یک چهارم مقدار اولیه، تغییری است که برای رشد و تقسیم سلول تخم لازم است.

یون‌های هیدروژن بوسیله اسیدها، آزاد و بوسیله بازها جذب می‌شوند

بطور کلی، **اسید** مولکول، یون یا گروه شیمیایی است که تمایل دارد یون هیدروژن $[H^+]$ آزاد کند. مثل اسید هیدروکلریک (HCl) یا گروه کربوکسیل (-COOH). این گروه تمایل دارد تجزیه شود و یون کربوکسیلات ($-COO^-$) با بار منفی ایجاد نماید. همچنین **باز** مولکول، یون یا گروه شیمیایی است که به راحتی با H^+ ترکیب می‌شود، مثل یون هیدروکسیل (OH^-)؛ آمونیاک (NH_3) (که یون آمونیوم (NH_4^+) را ایجاد می‌کند؛ یا گروه آمین ($-NH_2$).

هنگامیکه اسید به محلول آبی اضافه می‌شود، $[H^+]$ افزایش می‌یابد (pH پائین می‌رود) و بالعکس هنگامیکه باز اضافه گردد، $[H^+]$ کاهش می‌یابد (pH بالا می‌رود) چون $[H^+][OH^-]=10^{-14}M^2$ است، هر افزایشی در $[H^+]$ همراه با کاهش $[OH^-]$ و بالعکس خواهد بود.

اغلب مولکول‌های زیستی هم گروه اسیدی و هم گروه بازی دارند. به عنوان مثال در محلول‌های خنثی (pH=۷/۰)، اکثر اسیدهای آمینه اغلب به شکل یونیزه دوگانه هستند که در آنها گروه کربوکسیل پروتون از دست می‌دهد و گروه آمینو پروتون می‌گیرد:



در اینجا R نشان دهنده زنجیره جانبی بدون بار است. چنین مولکولی که حاوی تعداد مساوی از یون‌های با بار مثبت و منفی می‌باشد را زویتریون[2] می‌نامند. زویتریون‌ها بار ندارند (بارهای مثبت بارهای منفی را خنثی می‌کنند) و خنثی هستند. در مقادیر pH بالا یا پائین فقط یکی از گروههای قابل یونیزه اسیدآمینه باردار خواهد بود.

واکنش تجزیه برای اسید (یا گروه اسیدی در مولکول بزرگ) HAمی‌تواند به صورت $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ نوشته شود. ثابت تعادل برای این واکنش با K_a (a نمایانگر اسید است) نشان داده می‌شود و به صورت $K_a=[H^+][A^-]/[HA]$ تعیین می‌گردد. با گرفتن لگاریتم از دو طرف معادله و نوآرایی آن، معادله حاصل، یک رابطه خیلی مفید بین ثابت تعادل و pH می‌دهد:

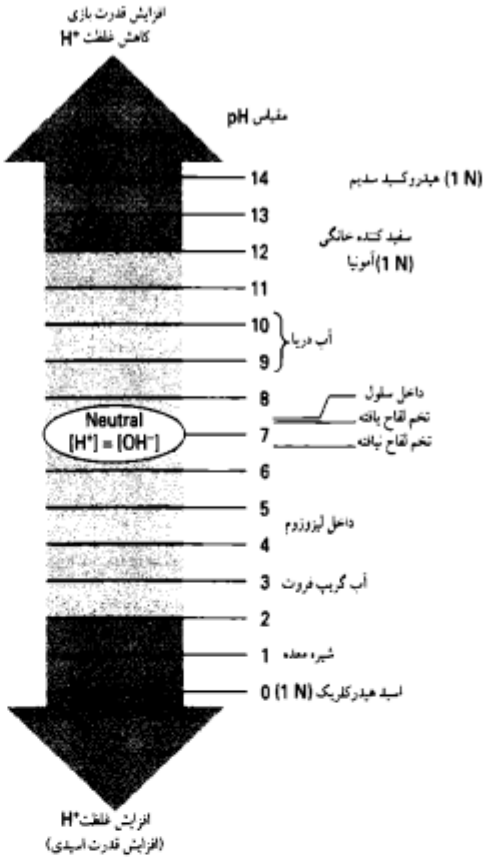
$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (۲-۵)$$

در اینجا pK_a مساوی با $-\log K_a$ است.

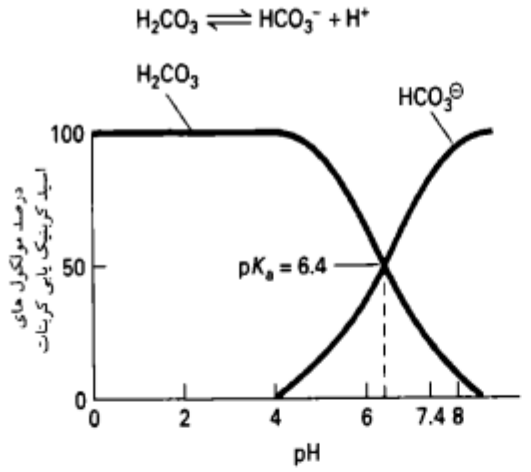
این معادله به نام **معادله هندرسون - هاسلباخ**[3] شناخته می‌شود. در این معادله می‌توان دید، هنگامیکه نصف مولکول‌های اسید تجزیه شده‌اند و نصف دیگر خنثی هستند (تجزیه نشده‌اند)، pK_a مساوی با pH است، زیرا وقتی $[HA]=[A^-]$ است، $\log([A^-]/[HA])=0$ می‌باشد و بنابراین $pK_a=pH$ می‌گردد. معادله هندرسون - هاسلباخ این امکان را می‌دهد که با دانستن مقدار pH محلول و pK_a اسید، میزان تجزیه شدن یک اسید را محاسبه نمائیم. بطور عملی با اندازه‌گیری $[A^-]$ و $[HA]$ که در اثر pH محلول حاصل می‌شوند، می‌توان pK_a اسید و سپس ثابت تعادل K_a یک واکنش تجزیه را محاسبه کرد (شکل ۲۶-۲).

1- Alkaline 2- Zwitterion

3- Henderson-Hasselbalch equation



▲ **شکل ۲۵-۲ مقادیر pH محلول‌های رایج.** pH محلول آبی منفی لگاریتم غلظت یون هیدروژن است. مقادیر pH برای اغلب مایعات زیستی درون و بیرون سلولی حدوداً نزدیک ۷ بوده و به دقت تنظیم می‌شود. این امر به سلول‌ها، اندامک‌ها و ترشحات سلولی امکان می‌دهد به خوبی عمل نمایند.



شکل ۲۶-۲- ارتباط بین pH، pK_a و تجزیه اسید. با افزایش pH محلول اسید کربنیک از ۰ تا ۸/۵، درصد این ترکیب در فرم تجزیه نشده یا غیر یونیزه (H_2CO_3) از ۱۰۰ درصد کاهش و فرم یونیزه آن از صفر درصد افزایش می‌یابد. pHایکه (۶/۴) این دو فرم با هم مساوی‌اند، pK_a اسید است که در آن نصف اسید کربونیک یونیزه شده است. هنگامیکه pH به بالاتر از ۸ می‌رسد، تقریباً تمام اسید به فرم یون بی‌کربنات (HCO^-_3) یونیزه شده است.

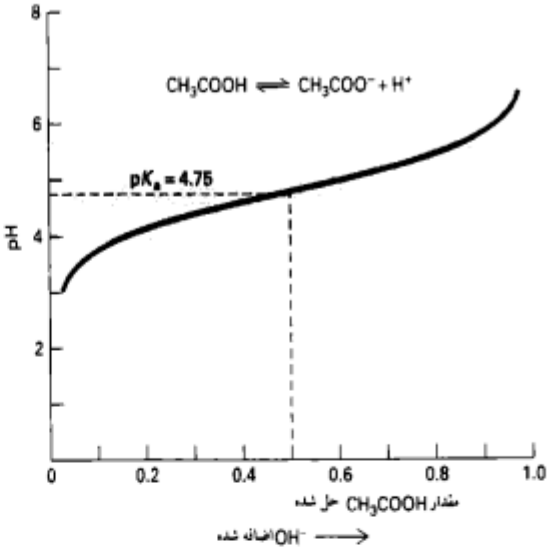
بافرها، pH مایعات درون سلولی و بیرون سلولی را حفظ می‌کنند

با وجود تولید متابولیک اغلب اسیدها همچون اسید لاکتیک و دی اکسید کربن (با آب تشکیل اسید کربونیک، H_2CO_3 می‌دهد)، سلول در حال رشد بایستی در سیتوپلاسم pH ثابتی حدود ۷/۲ تا ۷/۴ داشته باشد. سلول‌ها منبع ذخیره‌ای از بازهای ضعیف و اسیدهای ضعیف که **بافر** نامیده می‌شوند، دارند. بافرها با وجود نوسانات اندک در مقادیر H^+ یا OH^-، pH سلول را بطور نسبی ثابت نگه می‌دارند. این نوسانات اندک در اثر متابولیسم و یا جذب یا دفع مولکول‌ها و یون‌ها توسط سلول ایجاد می‌شوند. هنگامیکه یون‌های OH^- و H^+ به سلول اضافه یا توسط متابولیسم ساخته شوند، بافرها با جذب این یون‌های اضافه، عمل خویش را انجام می‌دهند.

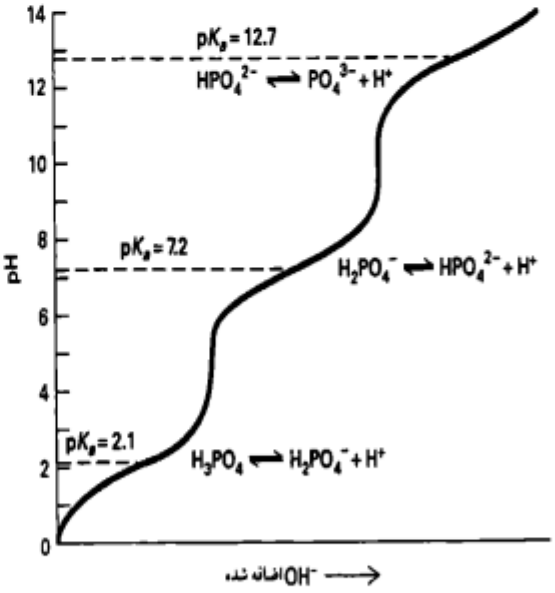
اگر اسید یا بازی به محلول بافری که pHای برابر با pK_a بافر ($[HA]=[A^-]$) دارد اضافه شود، pH محلول تغییر می‌کند اما تغییر آن کمتر از تغییری خواهد بود که بافر وجود ندارد و دلیل آن این است که پروتون‌های آزاد شده بوسیله اسید توسط فرم یونیزه بافر ($[A^-]$) جذب می‌شوند. همچنین یون‌های هیدروکسیل که بوسیله افزودن باز تولید شده‌اند توسط پروتون‌های آزاد شده از بافر تجزیه نشده (HA) خنثی می‌شوند. ظرفیت یک بافر برای آزاد کردن یون‌های هیدروژن یا جذب آنها، وابسته به این است که چقدر پروتون جذب یا آزاد کند و این نیز خود به pH محیط نسبت به pK_a بافر بستگی دارد. توانایی بافر برای کاهش دادن تغییرات pH، **ظرفیت بافری**[1] آن بوده و وابسته به غلظت بافر و ارتباط بین pK_a و pH (که بوسیله معادله هندرسون - هاسلباخ بیان می‌شود) است.

منحنی تیتراسیون اسید استیک در شکل ۲۷-۲ تاثیر pH روی مقدار مولکول‌های غیریونیزه (HA) و فرم یونیزه شده (A^-) را نشان می‌دهد. در یک واحد pH پائین‌تر از pK_a اسید، ۹۱ درصد مولکول‌ها به فرم HA هستند. در یک واحد pH بالاتر از pK_a، ۹۱ درصد به فرم A^- هستند. در مقادیر pHایکه بیش از یک واحد بالاتر

1- Buffering Capacity



▲ **شکل ۲-۲۷. منحنی تیتراسیون بافر اسیداستیک** (CH_3COOH). pKa تجزیه اسیداستیک به هیدروژن و استات ۴/۷۵ است. در این pH، نصف مولکول‌های اسید تجزیه شده‌اند. چون pH براساس لگاریتم محاسبه می‌شود. محلول از ۹۱ درصد (CH_3COOH) در pH۳/۷۵ به ۹ درصد CH_3COOH در pH۵/۷۵ تغییر می‌کند. این اسید در این محدوده pH بیشترین ظرفیت بافری را دارد.



▲ **شکل ۲-۲۸. منحنی تیتراسیون اسیدفسفریک** (H_3PO_4)، **بافری متداول در سیستم‌های زیستی.** این مولکول زیستی بی‌همتا سه اتم هیدروژن دارد که در pHهای مختلف جدا می‌شوند ؛ بنابراین همانطور که در شکل دیده می‌شود اسیدفسفریک سه pKa مختلف دارد. نواحی سایه‌دار محدوده‌های pH را نشان می‌دهند (در pKa، یک واحد pH) که در آن نواحی ظرفیت بافری اسیدفسفریک، زیاد است. در این نواحی، افزودن اسید (یا باز) تغییرات نسبتاً اندکی را در pH ایجاد خواهد کرد.

یا پائین‌تر از pK_a است، ظرفیت بافری اسیدها و بازهای ضعیف سریعاً افت می‌کند. به عبارت دیگر اگر مقدار مول مشخصی از یک اسید به محلول حاوی HA و A^- با pHای نزدیک به pK_a اضافه شود، باعث تغییر کمی در pH خواهد شد، اما اگر همین مقدار مول از اسید به محلولی اضافه شود که HA و A^- نداشته و pH محلول از مقدار pK_a فاصله داشته باشد، تغییرات pH آن بیشتر خواهد بود.

همه سیستم‌های زیستی حاوی یک یا چند بافر هستند. یون‌های فسفات (شکل یونیزه اسید فسفریک) به مقدار قابل ملاحظه‌ای در سلول وجود داشته و عامل مهمی در نگهداری یا بافری کردن pH سیتوپلاسم هستند. اسیدفسفریک (H_3PO_4) سه پروتون با قابلیت جدا شدن دارد، اما آنها به طور همزمان جدا نمی‌شوند. هر کدام از این پروتون‌ها واکنش تجزیه و pK_a جداگانه‌ای دارند که در شکل ۲-۲۸ نشان داده شده است. منحنی تیتراسیون اسید فسفریک نشان می‌دهد، pK_a جداشدن پروتون دوم ۷/۲ است. بنابراین در pH ۷/۲ براساس معادله هندرسون -هاسلباخ، ۵۰ درصد از فسفات سلولی به فرم $H_2PO_4^-$ و ۵۰ درصد دیگر به فرم HPO_4^{2-} می‌باشد. به این دلیل فسفات، بافری عالی در مقادیر اطراف ۷/۲ (pH، سیتوپلاسم سلول‌ها) و ۷/۴ (pH خون انسان) می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۳-۲

تعادل شیمیایی

- واکنش شیمیایی زمانی در حال تعادل است که سرعت واکنش رفت و برگشت یکسان باشد (تغییری در غلظت واکنشگرها و محصولات ایجاد نشود).
- ثابت تعادل Keq انعکاسی از نسبت محصولات به واکنشگرها در حالت تعادل است و بنابراین شدت واکنش و پایداری نسبی واکنشگرها و محصولات را نشان می‌دهد.
- pK_a به دما، فشار و خواص شیمیایی محصولات و واکنشگرها وابسته است و مستقل از سرعت واکنش و غلظت اولیه محصولات و واکنشگرها است.
- برای هر واکنش، ثابت تعادل Keq مساوی است با نسبت ثابت سرعت رفت به ثابت سرعت برگشت (k_f/k_r). سرعت تبدیل واکنشگرها به محصولات و بالعکس وابسته به ثابت‌های سرعت و غلظت واکنشگرها یا محصولات می‌باشد.
- درون سلول‌ها، واکنش‌های به هم متصل در مسیرهای متابولیک بطور کلی در حالت تعادل پایا (نه تعادل) هستند. در این حالت سرعت تشکیل حد واسطها مساوی با سرعت مصرفشان بوده، (به شکل ۲-۲۳ را ملاحظه کنید) و بنابراین

غلظت حد واسطها تغییر نمی‌کند.

■ ثابت تجزیه K_d برای اتصال غیر کووالان دو مولکول میزان پایداری کمپلکس تشکیل شده بین مولکول‌ها را نشان می‌دهد (مثل کمپلکس‌های لیگاند - گیرنده یا پروتئین - DNA)

■ pH منفی لگاریتم غلظت یون‌های هیدروژن ($-\log[H^+]$) است. pH سیتوپلاسم معمولاً در حدود ۷/۴-۷/۲ است در حالیکه درون لیزوزوم‌ها pH حدود ۴/۵ است.

■ اسیدها پروتون (H^+) آزاد می‌کنند و بازها به آن متصل می‌شوند. در مولکول‌های زیستی، گروه‌های کربوکسیل و فسفات گروههای اسیدی و گروههای آمینو گروههای بازی متداول هستند.

■ بافرها مخلوطی از یک اسید ضعیف (HA) و فرم باز مربوطه (A^-) هستند. بافرها تغییر pH محلول را هنگامیکه به آن اسید یا باز اضافه می‌شود، کاهش می‌دهند. سیستم‌های زیستی بافرهای مختلفی برای نگهداری pH در محدوده کم دارند.

۲-۴ انرژتیک بیوشیمیایی

تولید، ذخیره و مصرف انرژی، نقش اساسی در اقتصاد سلول دارد. انرژی ممکن است به صورت توانایی انجام کار تعریف شود. این دید در زندگی روزمره می‌تواند برای موتور اتومبیل‌ها و توان الکتریکی وسایل و در دنیای زیست‌شناسی برای موتورهای سلولی به کار رود. انرژی موجود در پیوندهای شیمیایی می‌تواند مهار شود تا اعمال شیمیایی و تحرکات فیزیکی در سلول را انجام دهد.

اشکال مختلف انرژی در سیستم‌های زیست‌شناختی مهم هستند

دو شکل اصلی انرژی شامل انرژی جنبشی و انرژی پتانسیل است. **انرژی جنبشی**[1] انرژی حرکتی (به عنوان مثال حرکت مولکول‌ها) است. شکل دوم انرژی، **انرژی پتانسیل**[2] یا انرژی ذخیره شده، اهمیت ویژه‌ای در مطالعه سیستم‌های شیمیایی و زیست شناختی دارد.

انرژی حرارتی[3] یا گرما(انرژی تحرک مولکول‌ها)، شکلی از انرژی جنبشی است (انرژی تحرک مولکول‌ها). برای اینکه گرما کار انجام دهد، بایستی از ناحیه‌ای با دمای بالا (جائیکه سرعت متوسط تحرک مولکولی بالاست) به ناحیه‌ای که دمای پائین‌تری دارد، جریان پیدا کند. گرچه اختلاف دما می‌تواند بین محیط داخل و بیرون سلولی وجود داشته باشد ولی این شیب حرارتی معمولاً به عنوان منبع انرژی برای فعالیت‌های سلول عمل نمی‌کند. انرژی حرارتی جانوران خونگرم (جانورانی که مکانیسم تنظیم دمایی تکامل یافته‌ای دارند) به طور عمده جهت نگهداری دمای بدن در حد ثابت، مصرف می‌شود. این عمل مهمی است زیرا سرعت بیشتر فعالیت‌های درون سلولی وابسته به دما است. به عنوان مثال سرد کردن سلول‌های پستانداران از دمای عادی بدنشان یعنی ۳۷°C به ۴°C می‌تواند اغلب فرآیندهای سلولی (همچون تحرکات داخل غشایی) را ثابت نگه داشته یا متوقف نماید.

انرژی تابشی[4] انرژی جنبشی فوتون‌ها (یا امواج نور) بوده و برای زیست‌شناسی، حیاتی است. انرژی تابشی می‌تواند به انرژی حرارتی تبدیل شود. این امر زمانی اتفاق می‌افتد که نور توسط مولکول‌ها جذب شده و انرژی به جنبش مولکولی تبدیل شود. انرژی تابشی جذب شده بوسیله مولکول‌ها همچنین می‌تواند ساختار الکترونی مولکول‌ها را تغییر داده و باعث حرکت الکترون‌ها به سطوح بالاتر انرژی (اربیتال‌ها)گردد و سپس بازیابی شده و باعث انجام کار شود. به عنوان مثال، طی فتوسنتز، انرژی نورانی بوسیله مولکول‌های ویژه‌ای (همچون کلروفیل) جذب شده، سپس به صورت انرژی پیوندهای شیمیایی تبدیل می‌شود (فصل ۱۲).

انرژی مکانیکی[5]، فرم اصلی انرژی جنبشی در زیست‌شناسی بوده و معمولاً حاصل تبدیل انرژی ذخیره شده شیمیایی است. به عنوان مثال، تغییر در طول رشته‌های اسکلت سلولی نیرویی تولید می‌کند که بر روی غشاها و اندامک‌ها کشش و فشار ایجاد می‌کند (فصل‌های ۱۷ و ۱۸).

انرژی الکتریکی[6]، انرژی حرکت الکترون‌ها یا سایر ذرات باردار بوده و شکل دیگری از انرژی جنبشی است.

اشکال مختلف انرژی پتانسیل از لحاظ زیست شناختی مهم‌اند. شکل عمده انرژی پتانسیل در زیست‌شناسی **انرژی پتانسیل شیمیایی** است، این انرژی در پیوندهای ارتباط دهنده اتم‌ها در درون مولکول‌ها ذخیره می‌شود.

در واقع اغلب واکنش‌های شیمیایی در این کتاب شامل واکنش‌هایی است که در آنها حداقل یک پیوند کووالان شیمیایی تشکیل یا شکسته می‌شود. هنگامیکه مواد شیمیایی تحت واکنش‌های آزاد سازی انرژی قرار می‌گیرند، ما این انرژی پتانسیل شیمیایی را درک

1- Kinetic energy
2- Potential energy
3- Thermel energy
4- Radiant energy
5- Mechanical energy
6- Electric energy

می‌کنیم. به عنوان مثال، انرژی پتانسیل بالا در پیوندهای کووالان گلوکز می‌تواند توسط احتراق آنزیمی کنترل شده در سلول آزاد شود (فصل ۱۲). این انرژی توسط سلول مهار می‌شود تا کارهای مختلفی انجام دهد.

شکل دوم انرژی پتانسیل و مهم از لحاظ زیست شناختی، انرژی موجود در **شیب غلظت**[1] است. هنگامیکه غلظت ماده‌ای در یک طرف از سدی همچون غشا با طرف دیگرش متفاوت باشد، شیب غلظت ایجاد می‌شود. همه سلول‌ها با تبادل انتخابی مواد مغذی، محصولات زائد و یون‌ها با محیط اطرافشان، شیب غلظتی بین درون خود با مایعات بیرون سلولی ایجاد می‌کنند. همچنین اندامک‌های درون سلول‌ها (همچون میتوکندری و لیزوزوم) اغلب حاوی غلظت‌های متفاوتی از یون‌ها و مولکول‌های دیگر می‌باشند؛ همانطوریکه در بخش بعدی خواهیم دید، غلظت پروتون‌ها در درون لیزوزوم‌ها حدوداً ۵۰۰ برابر شکل سیتوپلاسم است.

فرم سوم انرژی پتانسیل در سلول‌ها، **پتانسیل الکتریکی** است. این انرژی در اثر جداشدن مواد باردار ایجاد می‌شود. به عنوان مثال شیب بار الکتریکی حدود ۲۰۰/۰۰۰ ولت در هر سانتیمتر از غشا پلاسمایی اغلب سلول‌ها وجود دارد. در فصل ۱۱ چگونگی ایجاد شیب غلظت و اختلاف پتانسیل را در عرض غشا مورد بحث قرار می‌دهیم و در فصل ۱۲ چگونگی تبدیل آن‌ها به انرژی پتانسیل شیمیایی را مطالعه می‌کنیم.

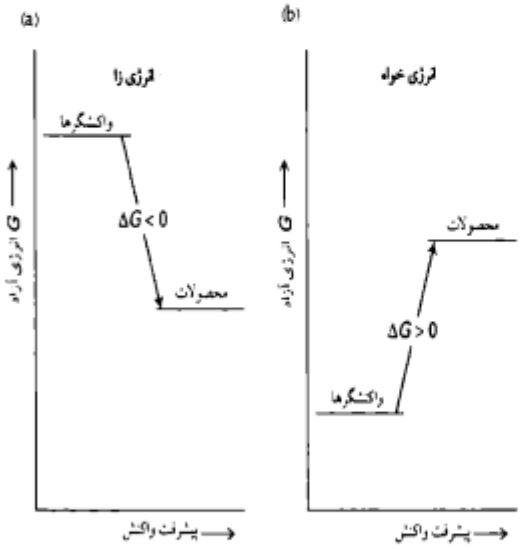
سلول‌ها می‌توانند یک نوع انرژی را به نوع دیگر تبدیل کنند

براساس قانون اول ترمودینامیک، انرژی نه به وجود می‌آید و نه از بین می‌رود بلکه از شکلی به شکل دیگر تبدیل می‌شود (در واکنش‌های هسته‌ای، جرم به انرژی تبدیل می‌شود اما این درباره سیستم‌های زنده صادق نیست). به عنوان مثال، در فتوسنتز انرژی تابشی نور به انرژی پتانسیل شیمیایی پیوندهای کووالان بین اتم‌ها در مولکول ساکارز یا نشاسته تبدیل می‌شود. در ماهیچه‌ها و اعصاب، انرژی پتانسیل شیمیایی ذخیره شده در پیوندهای کووالان به ترتیب به انرژی جنبشی انقباض ماهیچه و انرژی الکتریکی انتقال عصبی تبدیل می‌شود. در همه سلول‌ها انرژی پتانسیل، تا شکست پیوندهای شیمیایی خاص آزاد شده و برای تولید انرژی پتانسیل به صورت شیب غلظت و پتانسیل الکتریکی مصرف می‌شود. همچنین انرژی ذخیره شده در شیب غلظت شیمیایی یا شیب پتانسیل الکتریکی برای ساخت پیوندهای شیمیایی و یا برای انتقال مولکول‌ها از یک طرف به طرف دیگر غشا استفاده می‌شود. این فرآیند انتقال مولکول‌ها باعث ایجاد شیب غلظت می‌شود و فرآیندی است که طی انتقال مواد غذایی همچون گلوکز به درون سلول و محصولات زائد به بیرون سلول، رخ می‌دهد.

چون همه اشکال انرژی قابل تبدیل به همدیگرند، آن را می‌توان با یک واحد اندازه‌گیری بیان کرد. با اینکه واحد استاندارد انرژی ژول[2] است، بیوشیمیدان‌ها معمولاً از واحد جایگزین آن یعنی **کالری** (کالری ۱=۰/۲۳۹ ژول) استفاده می‌کنند. در این کتاب برای اندازه‌گیری تغییرات انرژی از کیلوکالری (۱kcal=۱۰۰۰cal) استفاده می‌کنیم.

تغییر انرژی آزاد، جهت واکنش شیمیایی را نشان می‌دهد

چون سیستم‌های زیستی عموما در دما و فشار ثابت نگهداری می‌شوند، از روی تغییر در **انرژی آزاد G**[3] می‌توان جهت واکنش شیمیایی را پیش بینی کرد. انرژی آزاد G از اسم J.W.Gibbs گرفته شده است. او کسی بود که نشان داد «همه سیستم‌ها در جهتی تغییر می‌یابند تا انرژی آزادشان [G] کاهش یابد». در مورد واکنش شیمیایی، محصولات ⇔ واکنشگرها تغییر انرژی آزاد بصورت زیر است:



▲ **شکل ۲۹-۲ تغییرات انرژی آزاد (ΔG) واکنش‌های انرژی خواه و انرژی‌زا.** (a) در واکنش‌های انرژی زا، انرژی آزاد محصولات پائین‌تر از واکنشگرهاست. در نتیجه این واکنش‌ها بطور خودبخودی انجام شده و با انجام واکنش انرژی آزاد خواهد شد. (b) در واکنش‌های انرژی

1- Concentration gradiant

2- Joole

3- Free energy G

خود. انرژی آزاد محصولات بیشتر از واکنشگرهاست و این واکنش‌ها بطور خودبخودی انجام نمی‌گیرند. در این نوع واکنش‌ها یک منبع انرژی بیرونی بایستی انرژی لازم را جهت تبدیل واکنشگرها به محصولات تامین کند.

$$\Delta G = G_{\text{محصولات}} - G_{\text{واکنشگرها}}$$

ارتباط ΔG با واکنش شیمیایی می‌تواند در سه جمله زیر خلاصه شود:

■ اگر ΔG منفی باشد واکنش رفت، تمایل خواهد داشت که بطور خودبخودی انجام گیرد و معمولاً با انجام واکنش، انرژی آزاد خواهد شد (**واکنش انرژی‌زا**[1]) (شکل ۲۹-۲).

■ اگر ΔG مثبت باشد، واکنش رفت بطور خودبخود رخ نخواهد داد: یعنی به منظور تبدیل واکنشگرها به محصولات بایستی به سیستم انرژی داده شود (**واکنش انرژی‌خواه**[2]).

■ اگر ΔG صفر باشد، واکنش‌های رفت و برگشت دارای سرعت یکسان هستند و تبدیل خودبخودی واکنشگرها به محصولات (یا بالعکس) وجود نخواهد داشت، یعنی سیستم در حال تعادل است.

بطوری قراردادی، تغییر انرژی آزاد استاندارد یک واکنش ($\Delta G^{\circ\prime}$) مقدار تغییر انرژی آزاد تحت شرایط ۲۹۸ کلوین (۲۵°c)، فشار ۱ اتمسفر، pH۷/۰ (pH آب خالص) و غلظت اولیه ۱M برای همه واکنشگرها و محصولات به استثنای پروتون می‌باشد (غلظت پروتون در pH۷/۰ در حد 10^{-7}M است). اغلب واکنش‌های زیستی با شرایط‌استاندارد متفاوتند، مخصوصا غلظت واکنشگرها که معمولاً کمتر از ۱M است.

انرژی آزاد سیستم شیمیایی می‌تواند بصورت $G=H-TS$ تعریف شود که در آن H انرژی پیوند یا **آنتالپی**[3] سیستم، T دما برحسب درجه کلوین (K) و S، **آنتروپی**[4] است. آنتروپی میزان تصادفی بودن یا بی‌نظمی سیستم را نشان می‌دهد. اگر دما ثابت باشد، واکنش فقط زمانی خودبخود پیش می‌رود که تغییر انرژی آزاد آن برطبق معادله زیر منفی باشد:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (۲-۶)$$

در واکنش **گرماده**[5]، محصولات انرژی پیوندی کمتری نسبت به واکنشگرها داشته و انرژی آزاد شده معمولاً به گرما تبدیل می‌شود (انرژی جنبش مولکولی) و ΔH منفی است. در واکنش **گرماگیر**[6]، محصولات انرژی پیوندی بیشتری نسبت به واکنشگرها دارند، طی واکنش گرما جذب می‌شود و ΔH مثبت است. ترکیب نمودن اثرات تغییرات آنتالپی و آنتروپی، مثبت یا منفی بودن ΔG در یک واکنش را تعیین می‌کند. یک واکنش گرماده ($\Delta H<0$) که در آن آنتروپی فزایش می‌یابد ($\Delta S>0$) بطور خودبخودی انجام می‌گیرد ($\Delta G<0$). یک واکنش گرماگیر ($\Delta H>$) تنها زمانی بطور خودبخود خواهد بود که ΔS به اندازه کافی افزایش یابد تا $T\Delta S$ بر اثرات ΔH غلبه کند.

اغلب واکنش‌های زیست شناختی منجر به افزایش نظم یا کاهش آنتروپی ($\Delta S<0$) می‌شوند. یک مثال آشکار، واکنش اتصال اسیدهای آمینه برای ساخت پروتئین می‌باشد. یک محلول حاوی مولکول‌های پروتئین، آنتروپی کمتری نسبت به محلول اسیدهای آمینه سازنده‌اش دارد زیرا تحرک اسیدهای آمینه در پروتئین هنگامیکه در درون زنجیره طویل پروتئین قرار می‌گیرند، محدود می‌شود. اغلب سلول‌ها با «مزدوج کردن» چنین واکنش سنتزی که باعث کاهش آنتروپی می‌شود با یک واکنش مستقل حاوی ΔG بسیار منفی، کاهش آنتروپی را جبران می‌کنند. در این روش سلول‌ها می‌توانند منابع انرژی محیطشان را به صورت سنتز ساختارهای سازمان یافته و مسیرهای متابولیکی ضروری برای حیات، صرف نمایند.

تغییر در انرژی آزاد ΔG طی یک واکنش بوسیله دما، فشار و غلظت اولیه واکنشگرها و محصولات تحت تاثیر قرار می‌گیرد و معمولاً متفاوت از $\Delta G^{\circ\prime}$ است. اغلب واکنش‌های زیستی (مثل سایر واکنش‌هایی که در محلول‌های آبی انجام می‌شوند) بوسیله pH محلول نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرند. با استفاده از فرمول زیر ما می‌توانیم تغییرات انرژی آزاد را در دماها و غلظت‌های اولیه تخمین بزنیم:

(۲ - ۷)

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT\ln Q = \Delta G^{\circ\prime} + RT\ln \frac{\text{محصولات}}{\text{واکنشگرها}}$$

در اینجا R ثابت گازها است و مقدارش ۱/۹۸۷cal/(degree,mol) می‌باشد. T، دما (در مقیاس کلوین) است و Q نسبت اولیه محصولات به واکنشگرهاست. برای واکنش $A+B \leftrightarrow C$ که در آن دو مولکول ترکیب می‌شوند تا مولکول سوم را ایجاد نمایند، Q در معادله ۷-۲ مساوی با $[C]/[A][B]$ خواهد بود، در این مورد، افزایش غلظت [A] یا [B] باعث منفی‌تر شدن مقدار ΔG خواهد شد و بنابراین واکنش در جهت تشکیل C پیش خواهد رفت.

بدون توجه به $\Delta G^{\circ\prime}$ برای یک واکنش بیوشیمیایی، این واکنش زمانی در داخل سلول بطور خودبخودی خواهد بود که با غلظت‌های واکنشگرها و محصولات داخل سلول، ΔG منفی باشد. به عنوان مثال تبدیل گلیسرآلدئید ۳-فسفات (G3P) به دی هیدروکسی

1- Exergonic reaction
2- Endergonic reaction
3- Enthalpy
4- Entropy
5- Exothermic
6- Endothermic

استون فسفات (DHAP) (دو حدواسط مسیر شکسته شدن گلوکز):

G3P↔DHAP

دارای $\Delta G^{\circ\prime}$، ۱۸۴۰cal/mol- است. اگر غلظت اولیه G3P و DHAP برابر باشد، چون RTln=0 است پس $\Delta G=\Delta G^{\circ\prime}$ می‌شود. در اینجا، واکنش برگشت‌پذیر G3P↔DHAP در جهت تشکیل DHAP تا زمان رسیدن به تعادل، بطور خودبخودی پیش خواهد رفت. با این حال در صورتیکه غلظت اولیه [DHAP]، ۰/۱M و [G3P]، ۰/۰۰۱M (با شرایط استاندارد دیگر) باشد، Q در معادله ۷-۲ برابر با ۱۰۰=۰/۱/۰/۰۰۱ خواهد بود که باعث می‌شود ΔG برابر با ۸۸۷cal/mol+ گردد. تحت چنین شرایطی واکنش در جهت تشکیل G3P پیش خواهد رفت.

ΔG یک واکنش، مستقل از سرعت واکنش است. در واقع تحت شرایط معمول فیزیولوژیک، فقط تعداد بسیار اندکی از واکنش‌های بیوشیمیایی ضروری برای حیات که نیازی به مکانیسم افزایش سرعت واکنش ندارند، انجام خواهند گرفت. همانطوریکه در زیر و در فصل ۳ توضیح خواهیم داد، سرعت واکنش‌ها در سیستم‌های زیستی بوسیله فعالیت **آنزیم‌ها**[1]، تعیین می‌شود. آنزیم‌ها کاتالیزورهای پروتئینی هستند که سرعت تشکیل محصولات از واکنشگرها را بدون تغییر ΔG، افزایش می‌دهند.

$\Delta G^{\circ\prime}$ واکنش می‌تواند از K_{eq} آن محاسبه شود

یک مخلوط شیمیایی در حال تعادل با داشتن انرژی آزاد کم، در حالت پایدار است. برای یک سیستم در حال تعادل ($\Delta G=0$، $Q=K_{eq}$)، تحت شرایط استاندارد می‌توان نوشت:

$$\Delta G^{\circ\prime}=-2.3RT\log K_{eq}=-1362\log K_{eq} \quad (۲-۸)$$

(توجه نمائید که لگاریتم به لگاریتم ۱۰ تایی تغییر یافته). بنابراین اگر ما غلظت واکنشگرها و محصولات را در حالت تعادل تعیین نمائیم، می‌توانیم مقدار $\Delta G^{\circ\prime}$ را محاسبه کنیم. به عنوان مثال، K_{eq} برای تبدیل گلیسرآلدئید ۳-فسفات به دی هیدروکسی استون فسفات (G3P↔DHAP) تحت شرایط استاندارد، ۲۲/۲ است. با جاگذاری این مقدار در معادله ۸-۲ براحتی می‌توانیم $\Delta G^{\circ\prime}$ این واکنش که ۱۸۴۰cal/mol- است را محاسبه نمائیم.

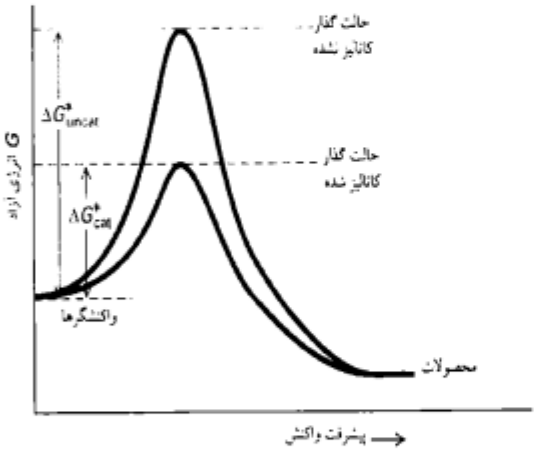
با آرایش مجدد رابطه ۸-۲ و گرفتن آنتی لگاریتم معادله زیر بدست می‌آید:

$$Keq=10^{-(\Delta G^{\circ\prime}/2.3RT)} \quad (۲-۹)$$

با توجه به این معادله می‌توان دریافت که اگر $\Delta G^{\circ\prime}$ منفی باشد، توان مثبت و در نتیجه K_{eq} بزرگتر از ۱ خواهد بود. بنابراین در حالت تعادل مقدار محصولات بیشتر از واکنشگرها خواهد بود. به بیان دیگر، تشکیل محصولات از واکنشگرها مساعدتر است. بالعکس اگر $\Delta G^{\circ\prime}$ مثبت باشد، توان منفی و K_{eq} کمتر از ۱ خواهد بود.

سرعت واکنش به انرژی فعال سازی وابسته است و واکنشگرها باید به حالت گذار برسند

طی پیشرفت واکنش شیمیایی، واکنشگرها به هم نزدیک شده، بعضی از پیوندها شروع به تشکیل و بعضی دیگر شروع به شکستن می‌کنند. یک عقیده درباره حالت مولکول‌ها در طی این گذر، وجود فشارهایی در ساختار الکترونی اتم‌ها و پیوندها می‌باشد. برای اینکه مجموعه‌ای از اتم‌ها طی واکنش از حالت نسبتاً پایدار واکنشگرها به این حالت حدواسط منتقل شوند، به مقداری انرژی نیاز دارند. این انرژی در نمودار انرژی واکنش در شکل ۳۰-۲ نشان داده شده است. بنابراین مجموعه‌ای از اتم‌ها در نقاطی از واکنش بصورت گذرا



▲ **شکل ۳۰-۲ (شکل رنگی) انرژی فعال سازی واکنش‌های کاتالیز شده و کاتالیز نشده.** این مسیر فرضی واکنش (آبی) تغییرات انرژی آزاد را در طول یک واکنش نشان می‌دهد. اگر انرژی آزاد (G) محصولات کمتر از واکنشگرها باشد ($\Delta G<0$)، واکنش بطور خودبخودی انجام می‌شود. با این حال همه واکنش‌های شیمیایی از یک یا چند حدواسط با انرژی بالا می‌گذرند و سرعت یک واکنش نسبت معکوسی با انرژی فعالسازی (ΔG) دارد. انرژی فعالسازی حالت گذار تفاوت انرژی بین واکنشگرها و حالت گذار می‌باشد. در واکنش کاتالیز شده (قرمز)، انرژی‌های آزاد واکنشگرها و محصولات تغییر نمی‌کنند بلکه انرژی آزاد حالت گذار کاهش می‌یابد بنابراین سرعت واکنش افزایش می‌یابد.

1- Enzymes

درحالتی هستند که انرژی بالایی دارد. این حالت در طی واکنش شیمیایی که در آن سیستم در بالاترین سطح انرژی خود است، **حالت گذار**[1] یا **حالت گذار حدواسط**[2] نامیده می‌شود. انرژی لازم جهت برانگیختن واکنشگرها به این حالت بالای انرژی، **انرژی فعال سازی**[3] واکنش نامیده می‌شود. انرژی فعال سازی مثل تغییر در انرژی آزاد گیبس (ΔG) با $\Delta G^{\ddagger}$ نشان داده می‌شود. مجموعه‌ای از اتم‌ها می‌توانند با آزاد کردن انرژی از حالت گذار به محصولات تبدیل شوند و یا با آزاد نمودن انرژی، به عقب برگشته و واکنشگرهای اولیه را دوباره تشکیل دهند. سرعت (v) تشکیل محصولات از واکنشگرها تحت شرایط مشخص (دما، فشار، غلظتهای واکنشگرها) به غلظت مواد در حالت گذار وابسته است. غلظت مواد در حالت گذار نیز به انرژی فعالسازی و ثابت سرعت (v) خاصی وابسته است. مواد از حالت گذار با ثابت سرعت (v) خاصی به محصولات تبدیل می‌شوند. هر قدر انرژی فعال سازی بیشتر باشد، مقدار واکنشگرهای کمتری به حالت گذار می‌رسند و در نتیجه سرعت کلی واکنش کمتر خواهد بود. ارتباط بین غلظت واکنشگرها، (v) و V بصورت زیر است:

$$V = \nu[\text{reactants}]\times 10^{-(\Delta G^{\ddagger}/2.3RT)}$$

از این معادله می‌توان دریافت، کاهش در انرژی فعال سازی (که انرژی آزاد حالت گذار ($\Delta G^{\ddagger}$) را کاهش می‌دهد) منجر به شتاب گرفتن سرعت واکنش کل (V) می‌شود. کاهش به اندازه ۱/۳۶cal/mol در $\Delta G^{\ddagger}$ منجر به افزایش ده برابر در سرعت واکنش می‌شود. همچنین کاهش به اندازه ۲/۷۲cal/mol سرعت واکنش را ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد. بنابراین تغییرات نسبتاً کوچک در $\Delta G^{\ddagger}$ می‌تواند منجر به تغییرات بزرگی در سرعت کلی واکنش گردد.

کاتالیزورها، مثلا آنزیم‌ها (فصل ۳) سرعت واکنش را باکاهش انرژی نسبی حالت گذار و انرژی فعال سازی شتاب می‌دهند (به شکل ۳۰-۲ را ملاحظه کنید). انرژی‌های نسبی واکنشگرها و محصولات تعیین خواهد کرد که آیا یک واکنش از لحاظ ترمودینامیکی مساعد است (ΔG منفی)، در حالیکه انرژی فعالسازی، سرعت تشکیل محصولات (سینتیک واکنش) را تعیین خواهد کرد. واکنش‌های مساعد از لحاظ ترمودینامیکی، اگر دارای انرژی فعال سازی خیلی بالایی باشند، انجام نخواهند شد.

حیات وابسته به واکنش‌هایی است که حاصل ادغام واکنش‌های شیمیایی مساعد و نامساعد از لحاظ انرژی می‌باشد

اغلب فرآیندها در سلول‌ها از لحاظ انرژی نامساعد ($\Delta G>$) بوده و بطور خودبخودی انجام نمی‌شوند، به عنوان مثال، سنتز DNA از نوکلئوتیدها و انتقال مواد در عرض غشا پلاسمایی از غلظت پایین به طرف غلظت بالاتر مواد. سلول‌ها می‌توانند با ادغام کردن واکنش‌های نیازمند به انرژی یا انرژی خواه ($\Delta G>0$) با واکنش‌های آزاد کننده انرژی یا انرژی زا ($\Delta G<0$)، این واکنش‌ها را انجام دهند. در این صورت دو واکنش در مجموع، ΔG منفی خواهد داشت. به عنوان مثال فرض کنید، واکنش $A \leftrightarrow B+X$، ΔG برابر با +۵kcal/mol دارد و واکنش $X \leftrightarrow Y+Z$، ΔG برابر با ۱۰kcal/mol- دارد:

$$(1) \quad A \rightleftharpoons B+X \qquad \Delta G = +5 \text{ kcal/mol}$$

$$(2) \quad X \rightleftharpoons Y+Z \qquad \Delta G = -10 \text{ kcal/mol}$$

$$\text{sum: } A \rightleftharpoons B + Y + Z \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -5 \text{ kcal/mol}$$

در غیاب واکنش دوم، در حالت تعادل مقدار زیادی A نسبت به B وجود خواهد داشت اما با تبدیل X به Y+Z که واکنش مساعدی از لحاظ انرژی است، این عمل باعث خواهد شد، فرآیند اول به طرف تولید B و مصرف A تمایل یابد. همچنانکه بعدا توضیح خواهیم داد، واکنش‌های نامساعد از لحاظ انرژی اغلب با انرژی آزاد شده از هیدرولیز ATP ادغام می‌شوند.

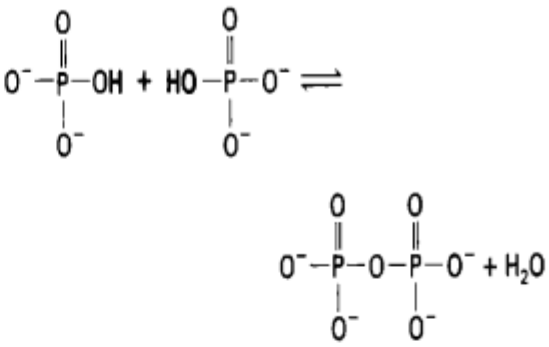
هیدرولیز ATP انرژی آزاد زیادی آزاد می‌کند و باعث انجام اغلب فرآیندهای سلولی می‌شود

در همه موجودات زنده، **آدنوزین‌تری فسفات** یا ATP، مهمترین مولکول در گرفتن، ذخیره موقت و سپس انتقال انرژی برای انجام کار (مثل بیوسنتز، تحرک مکانیکی) می‌باشد. انرژی قابل استفاده در مولکول ATP در **پیوندهای فسفوانیدرید** موجود است. این پیوندها، پیوندهای کووالان بوده و بوسیله متراکم شدن مولکول‌های فسفات طی از دست دادن مولکول آب، تشکیل می‌شوند:

1- Transition State

2- Transition State intermediate

3- Activation energy



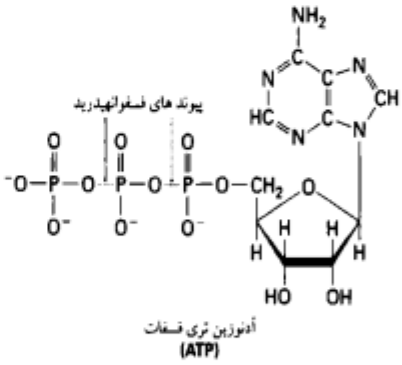
یک مولکول ATP دو پیوند فسفوانیدرید کلیدی (که فسفودی استر نیز نامیده می‌شود)، دارد (شکل ۳۱-۲). هیدرولیز یک پیوند فسفوانیدرید (~) در هر کدام از واکنش‌های زیر $\Delta G^{\circ\prime}$ منفی در حدود ۷/۳Kcal/mol- دارد:

$$Ap{\sim}p{\sim}p + H_2O \rightarrow Ap{\sim}p + P_i + H^+$$

(ATP) **(ADP)**

$$Ap{\sim}p{\sim}p + H_2O \rightarrow Ap{\sim}p + PP_i + H^+$$

(ATP) **(AMP)**



شکل ۳۱-۲- آدنوزین‌تری فسفات (ATP) دو پیوند فسفوانیدرید (قرمز) در ATP که سه گرو فسفات را به هم متصل می‌کنند هر کدام برای هیدرولیز شدن، ΔG° در حدود ۷/۳kcal/mol- دارند. هیدرولیز این پیوندها، مخصوصا فسفات انتهایی، منبع انرژی بوده و باعث انجام اغلب واکنش‌های نیازمند به انرژی در سیستم‌های زیستی می‌شود.

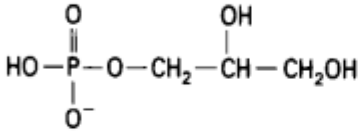
$$Ap{\sim}p + H_2O \rightarrow Ap + P_i + H^+$$

(ADP) **(AMP)**

در این واکنش‌ها، Pi نشان‌دهندهٔ فسفات معدنی (PO_4^{3-}) و PPi نشان‌دهندهٔ پیروفسفات معدنی است. در پیروفسفات معدنی، دو گروه فسفات بوسیله پیوند فسفوانیدرید به هم متصل می‌شوند.

همانطوریکه در دو واکنش بالا نشان داده شده، برداشت گروه فسفات یا پیروفسفات از ATP، به ترتیب باعث ایجاد آدنوزین دی فسفات (ADP) یا آدنوزین مونوفسفات (AMP) می‌شود.

یک پیوند فسفوانیدرید یا **پیوند پرانرژی**[1] دیگر (معمولاً با~ نشان داده می‌شود) ذاتاً تفاوتی با پیوندهای کووالان ندارند. پیوندهای پرانرژی هنگامیکه بوسیله افزوده شدن مولکول آب (هیدرولیز) شکسته می‌شوند، مقدار زیادی انرژی آزاد می‌کنند. به عنوان مثال $\Delta G^{\circ\prime}$ هیدرولیز پیوند فسفوانیدرید در ATP(۷/۳kcal/mol-) حدودا سه برابر $\Delta G^{\circ\prime}$ هیدرولیز پیوند فسفواستر در گلیسرول فسفات (۲/۲kcal/mol-) است:



گلیسرول ۳-فسفات

دلیل اصلی برای این تفاوت در انرژی پیوندها این است که ATP و محصولات هیدرولیز آن یعنی ADP و Pi در pH خنثی شدیدا باردار هستند. طی سنتز ATP، مقدار انرژی زیادی لازم است تا دو مولکول ADP و Pi با بار منفی را کنار هم قرار دهد. بالعکس هنگامیکه ATP به ADP به Pi هیدرولیز می‌شود، انرژی خیلی زیادی آزاد می‌شود. در عوض تشکیل پیوند فسفواستر بین هیدروکسیل بی بار در گلیسرول و Pi انرژی کمتری نیاز داشته و در هنگام هیدرولیز این پیوند، انرژی کمتری آزاد می‌شود.

سلول‌ها دارای مکانیسم‌هایی هستند که توسط پروتئین میانجی‌گری می‌شوند و انرژی آزاد حاصل از هیدرولیز پیوندهای فسفوانیدرید را به مولکول‌های دیگر منتقل کرده و باعث انجام واکنش‌هایی می‌گردند که از لحاظ انرژیتیکی نامساعد هستند. به عنوان مثال اگر ΔG واکنش B+C→D مثبت و کمتر از ΔG هیدرولیز ATP باشد، واکنش بوسیله جفت شدن با هیدرولیز پیوند فسفوانیدرید انتهایی ATP می‌تواند به طرف راست جهت یابد. در یک مکانیسم عمومی همچون **جفت شدن انرژی**[2]، مقدار انرژی ذخیره شده در پیوند فسفوانیدرید به یکی از واکنشگرها منتقل می‌شود. این عمل بوسیله شکستن پیوند ATP و تشکیل پیوند کووالان بین گروه فسفات آزاد شده و یکی از واکنشگرها انجام می‌شود. سپس حدواسط فسفریله ایجاد شده در این مسیر می‌تواند با C واکنش داده و طی یک واکنش با ΔG منفی، D+Pi را تشکیل دهد:

1- High-energy bond 2- Energy Coupling

$$B+ATP \rightarrow B\sim p+ADP$$

$$B\sim p+C \rightarrow D+Pi$$

واکنش کلی:

$$B+C+ATP \rightarrow D+ADP+Pi$$

که از لحاظ انرژتیک مساعد است ($\Delta G<0$).

یک مکانیسم جایگزین برای جفت شدن انرژی، استفاده از انرژی آزاد شده از هیدرولیز ATP برای تغییر ساختار مولکول می‌باشد. در این مکانیسم کونفورماسیون مولکول به حالت فشرده «غنی از انرژی[1]» تغییر می‌یابد. سپس انرژی ذخیره شده به صورت فشار ساختاری می‌تواند آزاد شده و مولکول به ساختار اولیه خود برگشته و آسایش یابد. اگر این فرآیند آسایش با واکنش دیگری جفت شود، انرژی آزاد شده برای انجام فرآیندهای سلولی مورد استفاده قرارمی‌گیرد.

انتقال مولکول‌ها به داخل یا بیرون سلول، به همراه بسیاری از واکنش‌های بیوسنتزی اغلب دارای ΔG مثبت بوده و بنابراین برای انجام نیاز به انرژی دارند. چنین واکنش‌های انتقالی ساده بطور **مستقیم** درگیر شکست یا تشکیل پیوند نمی‌شوند بنابراین $\Delta G^{\circ\prime}$ آنها صفر است. در مورد موادی که به طرف درون سلول حرکت می‌کنند، رابطه ۷-۲ به صورت زیر درمی‌آید:

$$\Delta G=RT\ln\frac{[C_{\text{درون}}]}{[C_{\text{بیرون}}]} \qquad (۲-۱۰)$$

$[C_{\text{درون}}]$ غلظت اولیه مواد در طرف داخل سلول و $[C_{\text{بیرون}}]$، غلظت مواد در طرف بیرون سلول است. ما از روی رابطه ۱۰-۲ می‌توانیم دریابیم که ΔG انتقال ماده‌ای به درون سلول در جهت خلاف شیب غلظت‌اش منفی است (وقتی $[C_{\text{بیرون}}]>[C_{\text{درون}}]$ باشد). انرژی مورد نیاز برای چنین انتقال رو به بالا، اغلب بوسیله هیدرولیز ATP تامین می‌شود. بالعکس هنگامیکه ماده‌ای در جهت شیب غلظت حرکت کند ($[C_{\text{بیرون}}]<[C_{\text{درون}}]$)، ΔG منفی است. چنین انتقال «رو به پایین» انرژی آزاد می‌کند. این انرژی می‌تواند با یک واکنش نیازمند به انرژی جفت شود. این واکنش می‌تواند حرکت یک ماده از غشا در جهت خلاف شیب غلظت یا سنتز ATP باشد. (فصل‌های ۱۱ و ۱۲ را ملاحظه کنید).

ATP طی فتوسنتز و تنفس ساخته می‌شود

واضح است که برای ادامه فعالیت، سلول بایستی به طور مداوم ATP مورد نیازش را تامین نماید. تقریباً در همه سلول‌ها، منبع اولیه انرژی، انرژی است که در نهایت به پیوندهای فسفوانیدرید ATP منتقل می‌شود. در سایر ترکیبات منبع اولیه انرژی در پیوندها، نور خورشید است. در **فتوسنتز**، گیاهان و همچنین میکروارگانیسم‌های خاصی می‌توانند انرژی موجود در نور را به دام انداخته و از آن برای ساخت ATP از ADP و Pi استفاده نمایند، مقدار زیادی از ATP تولید شده در فرایند فتوسنتز هیدرولیز می‌شود تا انرژی لازم جهت تبدیل دی اکسید کربن به قندهای شش کربنه را تامین نماید. این فرآیند **تثبیت کربن**[2] نامیده می‌شود.

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{ATP\ \ ADP + P_i} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

در جانوران، انرژی آزاد قندها و سایر مولکول‌های موجود در غذا طی فرآیند تنفس، رها می‌شود. سنتز ATP در سلول‌های جانوری و میکروارگانیسم‌های غیرفتوسنتزی حاصل تغییر پیوندهای غنی از انرژی در ترکیبات موجود در رژیم غذایی (همچون، گلوکز، نشاسته) می‌باشد. ما مکانیسم‌های فتوسنتز و تنفس سلولی را در فصل ۱۲ توضیح می‌دهیم. اکسیداسیون کامل گلوکز که دی اکسید کربن تولید می‌کند،

$$C_7H_{12}O_6+6O_2 \rightarrow 6CO_2+6H_2O$$

این فرایند $\Delta G^{\circ\prime}$برابر با ۶۸۶kcal/mol- دارد و بالعکس تثبیت کربن فتوسنتزی است. سلول‌ها با استفاده از یک سری واکنش‌های پیچیده که توسط پروتئین‌ها میانجی‌گری می‌شود، اکسیداسیون یک مولکول گلوکز را با سنتز حدوداً ۳۰ مولکول ATP از ۳۰ مولکول ADP، همراه می‌نمایند. این تجزیه (**کاتابولیسم**[3]) وابسته به اکسیژن (**هوازی**[4]) گلوکز، مسیر اصلی تولید ATP در همه سلول‌های جانوری، سلول‌های گیاهی غیرفتوسنتزی و اغلب سلول‌های باکتریایی است. همچنین کاتابولیسم اسیدهای چرب می‌تواند منبعی مهم برای تولید ATP باشد.

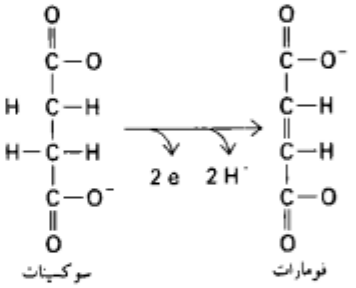
انرژی نورانی که در فتوسنتز گرفته می‌شود، تنها منبع انرژی شیمیایی همه سلول‌ها نیست. میکروارگانیسم‌های خاصی که در اعماق اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند (جائیکه نور خورشید کافی در دسترس نیست) انرژی تولید ATP را از اکسیداسیون ترکیبات معدنی احیا شده به دست می‌آورند. منبع این ترکیبات احیا شده اعماق زمین بوده

1- Energy-rich
2- Carbon fixation
3- Catabolism
4- Aerobic

و در اعماق اقیانوس‌ها رها می‌شوند.

NAD^+ و FAD اغلب واکنش‌های اکسیداسیون و احیای زیستی را با هم جفت می‌نمایند

در اغلب واکنش‌های شیمیایی، الکترون‌ها از یک اتم یا مولکول به اتم یا مولکول دیگر انتقال می‌یابند. این انتقال ممکن است همراه با تشکیل پیوندهای شیمیایی جدیدی باشد و یا انرژی آزاد نماید که می‌تواند با واکنش‌های دیگر جفت شود. از دست رفتن الکترون از یک اتم یا مولکول **اکسیداسیون**[1] و به دست آوردن الکترون **احیا**[2] نامیده می‌شود. چون در یک واکنش شیمیایی الکترون‌ها نه ایجاد می‌شوند و نه از بین می‌روند، اگر یک اتم یا مولکول اکسید شود، اتم یا مولکول دیگر بایستی احیا گردد. به عنوان مثال، اکسیژن الکترون‌ها را از یون‌های Fe^{2+}(فروس) کشیده و یون‌های Fe^{3+}(فریک) را تولید می‌کند. این واکنش، قسمتی از واکنش تجزیه کربوهیدرات‌ها در میتوکندری است. هر اتم اکسیژن دو الکترون



▲ **شکل ۳۲-۲ تبدیل سوکسینات به فومارات.** در این واکنش اکسیداسیون (این واکنش در میتوکندری انجام می‌شود و قسمتی از چرخه اسید سیتریک است) سوکسینات دو الکترون و دو پروتون از دست می‌دهد. این الکترون‌ها و پروتون‌ها به FAD منتقل شده و آن را به فرم $FADH_2$ احیا می‌کنند.

دریافت می‌کند. این الکترون‌ها به وسیله دو یون Fe^{2+} تامین می‌شود:

$$2Fe^{2+}+\frac{1}{2}O_2 \rightarrow 2Fe^{3+}+O^{2-}$$

بنابراین Fe^{2+} اکسید و O_2 احیا می‌شود. چنین واکنش‌هایی که در آنها یک مولکول احیا و دیگری اکسید می‌شود غالبا **واکنش‌های ردوکس**[3] نامیده می‌شوند. در اغلب واکنش‌های ردوکس در سلول‌ها و تحت شرایط هوازی، اکسیژن گیرنده الکترون است.

در اغلب واکنش‌های اکسیداسیون و احیا زیستی به جای انتقال الکترون، اتم هیدروژن (پروتون بعلاوه الکترون) برداشته شده و یا افزوده می‌شود. اکسیداسیون سوکسینات به فومارات که در میتوکندری انجام می‌شود، یک مثال از این نوع واکنش‌هاست (شکل ۳۲-۲).

پروتون‌ها در محلول‌های آبی، محلول هستند (مثل H_3O^+)، اما الکترون‌ها محلول نیستند و بایستی بدون داشتن حدواسط محلول در آب، بطور مستقیم از یک اتم یا مولکول به اتم یا مولکول دیگر منتقل شوند. در این نوع واکنش اکسیداسیون، الکترون‌ها اغلب بوسیله مولکول‌های کوچک حامل الکترون، منتقل می‌شوند، بعضی مواقع این مولکول‌های کوچک به عنوان کوآنزیم شناخته می‌شوند. این حامل‌های الکترون معمولاً NAD^+ (**نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید**[4]) و FAD (**فلاوین دی نوکلئوتید**[5]) هستند که به ترتیب به NADH و $FADH_2$ احیا می‌شوند (شکل ۳۳-۲). اشکال احیا شده این کوآنزیم‌ها می‌توانند پروتون‌ها و الکترون‌ها را به مولکول‌های دیگر منتقل نموده و بنابراین آنها را احیا کنند.

برای توضیح درباره واکنش‌های ردوکس، همچون واکنش یون فروس (Fe^{2+}) و اکسیژن (O_2) بهتر است آنها به دو نیم واکنش تقسیم شوند:

$$Fe^{2+} \text{ اکسیداسیون: } Fe^{2+} \rightarrow 2Fe^{3+}+2e^-$$

$$O_2 \text{ احیا: } 2e^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow O^{2-}$$

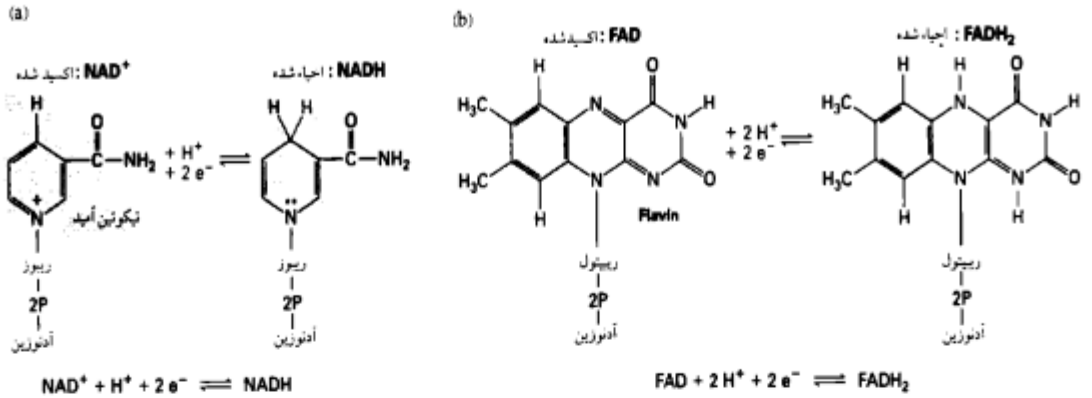
در این مورد، اکسیژن احیا شده (O^{2-}) به راحتی با دو پروتون واکنش داده و یک مولکول آب (H_2O) تشکیل می‌دهد. تمایل یک اتم یا مولکول برای گرفتن الکترون **پتانسیل احیایی**[6] آن (E) است. تمایل از دست دادن الکترون (**پتانسیل اکسیداسیون**[7]) مقدار یکسانی با پتانسیل احیایی دارد با این تفاوت که برای واکنش معکوس، علامت مخالف با پتانسیل احیایی خواهد داشت.

بطور قراردادی پتانسیل نیم واکنش زیر تحت شرایط استاندارد (۲۵°C، اتمسفر و غلظت ۱M واکنشگرها) صفر در نظر گرفته شده و پتانسیل‌های احیایی بصورت اختلاف ولت‌ها با آن اندازه‌گیری می‌شوند.

$$H^+ + e^- \underset{\text{oxidation}}{\overset{\text{reduction}}{\rightleftharpoons}} \frac{1}{2} H_2$$

مقدار E برای یک مولکول یا اتم تحت شرایط استاندارد، پتانسیل احیایی استاندارد آن (E'°) است. تحت شرایط استاندارد مولکول یا یونی با (E'°) مثبت، تمایل بیشتری به الکترون نسبت به یون‌های هیدروژن، دارد. بالعکس، یک مولکول یا یون با (E'°)منفی تمایل کمتری به الکترون‌ها نسبت به یون هیدروژن در شرایط استاندارد

1- Oxidation 2- Reduction
3- Redox realtions
4- Nicotinamide adenine dinucleotide
5- Flavin adenine dinucleotide
6- Reduction potential 7- Oxidation potential



▲ **شکل ۳۳-۲ کوآنزیم‌های حامل الکترون NAD^+ و FAD.** (a) NAD^+ (نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید) با افزوده شدن همزمان دو الکترون و یک هیدروژن به NADH احیا می‌شود. در اغلب واکنش‌های ردوکس زیستی، یک جفت اتم هیدروژن (دو پروتون و دو الکترون) از یک مولکول برداشته می‌شوند. در بعضی موارد یکی از پروتون‌ها به همراه دو الکترون به NAD^+ منتقل شده و پروتون دیگر به داخل محلول آزاد می‌شود. (b) FAD (فلاوین آدنین دی نوکلئوتید) با افزوده شدن دو الکترون و دو پروتون به $FADH_2$ احیا می‌شود. این اتفاق در واکنش تبدیل سوکسینات به فومارات رخ می‌دهد (شکل ۳۲-۲ را ملاحظه کنید). در این واکنش دو مرحله‌ای، در اول با اضافه شدن یک الکترون به همراه یک پروتون، حدواسط سمی کوئینون[1] با طول عمر کوتاه (نشان داده نشده است) تولید می‌شود که الکترون و پروتون دوم را می‌پذیرد.

دارد. مقادیر پتانسیل احیایی استاندارد همچون $\Delta G^{\circ\prime}$، ممکن است بعضی مواقع در سلول متفاوت از مقادیرشان در حالت استاندارد باشد زیرا غلظت واکنشگرها در یک سلول ۱M نیست.

در یک واکنش ردوکس الکترون‌ها بطور خودبخود بطرف اتم‌ها یا مولکول‌های دارای پتانسیل‌های احیایی **مثبت‌تر** حرکت می‌کنند. به عبارت دیگر، ترکیبی که پتانسیل احیایی منفی‌تری دارد می‌تواندالکترون‌ها را به طور خودبخود به ترکیبی با پتانسیل احیایی مثبت‌تر منتقل نماید. در این نوع واکنش، تغییر در پتانسیل الکتریکی (ΔE)، حاصل جمع پتانسیل‌های احیایی و اکسایش دو نیم واکنش است. ΔE برای واکنش ردوکس با تغییر در انرژی آزاد (ΔG) با رابطه زیر مرتبط است:

$$\Delta G\ (\text{مول / کالری}) = -n(23{,}064)\Delta E(\text{ولت}) \quad (۲-۱۱)$$

در اینجا، n تعداد الکترون‌های منتقل شده است، توجه نمائید که واکنش ردوکس با مقدار ΔE مثبت، ΔG منفی دارد و بنابراین واکنش تمایل خواهد داشت بطور خودبخود از چپ به راست حرکت کند.

نکات کلیدی بخش ۴-۲

انرژتیک بیوشیمیایی

■ تغییر در انرژی آزاد (ΔG) معیار بسیار مفیدی برای پیش‌بینی مسیر واکنش‌های شیمیایی در سیستم‌های زیستی است. واکنش‌های شیمیایی تمایل دارند در مسیرهایی با ΔG منفی پیشرفت کنند. اندازه ΔG مستقل از سرعت واکنش است.

■ تغییر انرژی آزاد شیمیایی ($\Delta G^{\circ\prime}$) برابر با $-2/3RT\log K_{eq}$ است. بنابراین بطور عملی با تعیین غلظت واکنشگرها و محصولات در حالت تعادل می‌توان مقدار $\Delta G^{\circ\prime}$ را محاسبه نمود.

■ سرعت واکنش وابسته به انرژی فعال‌سازی است. این انرژی لازم است به واکنشگرها داده شود تا واکنشگرها به حالت گذار برسند. کاتالیزورها مثلاً آنزیم‌ها با کاهش انرژی حالت‌گذار به واکنش‌ها سرعت می‌دهند.

■ واکنش شیمیایی با ΔG مثبت می‌تواند بوسیله جفت شدن با واکنشی که دارای ΔG منفی بزرگتری می‌باشد، انجام گیرد.

■ اغلب فرآیندهایی سلولی که از لحاظ انرژتیک نامساعد هستند از انرژی حاصل از هیدرولیز پیوندهای فسفوانیدرید در مولکول ATP، استفاده می‌کنند.

■ منبع انرژی شیمیایی برای تقریباً همه سلول‌ها، بطور مستقیم یا غیر مستقیم، انرژی نورانی گرفته شده توسط گیاهان و باکتری‌هایی فتوسنتزی طی فتوسنتز می‌باشد.

■ واکنش اکسیداسیون (از دست رفتن الکترون‌ها) همیشه با یک واکنش احیا (به‌دست آوردن الکترون) همراه می‌باشد.

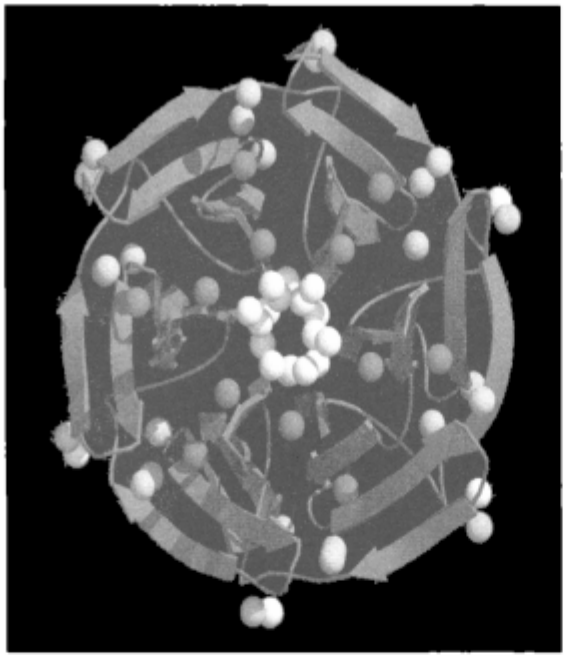
■ واکنش‌های اکسیداسیون و احیا زیستی، اغلب با کوآنزیم‌های حامل الکترون همچون NAD^+ و FAD (شکل ۳۳-۲ را ملاحظه کنید)، جفت می‌شوند.

■ واکنش‌های اکسیداسیون - احیا با ΔE مثبت، ΔG منفی دارند، بنابراین تمایل دارند بطور خودبخودی انجام شوند.

1- Semiquinone

فصل ۳

ساختار و عملکرد پروتئین



نمایی از دمین پروانه‌ای بتا از پروتئین سیگنال دهنده انسانی keapl ده مولکول آب (اشکال کروی) به هر تیغه از شش تیغه پروانه، متصل شده است. اغلب پروتئین‌ها از چندین دمین پروتئینی ساخته شده‌اند. این دمین‌های پروتئینی مستقل و پایدارند.

رئوس مطالب

۳.۱ ساختار پروتئین‌ها

۳.۲ تاخوردگی پروتئین

۳.۳ عملکرد پروتئین

۳.۴ تنظیم عملکرد پروتئین I: تجزیه پروتئین

۳.۵ تنظیم عملکرد پروتئین II: تغییرات کووالان و غیرکووالان

۳.۶ خالص‌سازی، شناسایی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها

۳.۷ پروتئومیکس

پروتئین‌ها پلیمرهایی از اسیدهای آمینه هستند و دارای اندازه و اشکال متفاوتی می‌باشند. تنوع ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها انعکاسی از تفاوت‌های ساختاری آنها بوده و غالباً به دلیل تفاوت در طول و توالی اسیدآمینه‌ای‌شان است. در بعضی موارد این تنوع به دلیل تفاوت در تعداد پیوندهای دی‌سولفیدی یا اتصال مولکول‌های کوچک و یا یون‌ها به زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه پروتئین‌ها، می‌باشد. در کل پلیمر خطی و بدون شاخه از اسیدهای آمینه که پروتئین را تشکیل می‌دهد، به یک یا چند ساختار سه‌بعدی محدود و مرتبط، تا می‌خورد که **ساختمان فضایی**[1] نامیده می‌شود. ساختمان فضایی یک پروتئین به همراه خواص شیمیایی زنجیره‌های اسیدآمینه آن، عملکرد پروتئین را تعیین می‌کند. در نتیجه پروتئین‌ها می‌توانند آرایش حیرت‌آوری از عملکردهای مختلف در درون یا بیرون سلول داشته باشند. این عملکردها یا برای حیات ضروری هستند و یا مزیت تکاملی را برای سلول یا موجودی که آنها را دارند، فراهم می‌نمایند. بنابراین جای تعجب نیست که تعیین ساختار و فعالیت پروتئین‌ها پیش نیاز اصلی در فهم عمل آنها در سلول‌ها باشد. بیشتر این بخش کتاب به بررسی چگونگی عمل پروتئین‌ها با همدیگر اختصاص یافته و نشان می‌دهد که چگونه پروتئین‌ها همکاری می‌کنند تا سلول‌ها قادر به زندگی بوده و به درستی عمل نمایند.

اغلب پروتئین‌ها را می‌توان به چند کلاس محدود ولی با عملکرد گسترده، گروه‌بندی نمود. به عنوان مثال **پروتئین‌های ساختاری**، شکل سلول‌ها و محیط بیرون سلولی آنها را تعیین کرده و همچنین به عنوان کابل‌ها یا ریل‌های راهنما، می‌توانند حرکت درون سلولی مولکول‌ها و اندامک‌ها را جهت‌دهی نمایند. آنها معمولاً به وسیله تجمع چندین زیر واحد پروتئینی به صورت ساختارهای خیلی بزرگ و طویل تشکیل می‌شوند. **پروتئین‌های داربستی**[2]، سایر پروتئین‌ها را به صورت ساختارهای منظمی کنار هم قرار می‌دهند تا پروتئین‌ها، عملکرد اختصاصی خود را به‌طور خیلی مؤثرتر از حالتی که در کنار هم نیستند، انجام دهند. آنزیم‌ها واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند. **پروتئین‌های انتقالی غشاء**[3] اجازه می‌دهند تا یون‌ها و مولکول‌ها از غشاء سلولی جریان یابند. **پروتئین‌های تنظیمی**[4] با تغییر دادن عملکرد پروتئین‌ها و ژن‌های دیگر، به عنوان سیگنال، حسگر و کلید کنترل فعالیت سلول‌ها، عمل

1- Conformation
2- Scaffold proteins
3- Membrone transport proteins
4- Regulatory proteins

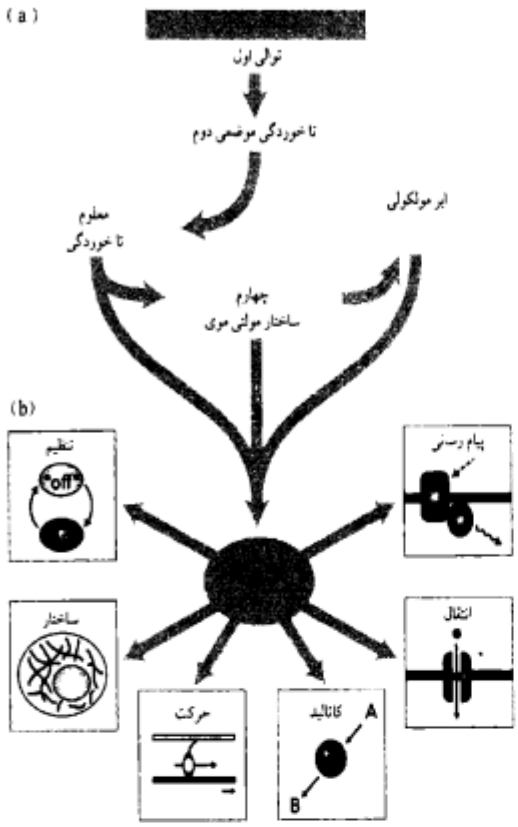
می‌نمایند. این پروتئین‌ها شامل **پروتئین‌های سیگنال‌دهنده**[۱] هم‌چون هورمون‌ها و گیرنده‌های سطح سلول هستند که سیگنال‌های بیرون سلولی را به درون سلول، انتقال می‌دهند. **پروتئین‌های حرکتی**[۲] مسئول حرکت سایر پروتئین‌ها، اندامک‌ها، سلول‌ها و حتی کل موجود زنده هستند. یک پروتئین می‌تواند به بیش از یک کلاس پروتئینی تعلق داشته باشد.

به عنوان مثال در مورد بعضی گیرنده‌های سطح سلول این امر صادق است، آنها هم آنزیم و هم پروتئین تنظیمی هستند، زیرا به وسیله کاتالیز شیمیایی سیگنال‌ها را از خارج سلول به داخل سلول منتقل می‌کنند. برای اینکه اعمال متنوع بطور مؤثر انجام گیرد، بعضی پروتئین‌ها با هم جمع شده و کمپلکس‌های بزرگی تشکیل می‌دهند. این کمپلکس‌ها، **ماشین‌های مولکولی**[۳] نامیده می‌شوند.

چگونه پروتئین‌ها اعمال مختلف را انجام می‌دهند؟ پروتئین‌ها این اعمال را با بهره‌گیری از چند فعالیت ساده انجام می‌دهند. اساسی‌ترین عمل پروتئین‌ها اتصال آنها به یکدیگر یا به ماکرومولکول‌های دیگر هم‌چون DNA و یا به یون‌ها و مولکول‌های کوچک می‌باشد. در اغلب موارد، چنین اتصالی می‌تواند باعث تغییر ساختمان فضایی در پروتئین شود و بنابراین فعالیت آن را تحت تأثیر قرار دهد. همان‌طوری که در فصل ۲ توضیح داده شد، اتصال براساس مکمل شدن مولکولی بین یک پروتئین با شریک اتصالی خود است. فعالیت کلیدی دوم، کاتالیز آنزیمی است. تاخوردگی ویژه پروتئین‌ها، بعضی از زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه و گروه‌های کربوکسیل و آمینی زنجیره پلی‌پپتیدی را در موقعیتی قرار خواهد داد که بتواند نوآرایی پیوند کووالانی را کاتالیز نماید.

فعالیت سوم شامل تاخوردگی پروتئین به صورت کانال یا منفذ درون غشایی می‌باشد که از طریق آنها مولکول‌ها و یون‌ها جریان می‌یابند. با وجود این که این فعالیت‌ها، فعالیت‌های بسیار مهم پروتئین‌هاست، آنها تنها فعالیت پروتئین‌ها نیستند. به عنوان مثال ماهی‌هائی که در آب‌های منجمد (قطب شمال و قطب جنوب) زندگی می‌کنند، در سیستم گردش خون خود پروتئین‌های ضد انجماد دارند که از بلوری شدن آب در دماهای زیر صفر ممانعت می‌کند.

فهم کامل این‌که چگونه پروتئین‌ها به سلول‌ها امکان می‌دهند، زنده مانده و رشد نمایند به شناخت ما از همه پروتئین‌های مورد استفاده سلول بستگی دارد. زیست‌شناسان سلولی مولکولی می‌خواهند اطلاعات مربوط به همه پروتئین‌ها را جمع‌آوری نموده و راهنمایی برای استفاده‌کنندگان بسازند که توضیح دهد چگونه این



▲ **شکل ۱-۳ مروری بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها.** (a) پروتئین‌ها براساس سلسله مراتبی از ساختارها مجتمع می‌شوند. توالی خطی از اسیدهای آمینه در پلی‌پپتیدها به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل شده (ساختار اول) و به صورت مارپیچ یا صفحاتی موضعی تا خورده (ساختار دوم) و سپس این‌ها به صورت کمپلکس بزرگ با ساختار سه‌بعدی (ساختار سوم) پیچ می‌خورند. بعضی از پلی‌پپتیدها به صورت کمپلکس‌های چند زنجیره‌ای تجمع می‌یابند (ساختار چهارم). این کمپلکس‌های چند زنجیره‌ای در بعضی موارد از ده‌ها تا صدها زیر واحد (تجمعات مافوق مولکولی) تشکیل شده و می‌توانند خیلی بزرگ باشند. (b) عملکرد پروتئین شامل: سازمان دادن ژنوم، سایر پروتئین‌ها، غشاءهای دو لایه لیپیدی و سیتوپلاسم (ساختار)؛ کنترل فعالیت پروتئین (تنظیم)، نشان دادن شرایط محیط و انتقال اطلاعات (سیگنال‌دهی)، عبور دادن مولکول‌های کوچک و یون‌ها از غشاء (انتقال)؛ کاتالیز واکنش‌های شیمیایی (از طریق آنزیم‌ها)؛ و تولید نیرو برای تحرک (از طریق پروتئین‌های حرکتی) می‌باشد. این عملکردها و سایر فعالیت‌های دیگر ناشی از میانکنش‌های اتصالی اختصاصی و تغییرات کنفورماسیونی در ساختار پروتئین‌هایی است که به طور صحیح تا خورده‌اند.

1- Signaling proteins 2- Moter proteins
3- Molecular Machines

پروتئین‌ها کار می‌کنند. جمع‌آوری جامع اطلاعات درباره پروتئین‌ها با تعیین توالی، **ژنوم**[1] (سری کامل ژن‌ها) موجودات زنده، میسر شده است. محققین به وسیله تجزیه و تحلیل توالی‌های ژنوم، می‌توانند تعداد و توالی اسیدهای آمینه اغلب پروتئین‌های رمزدهی شده را به دست آورند (فصل ۵). واژه **پروتئوم**[2] به کل پروتئین‌های موجود زنده اطلاق می‌شود. ژنوم انسان حدوداً ۲۵/۰۰۰ ژن رمزدهی‌کننده پروتئین دارد. با وجود این، تغییرات در تولید mRNA (هم‌چون پیرایش متناوب (فصل ۸)) و بیش از ۱۰۰ نوع تغییر در پروتئین‌ها ممکن است تا صدها هزار پروتئین انسانی متفاوت تولید نماید.

جالب این‌که پروتئوم انسان ۵ مرتبه بزرگ‌تر از ژنوم بوده و دارای ۳۳۰۰۰ پروتئین متفاوت است. با مقایسه توالی و ساختار پروتئین‌های ناشناخته از لحاظ عملکرد با آنهایی که عملکردشان شناخته شده است، دانشمندان می‌توانند عملکرد اغلب آنها را حدس بزنند. در گذشته، شناسایی عملکرد پروتئین‌ها به وسیله روش‌های ژنتیکی، بیوشیمیایی یا فیزیولوژیکی اغلب باعث شناسایی پروتئین‌های خاصی می‌شد، اما در عصر ژنومیک و پروتئومیک نوین، پروتئین قبل از تعیین عملکردش، شناسایی می‌شود.

در این فصل ما مطالعه‌مان را با این مطلب شروع می‌کنیم که چگونه ساختار پروتئین باعث ایجاد عملکردش می‌گردد و به این مطلب در سراسر این کتاب پرداخته می‌شود (شکل ۱ـ۳). قسمت اول این فصل بررسی می‌کند که چگونه واحدهای ساختاری اسید آمینه‌ای به صورت ساختار سه‌بعدی آرایش می‌یابند. در قسمت بعدی چگونگی تاخوردن پروتئین‌ها مورد بحث قرار می‌گیرد. ما سپس به عملکرد پروتئین با تمرکز روی آنزیم‌ها می‌پردازیم. آنزیم‌ها دسته خاصی از پروتئین‌ها بوده و واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند.

انواع مکانیسم‌های استفاده شده برای تنظیم فعالیت و طول عمر پروتئین‌ها در دو قسمت بعدی بررسی می‌شود. قسمت آخر به تکنیک‌های رایج مورد استفاده زیست‌شناسان می‌پردازند که از آنها برای جداسازی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این فصل با بحث روی زمینه شکوفایی پروتئومیکس، خاتمه می‌یابد.

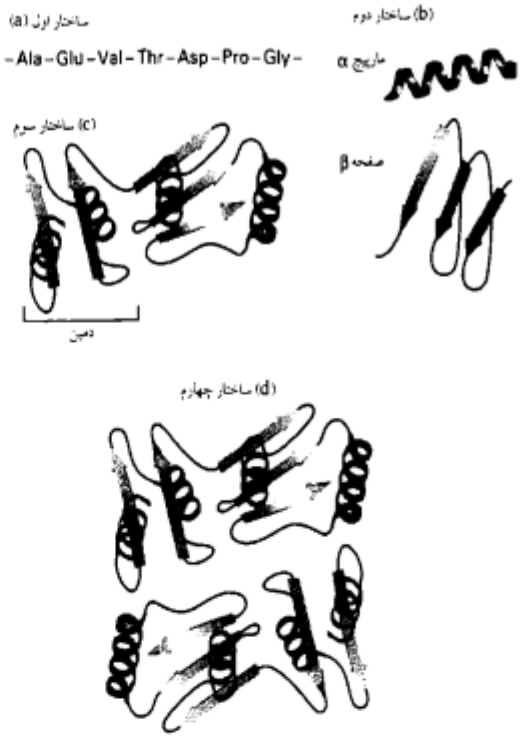
۳ـ۱ سطوح ساختاری در پروتئین‌ها

زنجیره پروتئینی به صورت ساختار سه‌بعدی تا خورده و توسط میانکنش‌های غیرکووالان پایدار می‌شوند. این میانکنش‌ها بین نواحی مختلفی از توالی خطی اسیدهای آمینه، ایجاد می‌شوند. نگرش کلیدی در فهم چگونگی عملکرد پروتئین‌ها این است که ***عملکرد از ساختار سه‌بعدی حاصل می‌شود و ساختار سه‌بعدی به وسیله میانکنش‌های غیرکووالان بین نواحی مختلف از توالی خطی اسیدهای آمینه تعیین می‌شود و این میانکنش‌ها به وسیله توالی اسیدآمینه‌ای مشخص می‌شوند.*** در حقیقت مبانی مربوط به ساختار و عملکرد زیستی برای اولین بار به وسیله یوهان وان گوت[3] (۱۸۳۲ـ۱۷۴۹)، ارنست هکل[4] (۱۹۱۹ـ۱۸۳۴)، و د ـ آرسی تامسون[5] (۱۹۴۸ـ۱۸۶۰) ارائه گردید. آنها به‌طور چشمگیری عقیده معماری «سازمان یافته» را که قبل از قرن بیستم مطرح بود، تحت تأثیر قرار دادند. این تفکر ضرب‌المثل‌های «عملکرد در پی شکل‌گیری» (لویس سالیوان[6]) و «شکل‌گیری، عملکرد است» (فرانک لوید رایت[7]) را متجلی می‌کرد. در این‌جا ما معماری پروتئین‌ها را در چهار سطح سازمان یافته: اول، دوم، سوم و چهارم (شکل ۲ـ۳) بررسی می‌کنیم.

ساختار اولیه پروتئین، آرایش خطی از اسیدهای آمینه است

همان‌طور که در فصل ۲ توضیح داده شد، پروتئین‌ها از طریق پلیمریزه شدن ۲۰ نوع اسیدآمینه مختلف، ساخته می‌شوند. اسیدهای آمینه با پیوندهای کووالان آمیدی به صورت زنجیره‌های خطی و بدون شاخه به هم متصل می‌شوند. این پیوندهای آمیدی، **پیوندهای پپتیدی** نامیده می‌شوند. در زنجیره پلی‌پپتیدی، گاهگاهی پیوندهای کووالان دی‌سولفیدی زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه را به همدیگر متصل می‌کنند. تشکیل پیوند پپتیدی، بین گروه آمینو از یک اسید آمینه و گروه کربوکسیل از اسیدآمینه دیگر صورت گرفته و حاصل آن آزاد شدن مولکول آب (دهیدراسیون) (شکل (a) ۳ـ۳) می‌باشد. تکرار اتم‌های N آمید، کربن α ($C\alpha$)، کربونیل و اکسیژن از هر رزیدوی اسیدآمینه‌ای، اسکلت مولکول پروتئین را تشکیل می‌دهد که از این اسکلت مولکولی گروه‌های مختلف زنجیره‌های جانبی به بیرون جهت‌گیری کرده‌اند (شکل (b) ۳ـ۳). در نتیجه اتصال پپتیدی، پروتئین به دلیل قرار گرفتن گروه‌های آمینو در یک طرف از اتم‌های $C\alpha$، جهت‌دار می‌باشند. بنابراین یک انتها از پروتئین، گروه آمینوی

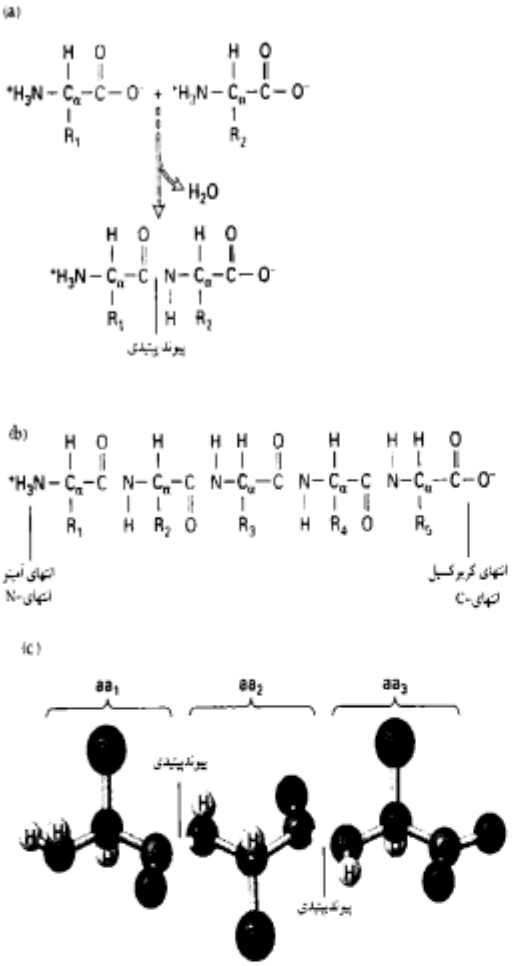
1- Genome
2- Proteome
3- Johann von Goethe
4- Ernst Haeckel
5- D' Arcy thompson
6- Louis sullivan
7- Frank loyd wright



▲ **شکل ۲-۳ چهار سطح ساختاری پروتئین.** (a) توالی خطی اسیدهای آمینه به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل شده و ساختار اول را ایجاد می‌کنند. (b) تا خوردن زنجیره پلی‌پپتیدی به مارپیچ α یا صفحات β نشان‌دهنده ساختار دوم است. (c) عناصر ساختار دوم با همدیگر و با حلقه‌ها (لوپ‌ها) و پیچ‌های (حلقه‌های) مختلف در یک زنجیره پلی‌پپتید به صورت ساختار پایدار مستقل و بزرگ‌تری پیچ می‌خورند، این ساختار شامل دُمین‌های متفاوتی بوده و ساختار سوم پروتئین‌هاست. (d) بعضی پلی‌پپتیدها با ساختارهای سوم‌شان می‌توانند در ساختاری که کمپلکسی از چندین زنجیره پلی‌پپتیدی است مشارکت نموده و ساختار چهارم را ایجاد نمایند.

آزاد (پیوند نشده) (انتهای N) و انتهای دیگر آن، گروه کربوکسیل آزاد (انتهای C) دارد. برای نوشتن توالی زنجیره پروتئین، به‌طور قراردادی اسیدآمینه انتهای N در طرف چپ و اسیدآمینه انتهای C در طرف راست نوشته می‌شود و اسیدهای آمینه به ترتیب از طرف انتهای آمینو (شماره ۱) شماره‌گذاری می‌شوند.

ساختار اول پروتئین، آرایش خطی یا توالی رزیدوهای اسیدآمینه‌ای تشکیل‌دهنده آن است. اسامی زیادی به زنجیره حاصل از پلیمریزاسیون اسیدهای آمینه داده می‌شود. زنجیره کوتاهی از اسیدهای آمینه متصل شده با پیوندهای پپتیدی و با توالی محدود، **اولیگوپپتید**[1] یا **پپتید**[2] نامیده می‌شود. زنجیره‌های درازتر،



▲ **شکل ۳-۳ (شکل رنگی) ساختار پلی‌پپتید.** (a) اسیدهای آمینه به وسیله پیوند پپتیدی به هم متصل می‌شوند. تشکیل پیوند پپتیدی از طریق واکنشی انجام می‌گیرد که طی آن یک مولکول آب از دست می‌رود (دهیدراسیون). R_1 و R_2 و غیره زنجیره‌های جانبی (گروه‌های R) اسیدهای آمینه را نشان می‌دهد. (b) اسیدهای آمینه در پلیمرهای خطی به وسیله پیوند پپتیدی به هم متصل شده‌اند. این پلیمرهای خطی، **پلی‌پپتید**[3] نامیده می‌شوند. پلی‌پپتیدها یک انتهای آمینوی آزاد (انتهای N) و یک انتهای کربوکسیل آزاد (انتهای C) دارند. (c) مدل گوی و میله پیوندهای پپتیدی (زرد) اتصال‌دهنده اتم نیتروژن آمینو (آبی) از یک اسیدآمینه (aa) به اتم کربن گروه کربونیل (خاکستری) کناری‌اش در زنجیره پلی‌پپتیدی را نشان می‌دهد. گروه‌های R (سبز) از اتم‌های کربن (سیاه) اسیدهای آمینه به بیرون امتداد می‌یابند. این زنجیره جانبی به‌طور چشم‌گیری خواص متفاوت پروتئین‌ها را تعیین می‌کنند.

1- Oligopeptide 2- Peptide
3- Polypeptide

پلی‌پپتید[1] خوانده می‌شوند. پپتیدها معمولاً کم‌تر از ۲۰ الی ۳۰ رزیدوی (ریشه) اسیدآمینه‌ای دارند، در حالی که پلی‌پپتیدها اغلب ۲۰۰ الی ۵۰۰ تا رزیدو دارند. درازترین پروتئینی که تا امروز شناخته شده، پروتئین عضلانی تیتین[2] با ۲۹۹۲۶ رزیدو می‌باشد. ما معمولاً واژه پروتئین را برای پلی‌پپتید (یا کمپلکسی از پلی‌پپتیدها) به کار می‌بریم که ساختار سه‌بعدی مشخصی دارد. این نشان می‌دهد که پروتئین‌ها و پپتیدها محصولات طبیعی سلول هستند.

اندازه پروتئین یا پلی‌پپتید براساس جرمش بر حسب **دالتون**[3] (یک دالتون واحد جرم اتمی است) یا وزن مولکولی‌اش (MW[4]) بیان می‌شود. وزن مولکولی عددی است که دیمانسیون ندارد. به عنوان مثال یک پروتئین با MW ۱۰/۰۰۰، جرم مولکولی ۱۰/۰۰۰ دالتون (Da) یا ۱۰ کیلودالتون (kD) دارد. در بخش پایانی این فصل، روش‌های مختلف محاسبه اندازه و سایر خواص فیزیکی پروتئین‌ها را مورد توجه قرار خواهیم داد. پروتئین‌های شناخته شده و فرضی رمزدهی شده به وسیله ژنوم مخمر، وزن مولکولی ۵۲۷۲۸ داشته و به‌طور متوسط حاوی ۴۶۶ رزیدوی اسیدآمینه‌ای هستند. وزن مولکولی میانگین اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها، ۱۱۳ [دالتون] است که براساس میانگین فراوانی نسبی آنها حاصل شده است. این مقدار برای تخمین زدن مقدار رزیدوها از روی وزن مولکولی پروتئین و یا وزن مولکولی از روی مقدار رزیدوها به کار می‌رود.

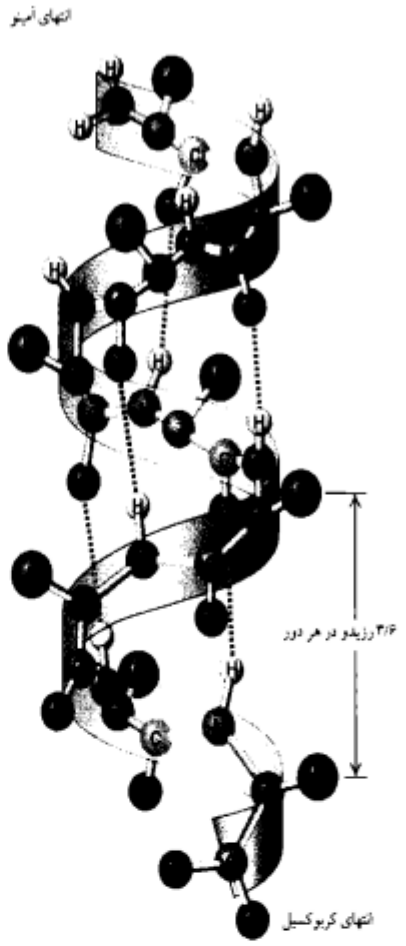
ساختارهای دوم پایه‌های اساسی معماری پروتئین هستند

سطح دوم ساختاری از سطوح ساختاری پروتئین، ساختار دوم است. ساختارهای دوم آرایش‌های پایدار خاصی از قطعات زنجیره پلی‌پپتیدی هستند و به وسیله پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین گروه‌های آمید و کربونیل از ستون فقرات زنجیره پلی‌پپتیدی، کنار هم نگهداری می‌شوند. این ساختارها اغلب الگوی ساختاری تکرارشونده دارند. یک زنجیره پلی‌پپتیدی براساس توالی‌اش، ممکن است چندین نوع ساختار دوم در قسمت‌های مختلف از زنجیره‌اش داشته باشد. ساختارهای دوم اصلی، **مارپیچ آلفا**[5] (α)، **صفحه بتا**[6] (β) و **پیچ‌های بتا**[7] (β) به شکل U کوتاه، هستند. قسمت‌هایی از پلی‌پپتیدها این ساختارها را تشکیل نداده و به جای آنها ساختارهایی پایدار و مشخصی تشکیل می‌دهند که به آنها ساختار **نامنظم**[8] گفته می‌شود. واژه **راندوم کویل**[9] به قسمت‌هایی از زنجیره پلی‌پپتیدی اطلاق می‌شود که خیلی انعطاف‌پذیر بوده و ساختار سه‌بعدی ثابتی ندارند. به‌طور میانگین در پروتئین‌ها، ۶۰ درصد از زنجیره پلی‌پپتیدی به صورت مارپیچ آلفا و صفحات β بوده و بقیه مولکول را کویل‌ها و پیچ‌ها تشکیل می‌دهد. بنابراین مارپیچ‌های آلفا و صفحات β پایه‌های داخلی اصلی حمایت‌کننده در اغلب پروتئین‌ها هستند. در این قسمت ما شکل ساختارهای دوم و نیروهای هموارکنندهٔ تشکیل آنها را نشان می‌دهیم. در قسمت‌های بعدی بررسی می‌کنیم، چگونه آرایش خطی ساختارهای دوم به آرایش‌های بزرگ‌تر و پیچیده‌تر تا می‌خورند. به این ساختار، بزرگ و پیچیده ساختار سوم می‌گویند.

مارپیچ آلفا : در قطعه‌ای از پلی‌پپتید که به صورت مارپیچ آلفا تا می‌خورد، اسکلت پلی‌پپتید ساختار مارپیچی تشکیل می‌دهد. در این ساختار اتم اکسیژن کربونیل از هر پیوند پپتیدی با اتم هیدروژن آمید چهارمین اسیدآمینه بعد از خود (در جهت انتهای C) پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد (شکل ۴ـ۳). درون مارپیچ آلفا، به استثنای اسیدهای آمینه شروع‌کننده و خاتمه‌دهنده مارپیچ، همه گروه‌های آمینو و کربوکسیل اسیدهای آمینه با یکدیگر پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند. این آرایش تناوبی پیوندها، به مارپیچ جهت می‌دهد. این جهت از انتهای N به انتهای C بوده و به دلیل هم جهت بودن (در شکل ۴ـ۳ به صورت جهت‌گیری به طرف پایین نشان داده شده است) همه گیرنده‌های پیوندهای هیدروژنی (هم‌چون گروه‌های کربوکسیل) و در آخر باعث می‌شود، تا هر پیچ از مارپیچ ۳/۶ رزیدو داشته باشد. مارپیچ آلفایی که ۳۶ اسیدآمینه دارد، را با ۱۰ پیچ و طول ۵/۴ nm تشکیل می‌دهد (طول هر پیچ ۰/۵۴ nm است).

آرایش پایدار پیوندهای هیدروژنی اسیدهای آمینه در مارپیچ آلفا، اسکلت پروتئین را در این ساختار به صورت راست و استوانه میله‌ای شکل درمی‌آورد که در آن زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه به طرف بیرون قرار می‌گیرند. آبگریز یا آب دوست بودن نسبی مارپیچ در درون پروتئین کاملاً به وسیله خواص زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آن تعیین می‌شود، زیرا گروه‌های آمینو و کربوکسیل قطبی در اسکلت پپتیدی مارپیچ، در پیوند هیدروژنی درگیر هستند. در پروتئین‌های محلول در آب، مارپیچ‌های آب دوست تمایل دارند در سطح بیرونی باشند تا بتوانند با محیط آبی میانکنش دهند، اما مارپیچ‌های آبگریز تمایل دارند در درون پروتئین بمانند. اسید آمینه

1- Polypeptide
2- Titin
3- Dalton
4- Molecular weight
5- 1-Alphahelix
6- Beta sheet
7- Beta turn
8- Irregular
9- Random coil



▲ **شکل ۳ـ۴ (شکل رنگی) ساختار مارپیچ α یک ساختار دوم معمول در پروتئین‌ها.** ستون فقرات پلی‌پپتید (که به صورت نواری دیده می‌شود) به صورت مارپیچ تا خورده و به وسیله تشکیل پیوند هیدروژنی بین اتم‌های اکسیژن و هیدروژن اسکلت پروتئین، نگه داشته می‌شود. فقط هیدروژن‌های درگیر در پیوند هیدروژنی نشان داده شده‌اند. سطح بیرونی مارپیچ به وسیله گروه‌های زنجیره‌های جانبی R (سبز) پوشیده شده‌اند.

پرولین معمولاً در مارپیچ‌های آلفا یافت نمی‌شود زیراگروه آمینوی آن باکربن زنجیره جانبی خود، پیوند کووالان ایجادکرده و بدین ترتیب از مشارکت این اسیدآمینه در پایدار نمودن اسکلت مارپیچ از طریق پیوند هیدروژنی ممانعت می‌کند.

مارپیچ آلفای کلاسیک به‌طور ذاتی پایداری زیادی داشته و شکل متداول مارپیچ در پروتئین‌هاست، اما با این حال تغییراتی نیز دارد، مثلاً مارپیچ‌ها می‌توانند فشردگی زیاد یا کمی داشته باشند. به عنوان مثال در یک مارپیچ خاص که کویل کویل[1] نامیده می‌شود (در قسمت‌های زیادی در این فصل به آن پرداخته شده است)، مارپیچ به‌طور محکمی، پیچ خورده است (۳/۵ رزیدو و طول ۰/۵۱ nm به ازای هر پیچ).

صفحات بتا: نوع دیگر از ساختار دوم، صفحه بتا است و از رشته‌های بتایی تشکیل شده که پهلوی هم قرار گرفته‌اند. هر رشته بتا، قطعه کوتاه (۵ الی ۸ رزیدو) و تقریباً پهن پلی‌پپتیدی است. بر خلاف مارپیچ آلفا (پیوند هیدروژنی بین گروه‌های آمینو و کربوکسیل در اسکلت پپتیدی و بین اسیدهای آمینه تقریباً نزدیک هم ایجاد می‌شود)، پیوند هیدروژنی در صفحه بتا بین اتم‌های اسکلت پپتیدی دو رشته بتای جدا و در عین حال نزدیک هم ایجاد می‌گردد (شکل a ـ۳۵). این رشته‌های بتای جداگانه ممکن است یا درون یک زنجیره پلی‌پپتیدی با حلقه‌های کوتاه یا دراز بین رشته‌ها بوده و یا می‌توانند بین زنجیره‌های پلی‌پپتیدی جداگانه باشد. شکل b ـ۳۵ چگونگی قرار گرفتن رشته‌های بتا را در کنار هم و تشکیل صفحات بتا پهن شده و تقریباً دوبعدی (یا صفحات پهن) را نشان می‌دهد. در این صفحات، پیوندهای هیدروژنی رشته‌های بتا را کنار هم نگه داشته و سطحی را در صفحه بتا ایجاد می‌کنند که زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه در بالا یا پایین آن قرار می‌گیرند. رشته‌های بتا مثل مارپیچ‌های آلفا دارای جهت بوده و این جهت به وسیله جهت‌گیری پیوندهای پپتیدی تعیین می‌شود. بنابراین در یک صفحه مسطح، رشته‌های بتای نزدیک هم می‌توانند نسبت به همدیگر جهت یکسان (همسو[2]) یا مخالف (ناهمسو[3]) داشته باشند. در بعضی پروتئین‌ها، صفحات β قسمت کف پاکت اتصالی یا یک هسته آب‌گریز را ایجاد می‌کنند. در پروتئین‌های جای گرفته در غشاها، صفحات β می‌توانند خمیده شده و منفذی آب‌گریز تشکیل دهند که از طریق آن یون‌ها و مولکول‌های کوچک می‌توانند جریان یابند (فصل ۱۱).

پیچ‌های بتا: از چهار رزیدو تشکیل شده‌اند. پیچ‌های بتا در سطح پروتئین قرار گرفته و خمیدگی‌های تندی را ایجاد می‌کنند به‌طوری که اغلب باعث جهت‌گیری اسکلت پلی‌پپتیدی به طرف داخل پروتئین می‌شود. این ساختارهای دوم U شکل و کوتاه اغلب به وسیله پیوندهای هیدروژنی بین رزیدوهای انتهایی‌شان پایدار می‌شوند (شکل ۳ـ۶). گلیسین و پرولین به‌طور معمول در پیچ‌ها وجود دارند. نبود زنجیرهٔ جانبی بزرگ در گلیسین و ساختار خمیده پرولین، به اسکلت پلی‌پپتیدی این امکان را می‌دهد که به شکل U محکم تا بخورد. پیچ‌های β به پروتئین‌های بزرگ کمک می‌کنند تا به صورت

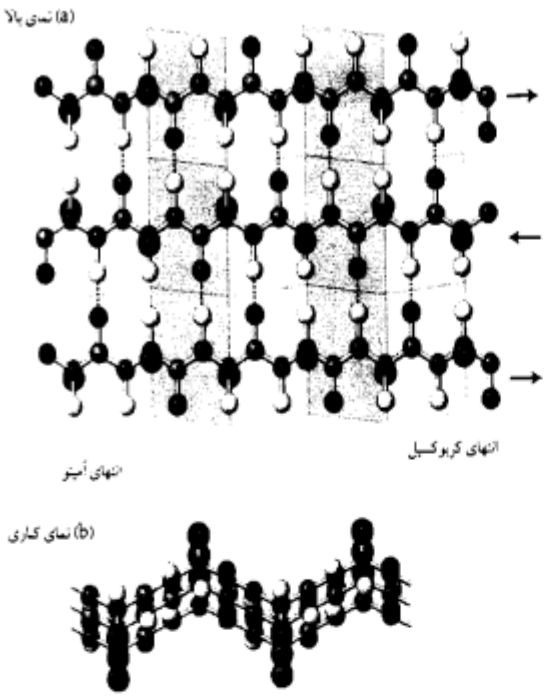
1- Coiled - coil
2- Parallel
3- Anti parallel

ساختارهای خیلی فشرده، تا بخورند. شش نوع پیچ به خوبی شناخته شده که ساختارهای آنها به آرایش پیوندهای هیدروژنی بستگی دارد. اسکلت پلی‌پپتیدی می‌تواند حلقه‌های درازتری (لوپ‌ها[1]) نیز داشته باشد. در مقایسه با پیچ‌های محکم β که ساختمان فضایی محدودی دارند، حلقه‌های بلندتر می‌توانند ساختمان‌های فضایی متفاوتی داشته باشند.

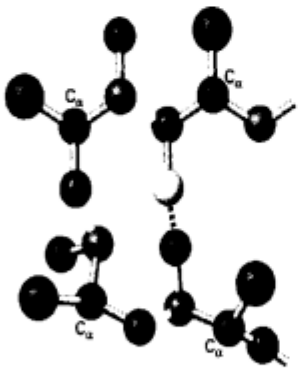
تا خوردن کلی یک زنجیره پلی‌پپتیدی، ساختار سوم آن را ایجاد می‌کند

ساختار سوم به ساختمان فضایی کلی یک زنجیره پلی‌پپتیدی اطلاق می‌شود، ساختار سوم آرایش سه‌بعدی همه رزیدوهای اسیدآمینه‌ای پروتئین است. در مقایسه با ساختارهای دوم که فقط به وسیله پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شدند، ساختار سوم بیشتر به وسیله میانکنش‌های آب‌گریز بین زنجیره‌های جانبی غیرقطبی و هم‌چنین به وسیله پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های جانبی قطبی و پیوندهای پپتیدی پایدار می‌شود. این نیروهای پایدارکننده، عناصر ساختار دوم (مارپیچ‌های آلفا، رشته‌های β، پیچ‌ها و کویل‌ها) را به‌طور فشرده کنار هم نگه می‌دارند. به دلیل ضعیف بودن میانکنش‌های پایدارکننده، ساختار سوم پروتئین چندان محکم نبوده و تحت نوسانات کم و مداوم قرار می‌گیرد و بعضی قطعات درون ساختار سوم پروتئین می‌توانند به قدری متحرک باشند که ساختار را به هم بریزند (ساختارهای سه‌بعدی، پایدار ونه چندان مشخص). این تغییرات در ساختار، پیامدهای مهمی برای عملکرد و تنظیم پروتئین‌ها دارد.

خواص شیمیایی زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه به تعیین ساختار سوم کمک می‌کند. پیوندهای دی‌سولفید بین زنجیره‌های جانبی رزیدوهای سیستئین در بعضی از پروتئین‌ها، نواحی از پروتئین‌ها را به‌طور کووالان به هم متصل می‌کند، بنابراین تحرک پروتئین‌ها را کم کرده و پایداری ساختار سوم آنها را افزایش می‌دهد. اسیدهای آمینه با زنجیره‌های جانبی آب‌دوست قطبی و باردار، تمایل دارند در سطح بیرونی پروتئین‌ها قرار گرفته و بوسیله میانکنش با آب به محلول بودن پروتئین در محلول‌های آبی کمک کنند. این اسیدهای آمینه هم‌چنین می‌توانند میانکنش‌های غیرکووالان با سایر مولکول‌های محلول در آب (که می‌تواند پروتئین‌های دیگر باشد) ایجاد نمایند. در مقابل، اسیدهای آمینه با زنجیره‌های جانبی غیرقطبی و آب‌گریز معمولاً دور از سطوح رو به آب پروتئین‌ها قرار گرفته و در اغلب موارد هسته مرکزی نامحلول در آب را تشکیل می‌دهند (به دلیل هسته نسبتاً آبگریز یا روغنی، به این



▲ **شکل ۵ـ۳ (شکل رنگی) صفحه β ساختار دوم رایج دیگر در پروتئین‌ها.** (a) نمای بالا از صفحه بتا با سه رشته بتای ناهمسو. پیوندهای هیدروژنی پایدارکننده بین رشته‌های β به وسیله خطوط نقطه‌چین سبز نشان داده شده است. (b) نمای کناری از یک صفحه β قرارگیری گروه‌های R (سبز) در بالا و پایین صفحه در این نما به وضوح دیده می‌شود. زوایای پیوندی ثابت در اسکلت پلی‌پپتیدی، باعث ایجاد کانتور شده است.



▲ **شکل ۶ـ۳ ساختار پیچ β** از چهار رزیدو تشکیل شده‌اند، پیچ‌های β جهت زنجیره پلی‌پپتیدی را معکوس می‌کنند (حدوداً ۱۸۰° پیچ U). کربن‌های $C\alpha$، رزیدوهای اول و چهارم معمولاً کمتر از ۰/۷ nm از هم فاصله داشته و اغلب به وسیله پیوند هیدروژنی به هم متصل می‌شوند. پیچ‌های β تاخوردن پلی‌پپتیدهای دراز را به ساختارهای فشرده تسهیل می‌کنند.

مدل، **مدل قطره روغن پروتئین‌های کروی** اطلاق می‌شود، شکل ۷ـ۳). اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی آب‌دوست، قطبی و بدون بار

1- Loop

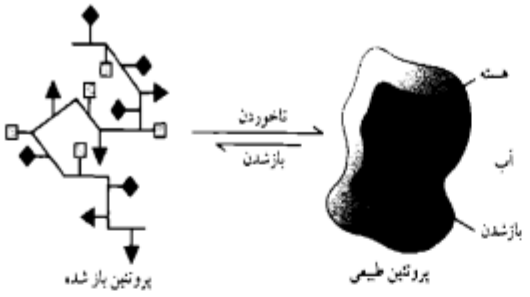
هم در سطح و هم در هسته داخلی پروتئین‌ها قرار می‌گیرند.

پروتئین‌ها براساس ساختار سومشان به سه گروه گسترده تقسیم می‌شوند: پروتئین‌های رشته‌ای[1]، پروتئین‌های کروی[2] و پروتئین‌های داخل غشایی[3]. **پروتئین‌های رشته‌ای** مولکول‌های بزرگ، طویل و محکمی بوده و اغلب از کپی‌ها پشت سر هم از یک توالی کوتاه تشکیل می‌شوند. این توالی کوتاه، یک ساختار دوم تکرارشونده را تشکیل می‌دهد (ساختار کلاژن به عنوان فراوان‌ترین پروتئین در پستانداران، را در فصل ۱۹ ملاحظه کنید).

پروتئین‌های رشته‌ای اغلب به صورت رشته‌های چند پروتئینی بزرگ تجمع پیدا می‌کنند که به راحتی در آب حل نمی‌شوند و معمولاً نقش ساختاری داشته و یا در تحرک سلولی مشارکت می‌نمایند. **پروتئین‌های کروی**، معمولاً در آب حل می‌شوند، ساختارهای تا خوردهٔ فشرده‌ای داشته، اغلب ساختارشان به‌طور انحصاری کروی نبوده و ساختار سوم‌شان متشکل از مخلوطی از ساختارهای دوم است (ساختار میوگلوبین را ملاحظه کنید). **پروتئین‌های داخل غشایی** در داخل غشاء دو لایه لیپیدی قرار می‌گیرند. غشاء نقش دیواره را برای سلول‌ها و اندامک‌ها بازی می‌کند. در این‌جا سه گروه گسترده از پروتئین‌ها مورد توجه قرار گرفت. اما این گروه‌ها اختصاصی نبوده، و بعضی از پروتئین‌ها می‌توانند در دو و یا حتی متعلق به هر سه گروه باشند.

شیوه‌های مختلف نشان دادن ساختمان فضایی پروتئین‌ها، اطلاعات مختلفی می‌دهد

ساده‌ترین شیوه نشان دادن ساختار سه‌بعدی پروتئین، رسم ساختار به صورت خطی براساس اتم‌های اسکلت پروتئین می‌باشد. بعضی مواقع این ترسیم براساس اتم $C\alpha$ است (که ترسیم براساس $C\alpha$ نامیده می‌شود، شکل a ۳.۸). پیچیده‌ترین مدل، همه اتم‌ها را نشان می‌دهد (شکل b ۳.۸). این نوع ترسیم براساس اتم‌های اسکلت پروتئینی بدون پرداختن به زنجیره جانبی اسیدهای آمینه، درباره تا خوردگی کلی زنجیره پلی‌پپتیدی بحث می‌کند. اما پیچیده‌ترین مدل (مدل گوی و میله) میانکنش‌های بین اتم‌های زنجیره جانبی را با جزئیات بیشتری مورد توجه قرار می‌دهد. این میانکنش‌ها شامل میانکنش‌های پایدارکننده ساختمان فضایی پروتئین و میانکنش‌های زنجیره‌های جانبی با سایر مولکول‌ها و هم‌چنین با اتم‌های اسکلت پروتئین می‌باشد. با این‌که هر دو روش مفید هستند، اما عناصر ساختار دوم در آنها همیشه به راحتی قابل تشخیص نیست. نوع دیگر نمایش ساختار سه‌بعدی،

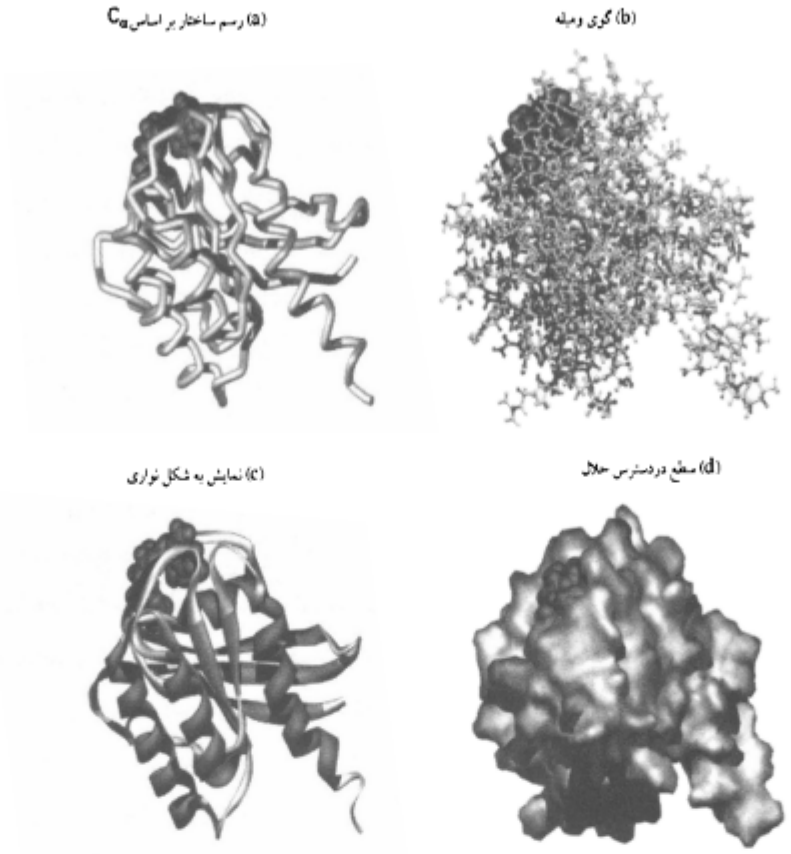


▲ **شکل ۷-۳ مدل قطره روغن تا خوردن پروتئین.** رزیدوهای آبگریز زنجیره پلی‌پپتیدی تمایل دارند کنار هم جمع شوند (تا اندازه‌ای شبیه قطره روغن) و در اثر آبگریزی در محیط آبی، در داخل یا مرکز پروتئین تا خورده، قرار گیرند (شکل ۲). زنجیره‌های جانبی قطبی باردار و بدون بار در سطح پروتئین ظاهر شده و در آنجا آنها می‌توانند میانکنش‌های پایدارکننده‌ای را با یون‌ها و آب اطراف تشکیل دهند.

استفاده از نشانه‌های اختصاری برای ساختارهای دوم می‌باشد. به عنوان مثال مارپیچ‌های آلفا با نوارهای پیچ‌خورده با استوانه‌های توپر، رشته‌های β با نوارهای پهن یا پیکان، و پیچ‌های β با رشته‌های نازک نشان داده می‌شوند (شکل c ۳.۸). در انواعی از ترسیم‌های ساختار به صورت نواری، زنجیره‌های جانبی به صورت فضا پرکنی یا گوی و میله می‌توانند به اسکلت نواری متصل شوند، در صورتی که در مدل‌های استوانه‌ای و نواری، ساختارهای دوم پروتئین به راحتی دیده می‌شوند.

با این حال، هیچ کدام از این روش‌های نمایش ساختار پروتئین اطلاعات زیادی درباره سطح پروتئین نمی‌دهد. سطح پروتئین به این دلیل جالب است، چون جایی از مولکول پروتئین است که معمولاً مولکول‌های دیگر به آن متصل می‌شوند. آنالیز کامپیوتری می‌تواند اتم‌های سطحی در تماس با محیط آبی را شناسایی نماید. روی این سطوح در دسترس آب، نواحی دارای یک خاصیت شیمیایی (آبگریزی یا آبدوست) و خاصیت الکتریکی (بازی یا اسیدی) با رنگ خاصی نشان داده می‌شوند (شکل ۶.۸). چنین مدل‌هایی توپوگرافی سطح پروتئین و توزیع بار (هر دوی این‌ها، خصوصیت مهم جایگاه‌های اتصال هستند) و هم‌چنین شکاف‌های سطح پروتئین را که مولکول‌های کوچک به آنها متصل می‌شوند را نشان می‌دهند. این نوع نمایش پروتئین، به نحوی است که انگار پروتئین توسط یک مولکول دیگر دیده می‌شود.

1- Fibrous proteins 2- Globular proteins
3- Integral membrane proteins



▲ **شکل ۸ـ۳ چهار روش نشان دادن ساختار پروتئین.** Ras (یک پروتئین متصل‌شونده به نوکلئوتید گوآنین) با گوانوزین دی‌فسفات (GDP) به هر چهار صورت نشان داده شده است. (a) رسم ساختار براساس $C\alpha$ توضیح می‌دهد که چگونه پلی‌پپتید در حجم کوچکی فشرده می‌شود. (b) نمایش به صورت گوی و میله، جایگاه همه اتم‌ها را مشخص می‌کند. (c) نمایش به شکل نواری، بر چگونگی سازمان‌یابی رشته‌های β و مارپیچ α در پروتئین تأکید می‌کند. توجه کنید، پیچ‌ها و حلقه‌ها، مارپیچ‌ها و رشته‌ها را به هم مرتبط می‌سازد. (d) مدل سطح در دسترس آب، برآمدگی‌ها و شکاف‌های روی سطح پروتئین را آشکار می‌سازد.

موتیف‌های ساختاری ترکیبی منظم از ساختارهای دوم و سوم است

ترکیبی خاص از ساختارهای دوم و سوم، **موتیف یا تا خوردگی‌های ساختاری** نامیده شده و اغلب به صورت قطعاتی در بسیاری از پروتئین‌های مختلف ظاهر می‌شوند. موتیف ساختاری در ساختار کلی پروتئین کامل سهیم بوده و یک موتیف ساختاری[۱] اغلب عملکرد مشترکی در پروتئین‌های مختلف دارد (مثل اتصال به یک یون یا مولکول کوچک). توالی‌های اولیه مسئول یک موتیف ساختاری ممکن است شباهت زیادی با توالی‌های موتیف‌های ساختاری دیگر داشته باشند. به عبارت دیگر، یک موتیف توالی[۲] می‌تواند باعث ایجاد یک موتیف ساختاری سه‌بعدی شود. با این حال توالی‌های به ظاهر غیرمرتبط با هم ممکن است به یک موتیف ساختاری مشترک تا بخورند و بالعکس این امکان هم وجود دارد که یک موتیف توالی، موتیف ساختاری شناخته شده‌ای را ایجاد نکند. بعضی مواقع موتیف‌های توالی کوتاه که فراوانی غیرمعمولی از یک اسیدآمینه همچون پرولین، آسپارتات یا گلوتامات را دارند، **دُمین**[۳] نامیده می‌شوند. با وجود این، این عوامل و سایر قطعات کوتاه مجاور هم به صورت اختصاصی به جای دُمین، بیشتر موتیف نامیده می‌شوند (در زیر مشخص شده است).

اغلب پروتئین‌ها هم‌چون پروتئین‌های رشته‌ای و پروتئین‌های تنظیم‌کننده DNA که فاکتورهای رونویسی نامیده می‌شوند (فصل

1- Structural motif 2- Sequence motif
3- Domain

۷ـ ـ ستفاده از موتیف ساختاری کویل کویل (یا تکرار هفت‌تایی[1]) به صورت دیمر و تریمر مجتمع می‌شوند. در موتیف ساختاری کویل‌کویل، مارپیچ‌های آلفا از دو، سه یا حتی چهار زنجیره پلی‌پپتیدی، دور یکدیگر پیچ خورده و باعث پیچیدن کویل‌ها [مارپیچ‌های آلفا] می‌شوند (شکل a ۹ـ۳). هر مارپیچ به‌طور محکم به مارپیچ دیگر متصل می‌شود. در اینجا هر مارپیچ در یک طرف خود زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک داشته که با قسمت‌های مشابه در مارپیچ مجاور میانکنش می‌دهد. بنابراین گروه‌های آبگریز برای دوری جستن از آب، همدیگر را می‌پوشاند و باعث پایدار شدن و به هم پیوستن چند مارپیچ می‌شوند. این نوارهای آبگریز فقط در یک طرف از مارپیچ ایجاد می‌شوند زیرا توالی‌های اولیه موتیفی از قطعات تکراری هفت اسیدآمینه‌ای (هفت‌تایی[2]) بوده و در این قطعات فقط اسیدهای آمینه اول و چهارم، زنجیره جانبی آبگریز داشته و بقیه اسیدهای آمینه اغلب زنجیره جانبی آبدوست دارند (شکل a ۹ـ۳). چون زنجیره‌های جانبی آبدوست در یک طرف مارپیچ و زنجیره‌های جانبی آبگریز در طرف دیگر آن قرار می‌گیرند، در کل ساختار مارپیچ، **آمفی‌پاتیک** است. به دلیل ظاهر شدن مکرر لوسین در جایگاه چهارم، زنجیره‌های جانبی آبگریز آن مثل دندانه‌های زیپ در هم ادغام می‌شوند. این موتیف ساختاری **زیپ لوسین**[3] نامیده می‌شود.

اغلب موتیف‌های ساختاری دیگر از مارپیچ‌های آلفا استفاده می‌کنند. موتیف متداول در اتصال به کلسیم، **دست EF**[4] نامیده می‌شود و از دو مارپیچ تشکیل شده که با یک حلقه به هم مرتبط می‌گردند (شکل b ۹ـ۳). این موتیف ساختاری در بیش از ۱۰۰ پروتئین یافت شده و برای حس نمودن سطح کلسیم در سلول‌ها به کار می‌رود. اتصال یون کلسیم به اتم‌های اکسیژن در رزیدوهای حفاظت شده در لوپ به غلظت Ca^{2+} وابسته بوده و اغلب باعث تغییر ساختمان فضایی در پروتئین و تغییر فعالیت آن می‌شود. بنابراین غلظت کلسیم به‌طور مستقیم می‌تواند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را کنترل کند. موتیف‌های ساختاری مارپیچ ـ دور ـ مارپیچ[5] و مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ‌های بازی[6] (bHLH) برای اتصال پروتئین به DNA به کار رفته و بنابراین فعالیت ژن را تنظیم می‌کنند. موتیف معمول دیگر در اتصال پروتئین‌ها به RNA یا DNA، **انگشت روی**[7] است. انگشت روی سه ساختار دوم دارد (یک مارپیچ آلفا و دوتا رشته β با جهت ناهمسو) که زائده انگشت مانند را تشکیل می‌دهند. این زائده انگشت مانند به وسیله یک یون روی (Zn^{+2})نگهداری می‌شود.

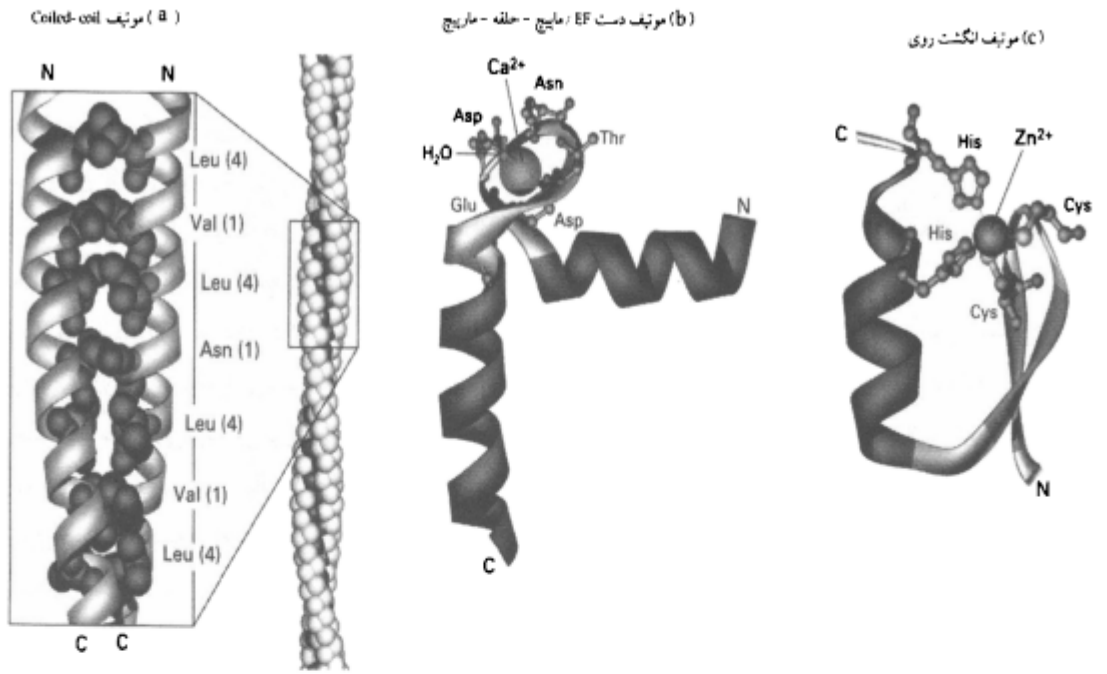
ما در بحث‌های بعدی درباره سایر پروتئین‌ها (در این فصل و فصل‌های دیگر با موتیف‌های دیگر مواجه خواهیم شد. حضور یک موتیف ساختاری در پروتئین‌های مختلف با عملکرد مشابه، به وضوح نشان می‌دهد که این ترکیب مفید حاصل از ساختارهای دوم، در تکامل حفظ شده‌اند.

دمین‌های ساختاری و عملکردی، واحدهایی از ساختار سوم هستند

نواحی مجزای ساختار سوم، اغلب **دُمین** نامیده می‌شوند. دُمین‌های پروتئین، سه گروه اصلی دارند: عملکردی، ساختاری و توپولوژیکی، **دُمین عملکردی**[8]، ناحیه‌ای از پروتئین است که فعالیت خاص آن پروتئین را نشان می‌دهد، حتی اگر از بقیه پروتئین جدا باشد. به عنوان مثال، ناحیه خاصی از پروتئین ممکن است مسئول فعالیت کاتالیزی (مثل، دُمین کیناز که به صورت کووالان یک گروه فسفات را به مولکول دیگر اضافه می‌کند) یا توانایی اتصال آن (مثل: دُمین اتصال به DNA یا دمین اتصال به غشاء) باشد. دُمین‌های عملکردی اغلب در آزمایشگاه با بریدن پروتئین به کوچک‌ترین قطعه فعال آن با کمک پروتئازها (آنزیم‌هایی هستند که پلی‌پپتید هدف را در یک یا چند پیوند می‌برند) شناسایی می‌شوند. هم‌چنین می‌توان DNA رمزدهی‌کننده پروتئین را تغییر داد به طوری که وقتی از DNA تغییر یافته برای ساخت پروتئین استفاده شود، فقط آن ناحیه خاص، یا دُمین عملکردی از کل پروتئین ساخته شود. بنابراین با این روش‌ها می‌توان، ناحیه‌ای از پروتئین را که مسئول فعالیت آن است، تعیین نمود. در حقیقت دمین‌های عملکردی اغلب با دمین‌های ساختاری مربوطه، همراه هستند.

دُمین ساختاری[9] ناحیه‌ای با طول حدود ۴۰ اسیدآمینه یا بیشتر بوده و به صورت ساختارهای دوم و سوم مشخص و پایدار آرایش می‌یابد و همچنین اغلب می‌تواند به صورت ساختاری مستقل از بقیه قسمت‌های پروتئین تا بخورد. دمین‌های ساختاری می‌توانند به هم متصل شده (به وسیله رشته‌های پلی‌پپتیدی کوتاه یا بلند) و پروتئین بزرگ و چند دُمینی تشکیل دهند. به عنوان مثال زیر واحدهای هماگلوتینین حاوی یک دُمین کروی و یک دُمین رشته‌ای است (شکل a ۱۰ـ۳). دُمین‌های ساختاری (که از ساختارهای دوم و سوم

1- Heptad-repett
2- Heptad
3- Leucine zipper
4- EF hand
5- Hilix-Turn-helix
6- Basic helix-loop-helix
7- Zinc finger
8- Functional domain
9- structural domain

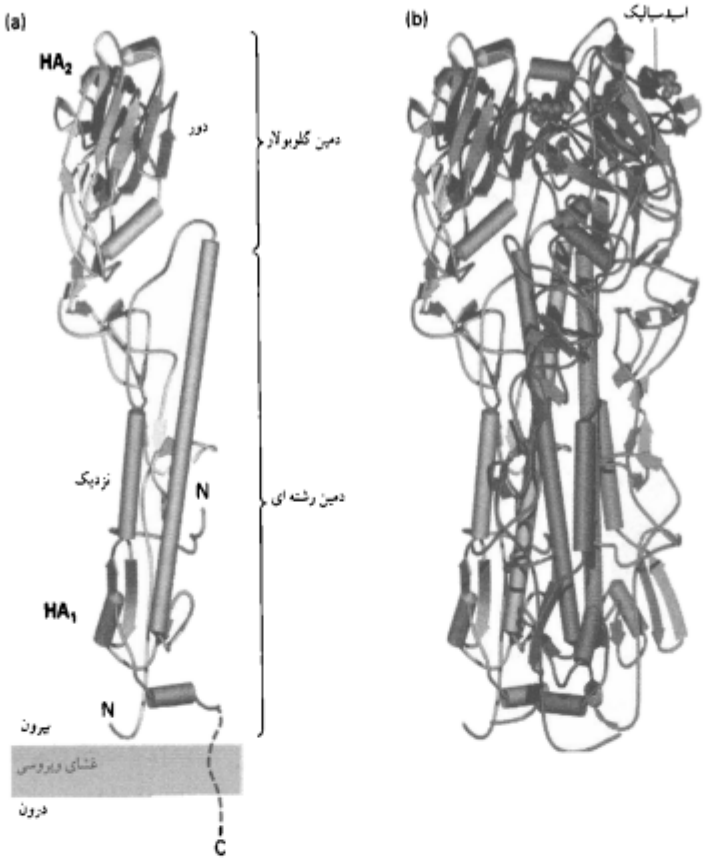


▲ **شکل ۹-۳ موتیف‌های ساختار دوم پروتئین.** a) موتیف دو رشته‌ای کویل‌کویل همسو (چپ) به وسیله دو مارپیچ α که دور هم پیچیده‌اند، مشخص می‌شود. فشردگی این مارپیچ‌ها به وسیله میانکنش بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آبگریز پایدار می‌شود. این اسیدهای آمینه آبگریز در فواصل منظم در طول هر رشته موجود بوده و در بین دو رشته قرار می‌گیرند. هر مارپیچ α توالی تکراری از هفت اسیدآمینه است، این اسیدهای آمینه اغلب آبگریز بوده (نه همیشه) و در موقعیت‌های ۱ و ۴ قرار می‌گیرند. طبیعت پیچ در پیچ این موتیف ساختاری در کویل‌کویل‌های طویل، بیشتر مشخص می‌شود (شکل سمت راست در اندازه‌ای متفاوتی رسم شده است). b) دست EF، نوعی موتیف مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ بوده و دارای دو مارپیچ α است که به وسیله حلقه‌ای کوتاه به هم متصل شده و کنفورماسیونی ایجاد می‌کند که در بسیاری از پروتئین‌ها هم‌چون اغلب پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم و پروتئین‌های تنظیمی متصل‌شونده به DNA، مشترک می‌باشد. در پروتئین متصل‌شونده به کلسیم مثل کالمودولین، اتم‌های اکسیژن از پنج رزیدو در حلقه غنی از آسپارتات و گلوتامات و یک مولکول آب، با یون Ca^{2+} پیوند یونی تشکیل می‌دهند. c) موتیف انگشت روی در اغلب پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA موجود می‌باشند. این پروتئین‌ها به تنظیم رونویسی کمک می‌کنند. یک یون روی به وسیله یک جفت رزیدوی سیستئین و یک جفت هیستیدین نگهداری می‌شود. این رزیدوها به وسیله یک جفت رشته β و یک مارپیچ α تأمین می‌شود. دو رزیدوی سیستئین ثابت در موقعیت‌های ۳ و ۶ و دو رزیدوی هیستیدین ثابت در موقعیت‌های ۲۰ و ۲۴ این موتیف ۲۵ رزیدوی قرار می‌گیرند.

تشکیل شده‌اند) مثل موتیف‌های ساختاری (تشکیل شده از ساختارهای دوم) به صورت واحدهایی در پروتئین‌های مختلف قرار می‌گیرند. واحد به واحد بودن معماری پروتئین در پروتئین‌ها به خصوص در پروتئین‌های بزرگ به راحتی قابل تشخیص است. پروتئین‌های بزرگ تمایل دارند موزائیکی از دُمین‌های مختلف باشند به‌طوری که هر کدام از این دُمین‌ها، فعالیت جداگانه‌ای داشته و بنابراین می‌توانند عملکردهای متفاوتی، به‌طور همزمان داشته باشند. دُمین‌های ساختاری اغلب دُمین‌های عملکردی نیز هستند. آنها می‌توانند فعالیت مستقل از بقیه قسمت‌های پروتئین داشته باشند. در فصل ۶ مکانیسم‌هایی را مورد توجه قرار می‌دهیم که در اثر آنها قطعات ژنی مرتبط با دُمین‌ها، طی تکامل جابه‌جا شده و نتیجه این جابه‌جایی، ظهور این دُمین‌ها در اغلب پروتئین‌ها می‌باشد.

دُمین فاکتور رشد اپیدرمی[1] (EGF)، دمین ساختاری بوده و در پروتئین‌های متعددی وجود دارد (شکل ۱۱-۳). EGF، هورمون پپتیدی کوچک و محلولی بوده و به سلول‌ها در جنین، پوست و بافت پیوندی بزرگسالان متصل شده و باعث تقسیم آنها می‌شود. این هورمون با شکست پروتئولیزی دُمین‌های تکراری EGF در پروتئین پیش‌ساز EGF ساخته می‌شود. این پروتئین به وسیله دُمین عبورکننده از غشاء، به غشاء متصل می‌شود. دمین‌های EGF با توالی شبیه به (نه یکسان) هورمون پپتیدی EGF در سایر

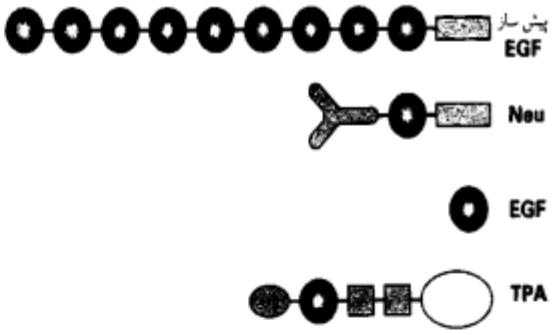
1- Epidermal growth factor



▲ **شکل ۱۰-۳ سطوح ساختاری سوم و چهارم.** پروتئین به تصویر کشیده شده در این‌جا (هماگلوتینین (HA)) در سطح ویروس آنفلوانزا یافت می‌شود. این مولکول چند مری و طویل، سه زیر واحد یکسان دارد که هر کدام از دو زنجیره پلی‌پپتیدی HA_1 و HA_2 تشکیل شده‌اند. a) ساختار سوم زیر واحد HA از تا خوردن مارپیچ‌ها و رشته‌هایش به صورت ساختاری فشرده با ۱۳/۵ nm طول و دو دُمین تشکیل شده است. دمین دور از غشاء[1] به صورت ساختمان فضایی گلبولار تا می‌خورد. دُمین نزدیک به غشاء[2] به دلیل قرار گرفتن دو مارپیچ α طویل از HA_2 کنار رشته‌های β در HA_1، کنفورماسیونی رشته‌ای و شبیه ساقه دارد. پیچ‌های کوتاه و حلقه‌های طویل (اغلب در سطح مولکول قرار می‌گیرند) رشته‌ها و مارپیچ‌ها را در هر رشته به هم مرتبط می‌سازند. b) ساختار چهارم HA از طریق میانکنش‌های جانبی ایجاد شده بین مارپیچ‌های طویل در دمین‌های رشته‌ای سه زیر واحد، پایدار شده و کویل‌کویل سه رشته‌ای را تشکیل می‌دهند. به هر کدام از دُمین‌های گلبولار دور، در HA روی سطح سلول‌های هدف، اسیدسیالیک متصل می‌شود. HA مثل اغلب پروتئین‌های غشایی، دارای چندین زنجیره کربوهیدراتی است که از طریق پیوند کووالان به آن متصل شده‌اند (نشان داده نشده است).

پروتئین‌ها، موجود بوده و به وسیله پروتئولیز می‌توانند آزاد شوند. این پروتئین‌ها شامل فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی[3] (TPA) (پروتئازی که برای حل لخته‌های خون در حملات قلبی به کار می‌رود)، پروتئین نئو[4] (پروتئینی که در تمایز جنینی مشارکت می‌کند) و پروتئین نُچ[5] (یک پروتئین گیرنده در غشاء پلاسمایی بوده و عملکردش در انتقال پیام‌های تکوینی است) است (فصل ۱۶). این پروتئین‌ها در اطراف دُمین EGF، دُمین‌هایی مشترک با سایر پروتئین‌ها دارند. به عنوان مثال TPA، یک دُمین تریپسین دارد. این دُمین عملکردی در بعضی از پروتئازها دیده می‌شود. گمان می‌رود تا ۱۰۰۰ نوع دمین‌ساختاری مختلف در همه پروتئین‌ها وجود داشته باشد. بعضی از این دُمین‌ها چندان معمول نیستند، در حالی که بعضی دیگر در اغلب پروتئین‌ها یافت می‌شوند. براساس بعضی ارزیابی‌ها، ۹ دُمین عمده در مجموع یک سومِ دُمین‌ها را در همه پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. دمین‌های ساختاری را می‌توان در پروتئین‌هایی که با کریستالوگرافی اشعه X یا تشدید مغناطیسی

1- Membrane-distal Domain
2- Membrane-proximal Domain
3- Tissue plasminogen activator
4- Neu Protein
5- Notch Protein



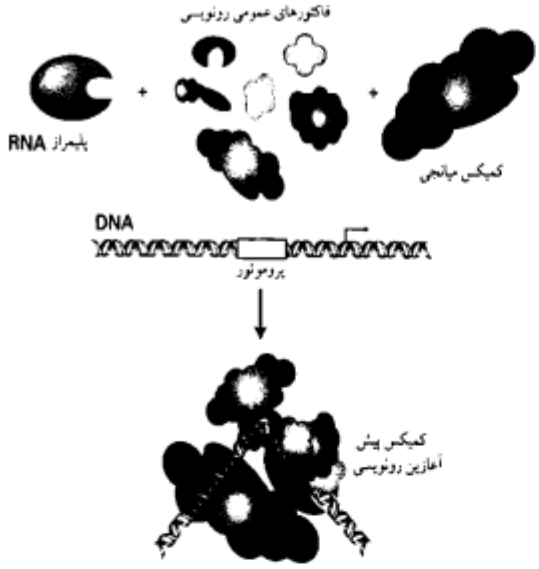
▲ **شکل ۱۱-۳ طبیعت واحد به واحد، دُمین‌های پروتئین.** فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) از طریق شکست پروتئولیتیک پروتئین پیش‌سازش تولید می‌شود. این پروتئین پیش‌ساز حاوی چندین دمین EGF و دمین گذرنده از غشاء است. دمین EGF در پروتئین نئو و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (TPA) نیز وجود دارد. این پروتئین‌ها دمین‌های دیگری نیز دارند که بوسیله شکل و رنگ خاص نشان داده شده‌اند.

هسته (NMR) و یا در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی تعیین ساختار شده‌اند، تشخیص داد.

نواحی از پروتئین‌ها که به وسیله ارتباط فضایی جداگانه‌شان از سایر قسمت‌های پروتئین مشخص می‌شوند، **دمین‌های توپولوژیکی**[1] هستند. به عنوان مثال، بعضی پروتئین‌ها که به سطح غشاهای سلولی پیوسته‌اند، می‌توانند قسمتی امتداد یافته به داخل سیتوپلاسم (دُمین سیتوپلاسمی)، قسمت جاگرفته در درون غشاء دو لایه فسفولیپیدی (دُمین گذرنده از غشاء[2]) و یک قسمت امتداد یافته به طرف فضای خارج سلولی (دُمین خارج سلولی[3]) داشته باشند. هر کدام از این‌ها می‌توانند دارای یک یا چند موتیف و دمین ساختاری و یا عملکردی باشند.

پروتئین‌ها به صورت ساختارهای چند زیرواحدی و اجتماعات ماکرومولکولی تجمع می‌یابند

پروتئین‌های **چند زیر واحدی**[4] حاوی دو یا چند زنجیره یا زیر واحد پلی‌پپتیدی هستند. سطح چهارم از سازمان‌یابی ساختاری (ساختار چهارم)، درباره تعداد (استوکیومتری) و جایگاه‌های نسبی زیر واحدها در پروتئین‌های چند زیرواحدی، توضیح می‌دهد. به عنوان مثال، هماگلوتینین یک پروتئین سه زیرواحدی است که از سه زیر واحد یکسان (هوموتریمر[5]) تشکیل شده و از طریق پیوندهای غیرکووالان کنار هم نگه داشته می‌شوند (شکل b ۱۰-۳). پروتئین‌های چند زیرواحدی دیگر می‌توانند از چند زیر واحد یکسان (هومومریک[6]) یا متفاوت (هترومریک[7]) تشکیل شوند (مبحث



▲ **شکل ۱۲-۳ ماشین ماکرومولکولی، کمپلکس آغازین رونویسی.** RNA پلیمراز، فاکتورهای عمومی رونویسی، کمپلکس میانجی حدوداً با ۲۰ زیر واحد و سایر کمپلکس‌های پروتئینی که در این‌جا نشان داده نشده‌اند بر روی پروموتر در DNA جمع می‌شوند. پلیمرازها، رونویسی DNA را انجام می‌دهند و پروتئین‌های همراه برای شروع اتصال پلیمراز به پروموتر اختصاصی، لازم می‌باشند. در این جا چندین پروتئین با همدیگر به عنوان یک ماشین عمل می‌کنند.

هموگلوبین را ملاحظه کنید). اغلب زیر واحدهای تک زیرواحدی از پروتئین چند زیرواحدی، به تنهایی دارای عملکرد نمی‌باشند و فقط در صورتی عملکرد دارند که به صورت پروتئین چند زیرواحدی باشند. در بعضی موارد، تجمع به صورت پروتئین چندزیر واحدی (اولیگومریزه شده[8]) به پروتئین‌ها امکان می‌دهد، در یک مسیر به‌طور پی در پی و مؤثرتری عمل نمایند. این عملکرد مؤثر به دلیل کنار هم قرارگیری زیر واحدها می‌باشد.

بالاترین سطح در سطوح ساختاری پروتئین، تجمع پروتئین‌ها به صورت اجتماعات ماکرومولکولی است. چنین ساختارهایی خیلی بزرگ هستند به‌طوری که در بعضی موارد وزن مولکولی‌شان تا بیش از

1- Topological domains
2- Membrane-Spaning Domain
3- Extracellular Domain
4- Multimeric
5- Homotrimer
6- Homomeric
7- Hetromeric
8- Oligomerization

۱ میلیون دالتون و اندازه‌شان از ۳۰ تا ۳۰۰ نانومتر می‌رسد. هر کدام از این اجتماعات می‌توانند حاوی ده‌ها یا صدها زنجیره پلی‌پپتیدی بوده و همچنین در بعضی موارد حاوی پلیمرهای زیستی دیگر، همچون اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. کپسید[1] در ویروس‌ها، مثالی از اجتماع ماکرومولکولی با عملکرد ساختاری است. کپسید، اسیدهای نوکلئیک ژنوم ویروسی را در بر می‌گیرد. دسته رشته‌های اسکلت سلولی که به غشاء پلاسمایی شکل می‌دهند، مثالی دیگر از اجتماعات ماکرومولکولی هستند. سایر اجتماعات ماکرومولکولی به عنوان ماشین‌های مولکولی عمل نموده و فرآیندهای بسیار پیچیده سلولی را با یکپارچه کردن عملکردهای مختلف به صورت یک فرآیند هماهنگ، انجام می‌دهند.

به عنوان مثال، ماشین رونویسی، مسئول سنتز RNA **پیک**[2] (mRNA) از روی DNA الگو است. این ماشین رونویسی (با جزئیات بیشتری در فصل ۴ توضیح داده می‌شود) حاوی RNA پلیمراز (که یک آنزیم چندزیرواحدی است) و حداقل ۵۰ ترکیب دیگر شامل فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های متصل‌شونده به پروموتر، هلیکاز و سایر کمپلکس‌های پروتئینی (شکل ۱۲-۳) می‌باشد. ریبوزوم ماشین پیچیده‌ای از چندین پروتئین و چندین اسید نوکلئیک است و پروتئین سنتز می‌کند. ریبوزوم‌ها نیز در فصل ۴ توضیح داده شده‌اند.

اعضای خانواده‌های پروتئینی، از لحاظ تکاملی جد مشترک دارند

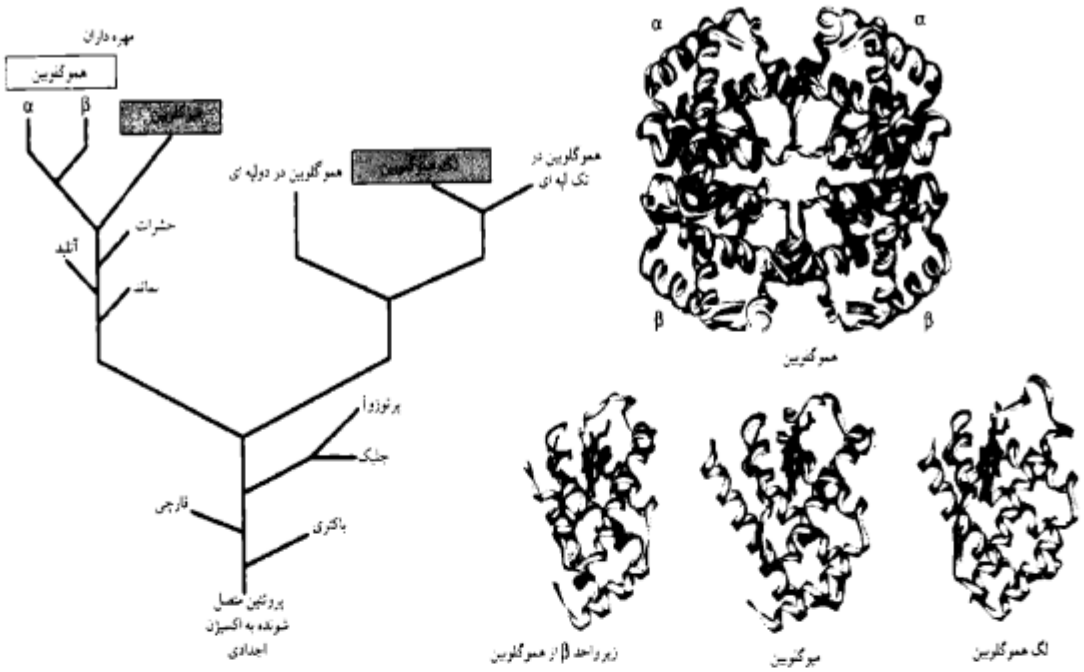
مطالعه میوگلوبین و هموگلوبین (پروتئین‌های حامل اکسیژن در عضله و سلول‌های قرمز خون) شواهدی را فراهم نمود که نشان داد عملکرد پروتئین حاصل ساختار سه‌بعدی آن است. ساختار سه‌بعدی نیز به وسیله توالی اسیدآمینه‌ای تعیین می‌شود. تجزیه و تحلیل کریستالوگرافی اشعه X، نشان داد ساختارهای سه‌بعدی میوگلوبین (یک مونومر) و زیر واحدهای α و β هموگلوبین (یک تترامر $\alpha_2\beta_2$) به‌طور چشم‌گیری با هم شباهت دارند. تعیین توالی میوگلوبین و زیر واحدهای هموگلوبین نشان می‌دهد، در موقعیت‌های یکسان در ساختار اول هر دو پروتئین رزیدوهای یکسان و یا مشابه از لحاظ شیمیایی وجود دارد. یک جهش در ژن رمزدهی‌کننده رشته بتای هموگلوبین باعث جانشینی، والین به جای اسید گلوتامیک شده و در نتیجه تا خوردگی و عملکرد هموگلوبین را به هم زده و بیماری **کم‌خونی داسی شکل**[3] را ایجاد می‌نماید.

مقایسه پروتئین‌های دیگر ارتباط بین توالی اسیدآمینه‌ای، ساختار سه‌بعدی و عملکرد پروتئین را تأیید می‌کند استفاده از مقایسه توالی برای تعیین عملکرد پروتئین، به دلیل مشخص شدن توالی ژنوم بیشتر موجودات زنده در سالیان اخیر رواج یافته است.

انقلاب مولکولی در زیست‌شناسی در دهه‌های آخر قرن بیستم، طرح جدیدی از رده‌بندی زیستی را نیز به وجود آورده است. این طرح براساس شباهت‌ها و تفاوت‌های توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌ها می‌باشد. پروتئین‌هایی که جد مشترک دارند **همولوگ**[4] نامیده می‌شوند. دلیل اصلی برای **همولوژی**[5] بین پروتئین و هم‌چنین برای وجود جد مشترک، شباهت توالی ساختارها یا توالی‌های پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین ما می‌توانیم پروتئین‌های هموگ را در یک **خانواده**[6] قرار داده و ارتباط هر پروتئین با خانواده‌اش را از طریق مقایسه شباهت‌های توالی‌هایشان ردیابی نماییم. ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های هموگ تا خورده حتی اگر قسمت‌هایی از ساختار اول‌شان، همولوژی کمی با هم داشته باشند، شبیه هم هستند. در ابتدا، پروتئین‌های با تشابه توالی نسبتاً بالا (بیشتر از ۵۰ درصد کاملاً یکسان هستند) و با ساختارها یا عملکردهای مرتبط با هم به عنوان خانواده‌ای با ارتباط تکاملی شناخته می‌شدند، در حالی که **ابرخانواده**[7] شامل دو یا چند خانواده بوده و شباهت توالی بین خانواده‌ای، کم‌تر از (حدوداً ۴۰-۳۰ درصد توالی پروتئین‌ها یکسان است) پروتئین‌های متعلق به یک خانواده بود. در کل عقیده بر این بود که پروتئین‌های با بیش از ۳۰ درصد شباهت، احتمالاً ساختارهای سه‌بعدی مشابهی دارند. با وجود این، پروتئین‌های با تشابه توالی خیلی کم می‌توانند ساختار خیلی مشابهی داشته باشند. اخیراً پیشنهاد شده، تعریف‌های خانواده و ابرخانواده مورد تجدید نظر قرار گیرد. در این پیشنهاد خانواده شامل پروتئین‌هایی با ارتباط تکاملی آشکار (یا بیشتر از ۳۰ درصد از توالی‌ها یکسان باشد و یا یکسان بودن توالی‌ها کم‌تر ۳۰ درصد بوده ولی اطلاعات ساختاری و عملکردی پروتئین وجود جد مشترک را نشان دهد) می‌باشد، در حالی‌که ابرخانواده شامل پروتئین‌هایی است که احتمال دارد یک منشأ تکاملی مشترک‌داشته باشند. بیشتر محققین فقط زمانی پروتئین‌ها را در یک ابرخانواده مشترک (دارا بودن یک منشأ تکاملی مشترک) قرار می‌دهند که دارای یک یا چند دمین یا موتیف مشترک باشند.

ارتباط خویشاوندی بین پروتئین‌های هموگ به راحتی با

1- Capside
2- Messenger RNA
3- Sickle-cell anemia
4- Homolog
5- Homology
6- Family
7- Super family



▲ **شکل ۱۳ـ۳ تکامل خانواده پروتئین گلوبین.** چپ: گلوبین اولیه متصل‌شونده به اکسیژن که به صورت تک‌زیرواحدی است. عقیده بر این است که این گلوبین جد هموگلوبین‌های خونی، میوگلوبین‌های عضلانی و لگ هموگلوبین‌های گیاهی مدرن و امروزی است. مقایسه توالی‌ها نشان داده، تکامل پروتئین‌های گلوبین همسو با تکامل جانوران و گیاهان انجام گرفته است. محل تقاطع اصلی، واگرایی گلوبین‌های گیاهی از جانوری و میوگلوبین از هموگلوبین می‌باشد. در آخر، مضاعف شدن ژن‌ها باعث ایجاد زیر واحدهای α و β در هموگلوبین شده است. راست: هموگلوبین تترامری از دو زیر واحد α و دو زیر واحد β است. شباهت ساختاری این زیر واحدها با لگ هموگلوبین و میوگلوبین (هر دو تک‌زیرواحدی هستند)، در این‌جا به وضوح دیده می‌شود. مولکول هم به طور غیرکووالان با هر رشته پلی‌پپتیدی گلوبین پیوند یافته و به طور مستقیم در اتصال این پروتئین‌ها به اکسیژن نقش دارد.

دیاگرام درختی که براساس تجزیه و تحلیل توالی است قابل رؤیت می‌باشد. به عنوان مثال، توالی اسیدآمینه‌ای گلوبین‌ها (پروتئین‌های هموگلوبین و میوگلوبین و منسوبین آنها در باکتری‌ها، گیاهان و جانوران) می‌گوید این پروتئین‌ها از یک پروتئین تک‌زیرواحدی و اجدادی با توانایی اتصال به اکسیژن تکامل یافته‌اند (شکل ۱۳ـ۳). با گذشت زمان ژن این پروتئین اجدادی تغییر یافته و ابتدا باعث ایجاد گلوبین‌های جانوری و گیاهان شده است. سپس تغییرات باعث شده، میوگلوبین (پروتئین تک زیرواحدی ذخیره کننده اکسیژن در عضله) و زیر واحدهای α و β مولکول تترامر هموگلوبین $(\alpha_2\beta_2)$ سیستم گردش خون ایجاد گردد.

نکات کلیدی بخش ۱-۳

سطوح ساختاری پروتئین‌ها

■ یک پروتئین پلیمر خطی از اسیدهای آمینه است، این اسیدهای آمینه با پیوند پپتیدی به هم متصل شده‌اند. اغلب میانکنش‌های (بیشتر غیرکووالان) بین اسیدهای آمینه در توالی خطی، ساختار سه‌بعدی اختصاصی یا ساختمان فضایی پروتئین را پایدار می‌کنند.

■ مارپیچ α رشته یا صفحه β و پیچ β بیشترین عناصر ساختار دوم پروتئین می‌باشند. ساختار دوم با پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های اسکلت پپتیدی، پایدار می‌شود.

■ ساختار سوم پروتئین حاصل میانکنش آبگریز بین گروه‌های جانبی غیرقطبی و پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های جانبی قطبی با اسکلت پلی‌پپتیدی است. این میانکنش‌ها، تا خوردن ساختار دوم به صورت یک آرایش فشرده را پایدار می‌نمایند.

■ ترکیب خاصی از ساختارهای دوم باعث ایجاد موتیف‌های مختلف می‌شود. این موتیف‌ها در بسیاری از پروتئین‌ها یافت شده و اغلب عملکرد ویژه‌ای دارند (شکل ۹ـ۳ را ملاحظه کنید).

■ پروتئین‌ها اغلب حاوی دُمین‌های متفاوتی هستند. این دُمین‌ها نواحی از ساختار دوم و سوم می‌باشند که به‌طور مستقل تا می‌خورند و ساختار، عملکرد و خواص توپولوژیکی مشخصی دارند (شکل ۱۰ـ۳ را ملاحظه کنید).

■ به هم پیوستن دُمین‌ها به صورت یک به یک در پروتئین‌های مختلف طی تکامل باعث ایجاد تنوع در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها شده است.

■ تعداد و سازمان‌یابی زیر واحدهای پلی‌پپتیدی در پروتئین‌های چند زیرواحدی، ساختار چهارم آنها را تعیین می‌کند.

■ سلول‌ها حاوی اجتماعات ماکرومولکولی هستند. در این اجتماعات ماکرومولکولی، همه اجزاء شرکت‌کننده لازم در فرآیندهای پیچیده سلولی (مثل: سنتز DNA، RNA و پروتئین، فتوسنتز، انتقال سیگنال) با هم ترکیب شده و ماشین‌های مولکولی را تشکیل می‌دهند.

■ پروتئین‌های همولوگ که دارای توالی، ساختار و عملکرد مشابهی هستند از یک جد مشترک تکامل می‌یابند و آنها را می‌توان به صورت خانواده و ابرخانواده رده‌بندی کرد.

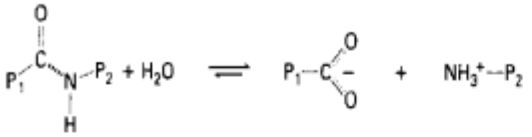
۳ـ۲ تا خوردگی پروتئین

همان‌طوری که قبلاً اشاره شد در ساختارهای زیستی همچون پروتئین‌ها «عملکرد در پی شکل‌گیری ساختار» یا «عملکرد در اثر شکل‌گیری ساختار» است. بنابراین وقتی پلی‌پپتیدی با ساختار اول (توالی) ساخته می‌شود، لازم است به صورت ساختمان فضایی صحیح سه‌بعدی و ساختارهای مناسب دوم، سوم و در صورت امکان ساختار چهارم تا بخورد.

زنجیره پلی‌پپتیدی به وسیله فرآیند پیچیدهٔ **ترجمه** ساخته می‌شود. در فرآیند ترجمه، اسیدهای آمینه به صورت توالی دیکته شده توسط **RNA پیک (mRNA)** به هم می‌پیوندند. این فرآیند به وسیله کمپلکس بزرگ پروتئین ـ اسید نوکلئیک به نام **ریبوزوم** انجام می‌شود (فرآیند ترجمه در فصل ۱۴ توضیح داده می‌شود). در این‌جا عوامل کلیدی تعیین‌کننده در تا خوردگی صحیح پلی‌پپتید تازه سنتز شده (تازه تشکیل شده یا در حال تشکیل) را بررسی می‌کنیم.

پیوندهای پپتیدی مسطح، اشکالی را که پروتئین می‌تواند به آنها تا بخورد، محدود می‌نمایند.

عامل اصلی ساختار پلی‌پپتید که تا خوردن زنجیره پلی‌پپتیدی را محدود می‌کند، پیوند پپتیدی مسطح است. شکل ۳ـ۳ گروه آمید را در پیوندهای پپتیدی یک زنجیره پلی‌پپتیدی نشان می‌دهد زیرا پیوند پپتیدی، خود تا حدودی رفتار شبیه به پیوند دوگانه نشان می‌دهد.



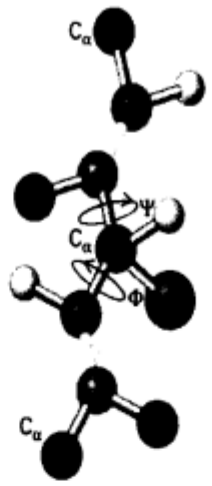
کربن کربونیل و نیتروژن آمید و اتم‌هایی که به‌طور مستقیم به آنها متصل می‌شوند، همگی بایستی در یک صفحه ثابت قرار گیرند (شکل ۱۴ـ۳). امکان چرخش برای خود پیوند پپتیدی وجود ندارد. بنابراین تنها انعطاف‌پذیری موجود در اسکلت زنجیره پلی‌پپتیدی که امکان می‌دهد زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی به ساختمان فضایی متفاوت (تا خوردن پیچ‌ها و پیچش‌ها به صورت اشکال سه‌بعدی متفاوت) وفق یابد، چرخش صفحه‌های ثابت پیوند پپتیدی نسبت به یکدیگر است. این چرخش حول دو پیوند یعنی پیوند $C\alpha$ ـ نیتروژن آمینو (زاویه چرخش ϕ) و پیوند $C\alpha$ ـ کربن کربونیل (زاویه چرخش ψ) انجام می‌شود.

مانع دیگر در تطابق یافتن اسکلت زنجیره پلی‌پپتیدی به صورت ساختمان فضایی‌های متعدد، مقادیر محدود زوایای ϕ و ψ ممکن می‌باشد زیرا اغلب زوایای ϕ و ψ در اتم‌های اسکلت زنجیره پلی‌پپتیدی و زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه به همدیگر خیلی نزدیک بوده و بنابراین بیشتر ساختمان‌های فضایی بالقوه بسیار ناپایدار بوده و حتی حصول به این ساختمان‌های‌فضایی از لحاظ فیزیکی غیرممکن است.

اطلاعات جهت‌دهنده به تا خوردگی پروتئین به وسیله توالی اسیدآمینه‌ای رمزدهی می‌شوند

با وجود این‌که به نظر می‌رسد زوایای پیوندی در اسکلت زنجیره پلی‌پپتیدی خیلی محدود می‌باشند، اما اگر یک زنجیره تنها چند رزیدو داشته باشد، می‌تواند ساختمان‌های‌فضایی زیادی را ایجاد نماید.

به عنوان مثال اگر زوایای پیوندی ϕ و ψ فقط حاوی هشت آرایش متفاوت نسبت به هم باشند، یک زنجیره پلی‌پپتیدی با n رزیدو می‌تواند به 8^n ساختمان فضایی تبدیل شود (این مقدار برای یک زنجیره پلی‌پپتیدی کوچک فقط با ۱۰ رزیدو می‌تواند به تعداد ۸/۶ میلیون کونفورماسیون باشد)! در عمل هر پروتئین فقط یک یا چند ساختمان فضایی محدود و خیلی نزدیک به هم ایجاد می‌کند. این



▲ **شکل ۱۴ـ۳ چرخش بین گروه‌های صفحه‌ای پپتیدی در پروتئین‌ها.** چرخش حول پیوند $C\alpha$ ـ نیتروژن آمینو (زاویه چرخش ϕ) و پیوند $C\alpha$ ـ کربن کونیل (زاویه چرخش ψ) به زنجیره پلی‌پپتیدی امکان می‌دهد تا به‌طور بالقوه به شمار زیادی ساختمان فضایی تبدیل شود. با این حال محدودیت‌های فضایی اسکلت پلی‌پپتیدی و خواص زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه، به طور چشم‌گیری ساختمان فضایی‌های بالقوه را که در مورد یک پروتئین می‌توانند ایجاد شود، محدود می‌سازند.

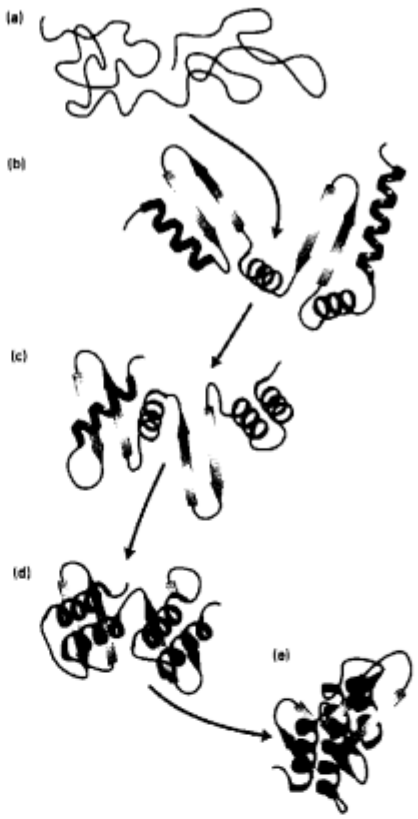
ساختمان فضایی‌ها، عملکرد خاصی داشته و **حالت طبیعی**[1] پروتئین نامیده می‌شوند. برای اغلب پروتئین‌ها حالت طبیعی شکل تا خورده و پایدار پروتئین است. از منظر ترمودینامیکی، حالت طبیعی معمولاً ساختمان فضایی است که دارای پایین‌ترین انرژی آزاد باشد. اما کدام خصوصیت پروتئین‌ها باعث می‌شود از میان تعداد بسیار زیاد ساختمان فضایی، فقط یک ساختمان فضایی ایجاد شود؟ خصوصیات زنجیره‌های جانبی (مثل، اندازه، آبگریزی، توانایی تشکیل پیوندهای یونی و هیدروژنی) به همراه توالی خاص اسکلت پلی‌پپتیدی باعث ایجاد محدودیت می‌شوند. به عنوان مثال، زنجیره جانبی بزرگ موجود در اسیدآمینه‌ای همچون تریپتوفان مانع (محدویت فضایی) فشرده شدن یک ناحیه در زنجیره پلی‌پپتیدی به ناحیه دیگر از آن می‌شود یا زنجیره جانبی با بار مثبت مثلاً در آرژنین ممکن است قطعه‌ای از زنجیره پلی‌پپتیدی با زنجیره جانبی منفی (مثل اسید آسپارتیک) را جذب کند. مثال دیگر زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک هستند که قبلاً درباره تأثیر آنها در تکراری‌های هفت‌تایی بر روی تشکیل کویل‌کویل‌ها بحث شد. بنابراین در کل، ساختار اول پلی‌پپتید، ساختار دوم، سوم و چهارم پروتئین را تعیین می‌کند.

شواهد اولیه درباره اینکه اطلاعات لازم برای تا خوردن صحیح‌پروتئین در توالی آن نهفته است از مطالعات آزمایشگاهی بر روی تا خوردن مجدد پروتئین‌های خالص به دست آمده است. عوامل مختلفی (هم‌چون انرژی حرارتی حاصل از گرما، pHهای غیرطبیعی که باعث تغییر بار زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه می‌شود و مواد شیمیایی به نام **دناتوره‌کننده‌ها**[2] هم‌چون اوره یا گوانیدین هیدروکلراید در غلظت‌های ۶ـ۸ مولار می‌توانند میانکنش‌های ضعیف غیرکووالان (میانکنش‌های پایدارکننده ساختمان‌های فضایی طبیعی پروتئین) پروتئین را از بین برده و باعث **دناتوره شدن**[3] آن شوند. تیمار پروتئین با مواد احیاکننده‌ای هم‌چون بتامرکاپتو اتانول، پیوندهای دی‌سولفیدی را شکسته و باعث ناپایداری بیشتر پروتئین‌های حاوی پیوندهای دی‌سولفیدی می‌شود. تحت شرایط دناتوره‌کننده و بازکننده ساختار پروتئین، مولکول‌های تا خورده به مولکول‌های باز شده یا دناتوره شده تبدیل می‌شوند. این مولکول‌های دناتوره‌شده دارای ساختمان‌های فضایی مختلف و زیاد و غیرفعال از لحاظ زیستی می‌باشند، بنابراین آنتروپی افزایش می‌یابد. همان‌طوری که دیدیم، ساختمان‌های فضایی غیرطبیعی بسیار زیادی وجود دارد (مثل ۱ـ8^n).

باز شدن ساختار پروتئین تحت شرایط دناتوره‌کننده حیرت‌آور نیست. این عمل باعث افزایش آنتروپی می‌شود اما موضوع جالب این است که وقتی یک نمونه خاص از پروتئین باز شده به شرایط طبیعی برگردانده شود (دمای بدن، pHهای معمولی، کاهش غلظت دناتوره‌کننده‌ها با رقیق کردن یا برداشت آنها) بعضی از پلی‌پپتیدهای دناتوره شده می‌توانند به‌طور خودبه‌خودی به حالت طبیعی و فعال زیستی برگردند (تا خوردن مجدد.) این نوع مطالعات بر روی تا خوردگی مجدد پروتئین‌ها به همراه مطالعاتی که بر روی پروتئین‌های سنتز شده از طریق شیمیایی انجام شده، نشان داد اطلاعات لازم برای تا خوردن مجدد صحیح پروتئین بایستی در توالی اولیه آن نهفته باشد.

پروتئین‌های تازه سنتز شده مثل پروتئین‌های دناتوره شده به ساختمان فضایی مناسب‌شان تا می‌خورند. شباهت در ساختار سه‌بعدی و تا خورده پروتئین‌هایی که توالی‌های مشابهی دارند (در قسمت ۱ـ۳ بررسی شدند)، دلیل دیگری بر نقش تعیین‌کننده توالی اولیه در تا خوردن پروتئین در داخل بدن موجودات زنده می‌باشد. مشخص شده است که ساختارهای دوم و موتیف‌های ساختاری در مراحل اولیه فرآیند تا خوردن شکل می‌گیرد. در پی این پدیده

1- Native state
2- Denaturants
3- Denaturation



▲ **شکل ۱۵-۳ مسیر فرضی تا خوردن پروتئین.** تا خوردن پروتئین از ساختار اول (a) به ساختار دوم (b-d) تا ساختار سوم (e). شکل‌گیری موتیف‌های ساختاری کوچک (c) قبل از تشکیل دُمین‌های پایدار (d) و ساختار سوم (e)، انجام می‌گیرد.

دُمین‌های پیچیده و خیلی فشرده جمع شده و سپس به هم پیوسته و ساختارهای بسیار پیچیده سوم و چهارم را ایجاد می‌کنند.

تاخوردن پروتئین‌ها در موجودات زنده بوسیله چاپرون‌ها انجام می‌گیرد

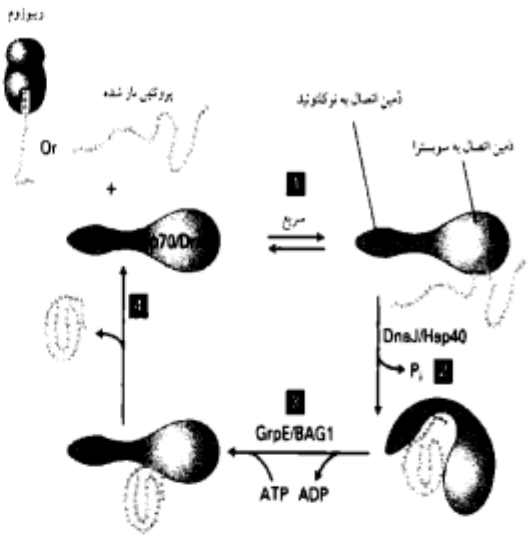
تصور می‌شود تا خوردن مجدد پروتئین دناتوره شده از جنبه‌های متعددی از تا خوردن پلی‌پپتید تازه سنتز شده تقلید کند. با این حال شرایط داخل سلول مثل شرایط آزمایشگاهی نیست که در آن آزمایشات تا خوردن مجدد پروتئین‌ها با پروتئین‌های خالص و درون لوله آزمایش انجام می‌شود. حضور مولکول‌های زیستی دیگر (بسیاری از پروتئین‌های دیگر با غلظت بالا، پروتئین تازه سنتز شده و یا در حال تا خوردن) می‌تواند به‌طور بالقوه با تا خوردن خودبه‌خود یک پروتئین تداخل نماید. اگرچه تا خوردن پروتئین‌ها به حالت طبیعی در شرایط آزمایشگاهی رخ می‌دهد اما این عمل برای همه مولکول‌های باز شده به موقع انجام نمی‌گیرد. در چنین مواردی، سلول‌ها به مکانیسمی نیازمند هستند تا باعث تا خوردن سریع و موثر پروتئین‌ها به شکل صحیح‌شان شود. بدون چنین سیستم کمکی، در اثر ساخته شدن پروتئین‌های غیرعملکردی و اشتباه تا خورده، انرژی زیادی به هدر خواهد رفت زیرا این پروتئین‌ها باید تخریب شوند تا از ایجاد اختلال در عملکرد سلولی ممانعت شود. سلول‌ها به‌طور آشکار مکانیسم‌هایی را برای تاخوردن پروتئین‌ها دارند زیرا بیشتر از ۹۵ درصد از پروتئین‌های موجود در سلول در ساختمان‌های فضایی طبیعی‌شان هستند. عامل مؤثر در سلول‌ها برای ایجاد تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها براساس توالی‌شان، وجود مجموعه‌ای از پروتئین‌ها به نام **چاپرون‌ها**[1] است.

چاپرون‌ها تا خوردن پروتئین را تسهیل می‌کنند. اهمیت آنها زمانی پررنگ‌تر می‌گردد که دیده می‌شود آنها در طی تکامل حفظ شده‌اند. چاپرون‌ها در همه موجودات زنده از باکتری‌ها گرفته تا انسان یافت شده‌اند. بعضی از آنها همولوگ بوده و در کمک به تاخوردن پروتئین‌ها تقریباً مکانیسم یکسانی دارند. چاپرون‌ها (که در یوکاریوت‌ها در هر قسمت و اندامک سلولی قرار می‌گیرند) به پروتئین‌هایی متصل می‌شوند که به آنها در تا خوردن کمک خواهند کرد. دو خانواده چاپرون شناخته شده است.

- **چاپرون‌های مولکولی**[2]، به پروتئین‌های باز شده یا ناقص تا خورده متصل شده و آنها را پایدار می‌نمایند بنابراین چاپرون‌ها این پروتئین‌ها را از تخریب شدن و تجمع نامناسب محافظت می‌کنند.
- **چاپرونین‌ها**[3]، یک محفظه کوچک تا خوردن ایجاد می‌کنند. در داخل این محفظه، پروتئین تانخورده یا بازشده می‌تواند قرار گرفته و در طی زمان مشخص و محیط مناسب به صورت صحیح تا بخورد.

یکی از دلایل نیاز به چاپرون جهت تا خوردن پروتئین در داخل سلول این است که از تجمع نامناسب پروتئین‌های تانخورده یا باز شده ممانعت می‌کنند. پروتئین‌های باز شده و یا تا حدودی تا خورده تمایل دارند به صورت اجرام بزرگ و غالباً نامحلول در آب تجمع یابند. برای پروتئین، جدا شدن از این اجرام و سپس تا خوردن به ساختمان فضایی صحیح کار بسیار دشواری است. در طی تجمع نامناسب[4]، زنجیره‌های جانبی آبگریز که در داخل پروتئین تا خورده قرار داشتند به بیرون می‌آیند. این زنجیره‌های جانبی آبگریز در معرض قرار گرفته، به وسیله اثر آبگریزی (فصل ۲) به همدیگر چسبیده و بنابراین باعث ایجاد تجمع نامناسب می‌شوند. هنگامی که مولکول تازه سنتز

1- Chaperones
2- Molecular chaperons
3- Chaperonins
4- Aggregation



▲ **شکل ۱۶ـ۳ تا خوردن پروتئین به واسطه چاپرون.** اغلب پروتئین‌ها با کمک پروتئین‌های شبیه Hsp70 به ساختار سه‌بعدی صحیح خود تا می‌خورند. این چاپرون‌های مولکولی به‌طور موقت به پلی‌پپتیدهای تازه سنتز شده و در حال خروج از ریبوزوم یا به پروتئین‌های باز شده متصل می‌شوند. در چرخه Hsp70، پروتئین باز شده به عنوان سوبسترا طی تعادل سریعی به کونفورماسیون باز دُمین اتصال به سوبسترای (SBD)[1] Hsp70 متصل می‌شود. در این حالت به دُمین اتصال به نوکلئوتید[2] (NBD) Hsp70. یک مولکول ATP متصل شده است (مرحله ❶). پروتئین‌های ضمیمه (DNaJ/Hsp40) باعث هیدرولیز ATP و تغییر کنفورماسیونی در Hsp70 شده و در نتیجه ساختمان فضایی باز به ساختمان فضایی بسته تبدیل می‌شود. در ساختمان فضایی بسته سوبسترا در داخل SBP قرار می‌گیرد. در این‌جا تا خوردگی صحیح پروتئین تسهیل می‌شود (مرحله ❷). مبادله ATP با ADP متصل شده به وسیله پروتئین‌های ضمیمه دیگر (GrpE/BAG1) تحریک شده و Hsp70 را به فرم باز تبدیل می‌کنند (مرحله ❸). در نهایت سوبسترا صحیح تا خورده آزاد می‌شود (مرحله ❹).

شده شروع به تا خوردن می‌کند، در معرض خطر تجمع نامناسب قبل از تکمیل تا خوردن صحیح‌اش، قرار می‌گیرد. چاپرون‌های مولکولی به پلی‌پپتید هدف متصل می‌شوند و یا آن را از پروتئین‌های نسبتاً باز شده و یا کاملاً باز شده جدا می‌کنند. بنابراین با این عمل از تجمع یافتن پروتئین ممانعت نموده و به پروتئین در حال سنتز فرصت تا خوردن صحیح را می‌دهند.

چاپرون مولکولی: پروتئین شوک حرارتی Hsp70 و هومولوگ‌های آن (Hsp70 در سیتوزول و ماتریکس میتوکندریایی، BiP در شبکه آندوپلاسمی و DNaK در باکتری‌ها) چاپرون‌های مولکولی هستند. آنها برای اولین بار در سلول‌هایی که تحت شوک حرارتی قرار گرفته بودند، شناسایی شدند (HsP مخفف heat-shock protein است). Hsp70 و هومولوگ‌هایش چاپرون‌های اصلی در همه موجودات زنده می‌باشند. پروتئین‌های شبیه Hsp70، هنگامی که به ATP متصل می‌شوند، شکل باز به خود می‌گیرند. که در این حالت پاکت‌های آبگریز در معرض قرار گرفته و به‌طور موقت به نواحی آبگریز پروتئین‌های ناقص تا خورده یا پروتئین‌های نسبتاً دناتوره متصل می‌شوند (شکل ۱۶ـ۳). هیدرولیز ATP متصل به چاپرون مولکولی باعث می‌شود چاپرون مولکولی به شکل بسته تبدیل شده و تا خوردن پروتئین هدف را تسهیل نماید. این امر بیشتر به دلیل جلوگیری از تجمع نامناسب پروتئین‌های باز شده می‌باشد. مبادله ATP با پروتئین متصل شده به ADP، موجب تغییر ساختمان فضایی در چاپرون شده و باعث آزاد شدن پروتئین هدف می‌شود.

پروتئین‌های دیگر همچون کوچاپرون ۴۰ Hsp40 در یوکاریوت‌ها (DNaJ در باکتری‌ها)، با تحریک هیدرولیز ATP به وسیله Hsp70/DnaK (شکل ۱۶ـ۳ را ملاحظه کنید) به افزایش کارایی تا خوردن اغلب پروتئین‌ها توسط Hsp70 کمک می‌کنند. پروتئین دیگری که در باکتری‌ها GrpE نامیده می‌شود (فعالیت مشابه با BAG1 در پستانداران دارد) نیز با Hsp 70/DnaK میانکنش داده و باعث مبادله ATP با ADP می‌شود.

عقیده بر این است که چاپرون‌های مولکولی چندگانه به همه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی در حال سنتز، به محض ساخته شدن در ریبوزوم متصل می‌شوند. در باکتری‌ها ۸۵ درصد از پروتئین‌ها از چاپرون‌ها رها شده و تا خوردن طبیعی خود را ادامه می‌دهند. در یوکاریوت‌ها، درصد بیشتری از پروتئین‌ها از این مسیر پیروی می‌کنند.

چاپرونین‌ها: تا خوردن صحیح انواع زیادی از پروتئین‌های تازه سنتز شده، به کمک دسته دیگری از پروتئین‌ها نیاز دارد. این پروتئین‌ها چاپرونین نامیده می‌شوند. این اجتماعات ماکرومولکولی استوانه‌ای شکل، از دو حلقه اولیگومری تشکیل شده و می‌توانند به صورت سفت (حالت متصل به پپتید) و شل (حالت جدا از پپتید) باشند. چاپرونین یوکاریوتی TriC در هر حلقه دارای هشت زیر واحد است. در چاپرونین‌های باکتریایی، میتوکندریایی و کلروپلاستی که به نام

1- Substrate-binding domain

2- Nucleotide-binding domain

GroEL شناخته می‌شوند، هر حلقه حاوی هفت زیر واحد یکسان است (شکل a ۱۷ـ۳). مکانیسم تا خوردن به وسیله GroEL بهتر از تا خوردن به وسیله Tric شناخته شده و به عنوان یک مدل کلی است (شکل b ۱۷ـ۳). پلی‌پپتیدهای نسبتاً تا خورده یا به‌طور نامناسب تا خورده، به داخل حفره شبیه به بشکه در GroEL وارد و در آنجا به دیواره داخلی متصل شده و به ساختمان فضایی طبیعی خود تا می‌خورند. در مرحله وابسته به ATP، GroEL دچار تغییر ساختمان فضایی شده و پروتئین تا خورده را آزاد می‌نماید، این فرآیند به کمک یک کوچاپرونین یا همان GroES انجام می‌پذیرد. GroES دو انتهای GroEL را می‌پوشاند. اتصال ATP و کوچاپرونین GroES به یکی از حلقه‌های GroEL که در حالت سفت است، باعث می‌شود حفره آن به اندازه دو برابر منبسط شده و تعادل به طرف حالت شل که در این حالت تا خوردن پپتید صورت می‌گیرد، جابه‌جا شود. شباهت چشم‌گیری بین طرح بشکه درپوش‌دار GroEL/GroES (در این حالت پروتئین‌ها جهت تا خوردن جدا می‌شوند) و ساختار پروتئوزوم ۲۶S وجود دارد. پروتئوزوم ۲۶S در تخریب پروتئین شرکت می‌کند. (در قسمت ۳.۴ توضیح داده شده است).

پروتئین‌های تا خورده جایگزین، در بیماری‌ها دیده می‌شوند

همان‌طوری که قبلاً بحث شد، هر پروتئین به‌طور طبیعی به یک ساختمان فضایی مساعد از لحاظ انرژی تا می‌خورد. این ساختمان فضایی به وسیله توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین تعیین می‌شود. با این حال، شواهد اخیر نشان می‌دهد، ممکن است پروتئین به دلیل جهش‌ها یا تغییرات کووالان نامناسب که بعد از سنتز پروتئین رخ می‌دهد و یا دلایلی که تا به حال شناخته نشده‌اند به یک ساختار سه‌بعدی جایگزین تا بخورد. چنین تا خوردگی نامناسبی هم باعث از بین رفتن عملکرد طبیعی پروتئین شده و هم منجر به نشاندار شدن پروتئین برای تجزیه پرتئولیزی می‌شود. هنگامی که تجزیه پروتئین به‌طور کامل انجام نگیرد و یا همگام با تا خوردگی نامناسب نباشد، باعث انباشته شدن پروتئین‌های تا خورده نامناسب یا قطعات حاصل از تجزیه آنها شده و در نتیجه باعث ایجاد بیماری‌های خاصی می‌شود. در این بیماری‌ها پلاک‌های پروتئینی نامحلول در اندام‌هایی هم‌چون کبد و مغز تشکیل می‌شوند.

بعضی از بیماری‌های تحلیل‌برنده اعصاب، هم‌چون بیماری آلزایمر، پارکینسون در انسان و آنسفالوپاتی اسفنجی شکل عفونی (بیماری جنون گاوی) در گاو و گوسفند با تشکیل پلاک‌هایی حاوی رشته‌های به هم پیچیده در مغز تحلیل رفته، مشخص می‌شوند (شکل ۱۸ـ۳). رشته‌های آمیلوئیدی تشکیل‌دهنده این ساختارها از فراوانی پروتئین‌هایی طبیعی همچون پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (که در داخل غشاء پلاسمایی جا می‌گیرد)، تائو[1] (پروتئین متصل‌شونده به میکروتوبول) و پروتئین پریون (پروتئین عفونی) حاصل می‌شوند. تا جائیکه مشخص شده، این پروتئین‌های دارای مارپیچ آلفا یا قطعات حاصل از تجزیه آنها به ساختارهای جایگزین دارای صفحه بتا تا خورده و این ساختارهای ایجاد شده به صورت رشته‌های خیلی پایداری پلیمریزه می‌شوند. با این حال سمی بودن رسوبات خارج سلولی این رشته‌ها یا پروتئین‌های تا خورده جایگزین که محلول می‌باشند برای سلول به خوبی مشخص نشده است.

نکات کلیدی بخش ۳.۲

تا خوردن پروتئین

- توالی پروتئین، ساختار سه‌بعدی آن را تعیین می‌کند و ساختار سه‌بعدی نیز عملکرد پروتئین را تعیین می‌نماید. به‌طور خلاصه، عملکرد از ساختار و ساختار از توالی حاصل می‌شود.
- چون عملکرد پروتئین از ساختار پروتئین حاصل می‌شود، پروتئین تازه سنتز شده برای عملکرد مناسب، بایستی به شکل صحیح خود تا بخورد.
- ساختار صفحه‌ای پیوند پپتیدی، ساختمان‌های فضایی ممکن برای یک پلی‌پپتید را محدود می‌کند.
- توالی اسید آمینه‌ای پروتئین، تا خوردن آن را به صورت ساختار سه‌بعدی خاص آن پروتئین (حالت طبیعی) دیکته می‌کند. اگر پروتئین‌ها تحت شرایطی قرار گیرند که میانکنش‌های غیرکووالان دخیل در پایداری ساختار سه‌بعدی‌شان از بین برود، ساختار پروتئین‌ها باز خواهد شد.
- تا خوردن پروتئین‌ها در داخل بدن موجودات زنده به کمک چاپرون‌ها انجام می‌گیرد. چاپرون‌ها به پروتئین تازه سنتز شده و در حال خروج از ریبوزوم متصل شده و از تاخوردگی نامناسب آنها جلوگیری می‌کنند.
- بعضی بیماری‌های تحلیل‌برنده اعصاب، با تجمع یافتن نامناسب پروتئین‌هایی که به صورت پایدار به ساختمان فضایی جایگزین تا خورده‌اند، ایجاد می‌شوند.

1- Tau

۳-۲ عملکرد پروتئین

پروتئین‌ها شکل‌ها و اندازه‌های بسیار متفاوت داشته و فعالیت‌های فوق‌العاده متنوعی هم در داخل و هم در بیرون سلول دارند اما اغلب این عملکردهای متفاوت را براساس اتصال به خود یا سایر ماکرومولکول‌ها و یا مولکول‌های کوچک و یون‌ها انجام می‌دهند. در اینجا ما بعضی از جنبه‌های کلیدی که اتصال پروتئین را به مواد دیگر تحت تأثیر قرار می‌دهند، توضیح خواهیم داد و سپس یک گروه از پروتئین‌ها یا همان آنزیم‌ها را با جزئیات بیشتر بررسی خواهیم کرد. فعالیت سایر گروههای عملکردی پروتئین‌ها (ساختاری، داربستی، انتقالی، تنظیمی و حرکتی) را در فصل‌های دیگر توضیح خواهیم داد.

اتصال اختصاصی لیگاندها، عملکرد اغلب پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد

مولکولی که به پروتئین متصل می‌شود، اغلب **لیگاند**[1] نامیده می‌شود. در بعضی موارد اتصال لیگاند باعث تغییر شکل پروتئین می‌شود. تغییرات ساختمان فضایی حاصل از اتصال لیگاند، برای مکانیسم عمل اغلب پروتئین‌ها اساسی بوده و در تنظیم فعالیت پروتئینی مهم است.

دو خصوصیت پروتئین چگونگی اتصال آن را به لیگاند مشخص می‌کند، **ویژگی**، که به توانایی پروتئین برای اتصال به یک مولکول در مقایسه با مولکول‌های دیگر، مربوط می‌شود. **تمایل**[2]، با محکمی اتصال یا قدرت آن ارتباط داشته و معمولاً با ثابت تجزیه (K_d) بیان می‌شود. K_d برای کمپلکس پروتئین ـ لیگاند (K_d عکس ثابت تعادل K_{eq} در واکنش اتصال می‌باشد) مقیاس کمی معمول جهت اندازه‌گیری مقدار تمایل است (فصل ۲). هر اندازه میانکنش بین پروتئین و لیگاند قوی‌تر باشد، مقدار K_d کم‌تر است. هم ویژگی و هم تمایل یک پروتئین به لیگاند، به ساختار جایگاه متصل‌شونده به لیگاند بستگی دارد. برای ایجاد میانکنش‌هایی با ویژگی و تمایل خیلی بالا، بایستی شکل و خصوصیات شیمیایی جایگاه اتصال، مکمل مولکولی لیگاند باشد. این خصوصیت را **مکمل شدن مولکولی** می‌نامند. همان‌طوری که در فصل ۲ دیدیم، مکمل شدن مولکولی به مولکول‌ها امکان می‌دهد در محدوده کوچک چندین میانکنش غیرکووالان تشکیل داده و به هم متصل شوند.

یکی از مثال‌هایی که درباره اتصال پروتئین ـ لیگاند به خوبی مطالعه شده است، اتصال آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. این اتصال پروتئین ـ لیگاند دارای تمایل بسیار بالا و ویژگی استثنایی است. آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی هستند که در خون وجود دارند و به وسیله سیستم ایمنی و در پاسخ به تهاجم آنتی‌ژن‌ها (معمولاً ماکرومولکول‌های موجود در عوامل عفونی باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌باشند) و یا مواد خارجی دیگر (همچون پروتئین‌ها یا پلی‌ساکاریدها در گروه) ساخته می‌شوند. آنتی‌بادی‌های مختلفی در پاسخ به آنتی‌ژن‌های مختلف ساخته می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها خصوصیت قابل توجهی در اتصال اختصاصی (شناسایی) به قسمتی از آنتی‌ژن دارند، این قسمت از آنتی‌ژن **اپی‌توپ**[3] نامیده شده و فقط باعث القاء تولید آنتی‌بادی می‌گردد. آنتی‌بادی‌ها به عنوان حسگرهای ویژه برای آنتی‌ژن عمل نموده و کمپلکس‌های آنتی‌بادی ـ آنتی‌ژن را می‌سازند. این کمپلکس‌ها آبشاری از واکنش‌های حفاظتی را در سلول‌های سیستم ایمنی شروع می‌کنند.

همه آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌هایی به شکل حرف Y بوده و از دو زنجیره سنگین یکسان و دو زنجیره سبک یکسان تشکیل می‌شوند (شکل a ۱۹-۳). هر بازو از مولکول آنتی‌بادی حاوی یک زنجیره سبک است که با پیوند دی‌سولفیدی به زنجیره سنگین متصل می‌شود. در نزدیکی انتهای هر بازو، شش حلقه (لوپ) کاملاً متغیر به نام نواحی تعیین‌کننده شکل مکمل (CDRs)[4] وجود داشته و جایگاه اتصال به آنتی‌ژن را تشکیل می‌دهند. توالی‌های این شش حلقه، در بین آنتی‌بادی‌ها کاملاً متغیر بوده و جایگاه‌های اتصال به لیگاند با مکمل‌شدگی بی‌نظیری را می‌سازند. این جایگاه‌ها، باعث اختصاصی شدن آنتی‌بادی‌ها به اپی‌توپ‌های مختلف می‌شوند (شکل b ۱۹-۳).

تماس مناسب بین جایگاه اتصال به لیگاند و آنتی‌ژن (به وسیله شماری از میانکنش‌های غیرکووالان پایدار می‌شود) مسئول ویژگی اتصال بسیار دقیق آنتی‌بادی است.

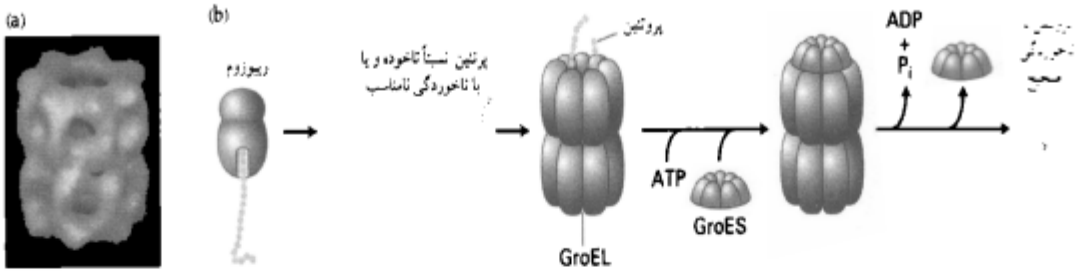
ویژگی آنتی‌بادی‌ها به اندازه‌ای دقیق است که آنها می‌توانند سلول‌های مختلف را شناسایی نمایند. حتی در بعضی موارد آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی را که فقط در یک اسیدآمینه با هم تفاوت دارند می‌توانند شناسایی کنند. به دلیل ویژگی و آسان بودن تولید آنتی‌بادی‌ها، آنها ترکیبات مفیدی هستند و در اغلب آزمایشات توضیح داده شده در فصل‌های بعد از آنها استفاده می‌شود.

ما موارد بسیاری از اتصال پروتئین ـ لیگاند، همچون اتصال هورمون به گیرنده (فصل ۱۵)، اتصال مولکول‌های تنظیمی به

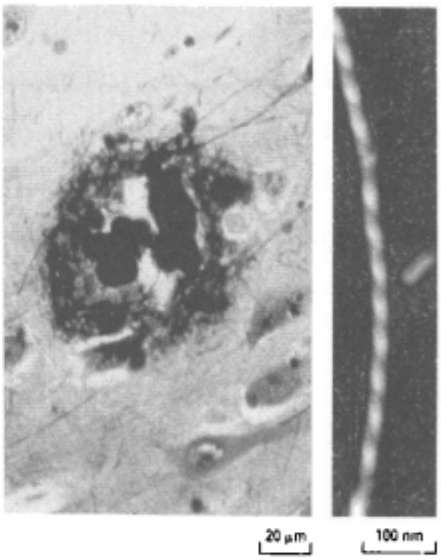
1- Ligand 2- Affinity

3- Epitope

4- Complementarity-determining regions



▲ **شکل ۳-۱۷ تا خوردن پروتئین به واسطه چاپرونین.** تا خوردن صحیح بعضی پروتئین‌ها به چاپرونین‌هایی هم‌چون GroEL پروکاریوتی وابسته است. a) GroEL کمپلکسی به شکل بشکه و توخالی بوده و از ۱۴ زیر واحد یکسان با وزن مولکولی ۶۰/۰۰۰ تشکیل شده‌اند. این ۱۴ زیر واحد در دو حلقه متصل به هم آرایش می‌یابند. b) در غیاب ATP یا حضور ADP، GroEL در حالت کنفورماسیونی «سفت» است و به پروتئین‌های نسبتاً تا خورده یا به‌طور نامناسب تا خورده متصل می‌شود. اتصال ATP، GroEL را طوری جابه‌جا می‌کند که بیشتر باز شود (حالت شل)، در این حالت پروتئین تا خورده رها می‌شود. طی این فرآیند، یک انتهای GroEL به‌طور موقت با کوچاپرونین GroES مسدود می‌شود. GroES از تجمع زیر واحدهایی با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ تشکیل می‌شود.



▲ **شکل ۳-۱۸ بیماری آلزایمر با تشکیل پلاک‌های نامحلول حاوی پروتئین آمیلوئید، مشخص می‌شود.** a) با قدرت تفکیک پایین، یک پلاک آمیلوئید در مغز بیمار آلزایمری به صورت رشته‌های به هم پیچیده دیده می‌شود. b) ساختار منظم رشته‌هایی از پلاک که با میکروسکوپ نیروی اتمی[1] تهیه شده است. پروتئولیز پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید باعث ایجاد قطعه‌ای کوتاه به نام پروتئین β - آمیلوئید می‌شود. دلایل تغییر از ساختمان فضایی مارپیچ α به صفحه β مشخص نیست. این ساختار جایگزین به صورت رشته‌های (آمیلوئید) شدیداً پایدار تجمع یافته و در پلاک‌ها دیده می‌شوند. تغییر آسیب‌شناختی مشابه در پروتئین‌های دیگر باعث بیماری‌های تحلیل‌برنده دیگری می‌شود.

DNA (فصل ۷) اتصال مولکول‌های چسبنده سلولی به ماتریکس خارج سلولی (فصل ۱۹) را در این کتاب خواهیم دید. در اینجا به چگونگی اتصال یک کلاس از پروتئین‌ها (آنزیم‌ها) به لیگاندهایشان می‌پردازیم. آنزیم‌ها واکنش‌های شیمیایی ضروری برای حیات و عملکرد سلول‌ها را کاتالیز می‌کنند.

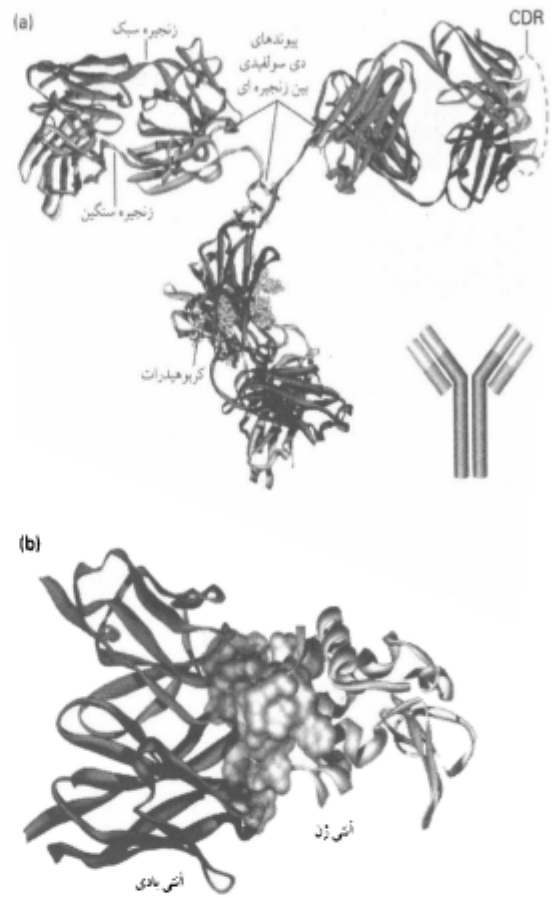
آنزیم‌ها کاتالیزورهایی مؤثر و ویژه هستند

پروتئین‌های کاتالیزکننده واکنش‌های شیمیایی، **آنزیم** نامیده می‌شوند. آنها پیوندهای کووالان را شکسته و ایجاد می‌کنند. لیگاندهای آنزیم‌ها، سوبسترا نامیده می‌شوند. با اینکه همه پروتئین‌ها آنزیم نیستند، اما آنزیم‌ها کلاس بزرگ و خیلی مهمی از پروتئین‌ها هستند. در حقیقت تقریباً هر واکنش شیمیایی در سلول به وسیله آنزیم ویژه‌ای، کاتالیز می‌شود. در اغلب مسیرها، آنزیم‌ها شیمیدان‌های سلولی بوده و اغلب واکنش‌های شیمیایی سلول را انجام می‌دهند. (شکل دیگر ماکرومولکول‌های کاتالیزی در سلول‌ها، از RNA ساخته می‌شود. این RNAها را **ریبوزیم**[2] می‌نامند).

هزاران نوع آنزیم مختلف شناسایی شده‌اند. هر کدام از این آنزیم‌ها یک واکنش یا یک سری واکنش مرتبط به هم را کاتالیز

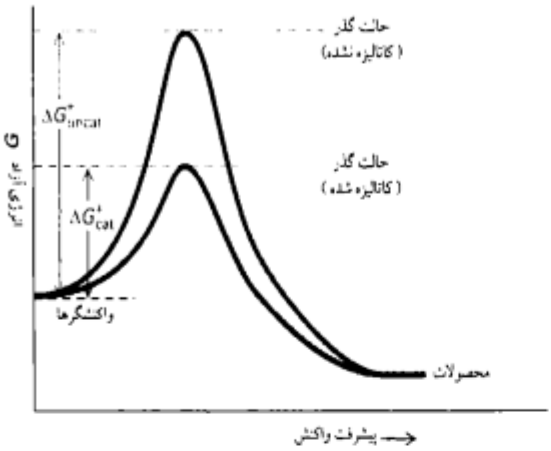
1- Atomic force microscope

2- Ribozyme



▲ **شکل ۱۹ـ۳ (شکل رنگی) اتصال پروتئین ـ لیگاند آنتی‌بادی‌ها.** a) مدل نواری آنتی‌بادی. هر مولکول آنتی‌بادی از ایمونوگلوبولین کلاس IgG حاوی دو زنجیره سنگین یکسان (قرمز تیره و روشن) و دو زنجیره سبک یکسان (آبی) بوده و با پیوندهای کووالان دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. عکس حاشیه‌ای دیاگرامی از ساختار کلی آنتی‌بادی با دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک را نشان می‌دهد. b) تناسب دست و دستکش بین آنتی‌بادی و جایگاهی که به روی آن در آنتی‌ژن هدف (اپی‌توپ) متصل می‌شود (در این‌جا آنتی‌ژن هدف لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ است). نواحی تماس بین دو مولکول به صورت سطح نشان داده شده است. آنتی‌بادی با تمامی ریشه‌هایش در نواحی تعیین‌کننده شکل مکمل به آنتی‌ژن متصل می‌شود. در این نما، مکمل شدن مولکولی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مشخص است. در اینجا انگشت‌ها از سطح آنتی‌ژن بیرون زده‌اند و در مقابل آنها شکاف‌هایی در سطح آنتی‌بادی قرار می‌گیرند.

می‌کنند. بعضی از آنزیم‌ها در اغلب سلول‌ها یافت می‌شوند زیرا سنتز محصولات رایج سلولی (هم‌چون، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها) را کاتالیز نموده و یا در تولید انرژی (مثلاً با تبدیل گلوکز و اکسیژن به دی‌اکسیدکربن و آب) شرکت می‌کنند. سایر آنزیم‌ها فقط

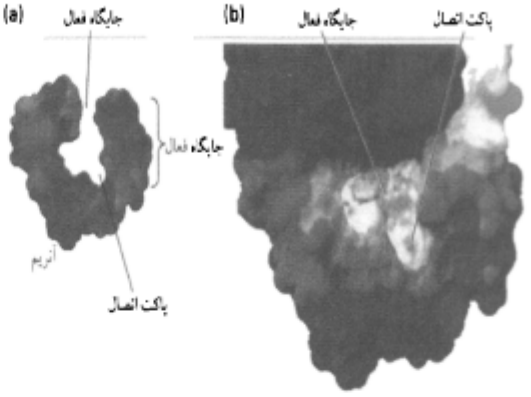


▲ **شکل ۲۰ـ۳ تأثیر آنزیم بر روی انرژی فعالسازی واکنش شیمیایی.** این مسیر واکنش فرضی، تغییرات انرژی آزاد را با پیشرفت واکنش نشان می‌دهد. یک واکنش فقط زمانی به‌طور خودبه‌خود انجام می‌شود که G کلی محصولات کم‌تر از واکنشگرها باشد (ΔG منفی). همه واکنش‌های شیمیایی طی عبور از یک یا چند حالت گذار با انرژی بالا، انجام می‌شوند. سرعت واکنش رابطه معکوس با انرژی فعال‌سازی ($\Delta G^{\neq}$) دارد. انرژی فعال‌سازی اختلاف انرژی آزاد بین حالت گذار (بالاترین نقطه در طول مسیر واکنش) و واکنشگرها است. آنزیم‌ها و سایر کاتالیزورها، سرعت واکنش را با کاهش انرژی آزاد حالت گذار افزایش داده و بنابراین $\Delta G^{\neq}$ را کاهش می‌دهند.

در یک نوع سلول خاص وجود دارند، زیرا واکنش شیمیایی مربوط به آن نوع سلول را کاتالیز می‌کنند (مثلاً آنزیم‌های موجود در سلول‌های عصبی که تیروزین را به یک میانجی عصبی یعنی دوپامین تبدیل می‌کنند).

اغلب آنزیم‌ها درون سلولی هستند اما بعضی از آنها به جایگاه‌های برون سلولی هم‌چون خون، لوله گوارش یا حتی بیرون از بدن موجود زنده (مثل آنزیم‌های سمی موجود در زهر مارهای سمی) ترشح شده و در آن‌جا عمل می‌کنند.

آنزیم‌ها مثل کاتالیزورها سرعت واکنش را افزایش می‌دهند، اما تأثیری بر تعادل واکنش ندارند و هم‌چنین در طی واکنش، خود دچار تغییر نمی‌شوند. تعادل واکنش به وسیله تغییر انرژی آزاد (ΔG) بین واکنشگرها و محصولات تعیین می‌شود (فصل ۲). آنزیم‌ها با کاهش **انرژی حالت گذار** و در پی آن **انرژی فعالسازی**، سرعت واکنش‌ها را افزایش می‌دهند (شکل ۲۰ـ۳).



▲ **شکل ۲۱ـ۳ جایگاه فعال آنزیم تریپسین.** a) جایگاه فعال آنزیم از یک پاکت اتصال (که به‌طور اختصاصی به سوبسترا متصل می‌شود) و یک جایگاه کاتالیزی (این جایگاه کاتالیز را انجام می‌دهد)، تشکیل شده است. b) نمایش سطح از تریپسین (یک سرین پروتئاز). شکاف جایگاه فعال حاوی جایگاه کاتالیزی (زنجیره‌های جانبی سه‌تایی کاتالیزی Ser-195، Asp-102 و His-57 به صورت فرورفتگی‌هایی نشان داده شده است) و زنجیره جانبی پاکت اتصال اختصاصی به سوبسترا، به وضوح دیده می‌شوند.

کاتالیزورهایی همچون کارکوآل[1] و پلاتینیوم[2] واکنش‌ها را در لوله آزمایش تسهیل می‌کنند، اما معمولاً عمل خویش را در دما یا فشار بالا، pHهای بالا یا پایین و یا در حلال‌های آلی انجام می‌دهند. در مقابل آنها کاتالیزورهای پروتئینی سلول‌ها یا همان آنزیم‌ها بایستی به‌طور مؤثر در محیط آبی با دمای ۳۷°C و فشار ۱ اتمسفر و در مقادیر pH فیزیولوژیک، معمولاً ۶/۵ـ۷/۵ (در بعضی موارد در pH پایین‌تر) عمل نمایند. آنزیم‌ها قدرت کاتالیزی فوق‌العاده‌ای دارند به‌طوری که سرعت واکنش‌ها را از 10^6 تا 10^{12} بار نسبت به واکنش کاتالیز نشده در همان شرایط، شتاب می‌دهند.

جایگاه فعال آنزیم به سوبستراها متصل شده و کاتالیز را انجام می‌دهد

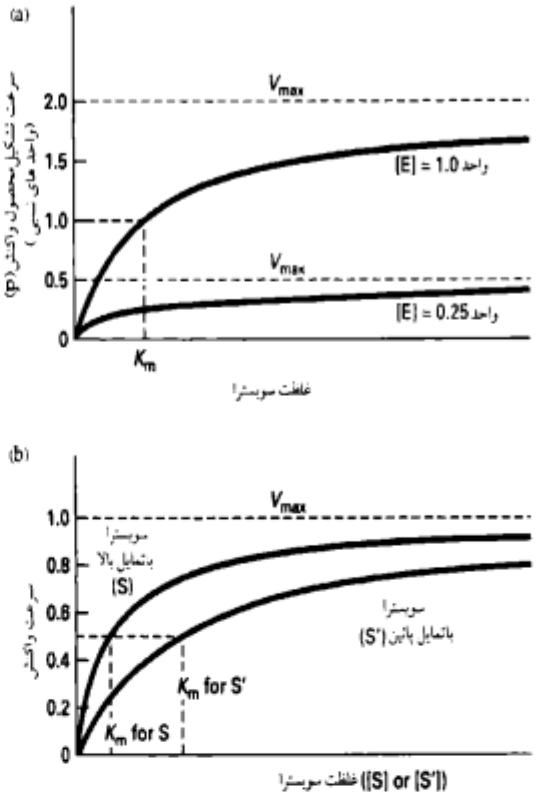
بعضی از اسیدهای آمینه آنزیم نقش مهمی در تعیین ویژگی و قدرت کاتالیزی آن دارند. در ساختمان فضایی طبیعی آنزیم، زنجیره جانبی این اسیدهای آمینه (معمولاً در قسمت‌های مختلف توالی خطی پلی‌پپتیدها قرار می‌گیرند) در نزدیکی هم قرار گرفته و شکافی را در سطح آنزیم ایجاد می‌کنند. به این شکاف **جایگاه فعال**[3] گفته می‌شود (شکل ۲۱ـ۳). اغلب جایگاه‌های فعال با اینکه در تا خوردن پروتئین نقش داشته، قابل تنظیم بوده و همچنین با مولکول‌های دیگر میانکنش می‌دهند با این‌حال کسر کوچکی از کل پروتئین را تشکیل می‌دهند.

جایگاه‌های فعال دارای دو ناحیه عملکردی مهم هستند: **جایگاه اتصال به سوبسترا**[4]، این جایگاه سوبسترا (یا سوبستراها) را شناخته و به آن متصل می‌شود. **جایگاه کاتالیزی**[5] که در آن گروه‌های کاتالیزی (زنجیره‌های اسیدآمینه‌ای و گروه‌های کربونیل و آمینوی اسکلت زنجیره پلی‌پپتیدی) روی سوبسترای متصل شده، واکنش شیمیایی را انجام می‌دهند. در بعضی آنزیم‌ها، جایگاه کاتالیزی و جایگاه اتصال به سوبسترا با هم همپوشانی دارند اما در بعضی دیگر این دو جایگاه به دلیل عملکرد مختلف‌شان در دو ناحیه مختلف در ساختار آنزیم قرار می‌گیرند.

جایگاه اتصال به سوبسترا مسئول ویژگی منحصر به فرد آنزیم‌ها است (آنزیم‌ها قادرند به‌طور انتخابی بر روی یک سوبسترا یا چند سوبسترای مشابه از لحاظ شیمیایی عمل نمایند). تغییر در ساختار سوبسترای آنزیم در یک یا چند اتم و یا تغییری کوچک در ساختار (مثلاً استرئوشیمی) سوبسترا، می‌تواند باعث ایجاد مولکولی شود که دیگر آنزیم نمی‌تواند آن را بپذیرد. همان‌طوری که قبلاً ذکر گردید، این ویژگی آنزیم به دلیل مکمل شدن مولکولی دقیق بین جایگاه اتصال به سوبسترای آنزیم و سوبسترا ایجاد می‌شود. مکمل شدن مولکولی به وسیله چندین میانکنش غیرکووالان ضعیف انجام گرفته و به شکل سوبستراها بسیار حساس است.

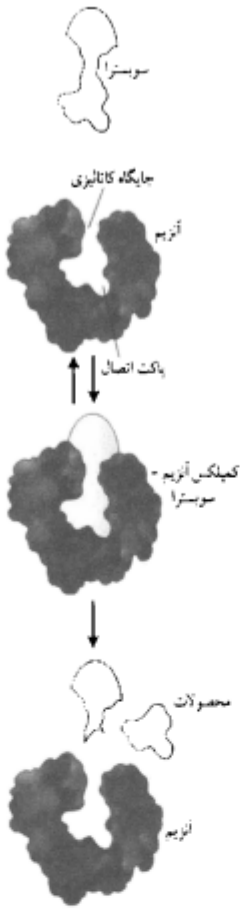
نظریه‌ای که بیان می‌کرد آنزیم‌ها ممکن است شبیه اتصال قفل و کلید به سوبستراهایشان متصل شوند، اولین بار در سال ۱۸۹۴ توسط امیل فیشر[6] مطرح شد. در سال ۱۹۱۳ لئونور میکائیلیس[7] و مائود لئونورا منتن[8] مدارک مهمی را در حمایت از این نظریه فراهم نمودند. آنها نشان دادند که سرعت آنزیم در غلظت‌های پایین سوبسترا با غلظت سوبسترا متناسب است اما در غلظت‌های زیاد سوبسترا، سرعت به **سرعت حداکثر** (V_{max}) رسیده و مستقل از غلظت سوبسترا می‌شود. در این حالت مقدار V_{max} به‌طور مستقیم با مقدار آنزیم موجود در مخلوط واکنش متناسب است (شکل ۲۲ـ۳).

1- Charcoal
2- Platinum
3- Active site
4- Substrate-binding sile
5- Catalytic site
6- Emil fischer
7- Leonor Michaelis
8- Moud Leonora Menten



▲ **شکل ۲۲ـ۳ K_m و V_m برای یک واکنش کاتالیز شده با آنزیم.** K_m و V_m از آنالیز وابستگی سرعت واکنش اولیه به غلظت سوبسترا تعیین می‌شوند. شکل این نمودارهای فرضی سینتیکی، مشخصه یک واکنش ساده کاتالیز شده با آنزیم بوده و در آن یک سوبسترا (S) به محصول (P) تبدیل می‌شود. سرعت اولیه به محض اضافه نمودن آنزیم به سوبسترا و قبل از تغییر چشم‌گیر غلظت سوبسترا، اندازه‌گیری می‌شود. a) نمودار سرعت اولیه در دو غلظت متفاوت آنزیم در مقابل غلظت سوبسترا [S]. غلظتی از [S] که در آن نصف سرعت حداکثر واکنش حاصل می‌شود، ثابت میکائیلیس (K_m) بوده و مقدار تمایل آنزیم در تبدیل S به P را نشان می‌دهد. با چهار برابر نمودن غلظت آنزیم [E]، سرعت واکنش چهار برابر می‌شود و در نتیجه V_{Max} (سرعت حداکثر) نیز چهار برابر می‌گردد. اما K_m تغییری نمی‌کند. b) نمودار سرعت اولیه علیه غلظت سوبسترا، S′ سوبسترایی است که آنزیم تمایل زیادی به آن دارد و S سوبسترایی است که آنزیم، به آن تمایل کمی دارد. توجه نمایید، به دلیل یکسان بودن غلظت آنزیم V_{Max} برای هر دو سوبسترا یکسان است، اما K_m برای S′ بالاتر (سوبسترای با تمایل کم) است.

میکائیلیس و منتن از اشباع شدن در غلظت‌های بالای سوبسترا به این نتیجه رسیدند که مولکول‌های سوبسترا به تعدادی جایگاه محدود و ثابت بر روی آنزیم (E) متصل شده، کمپلکس آنزیم ـ

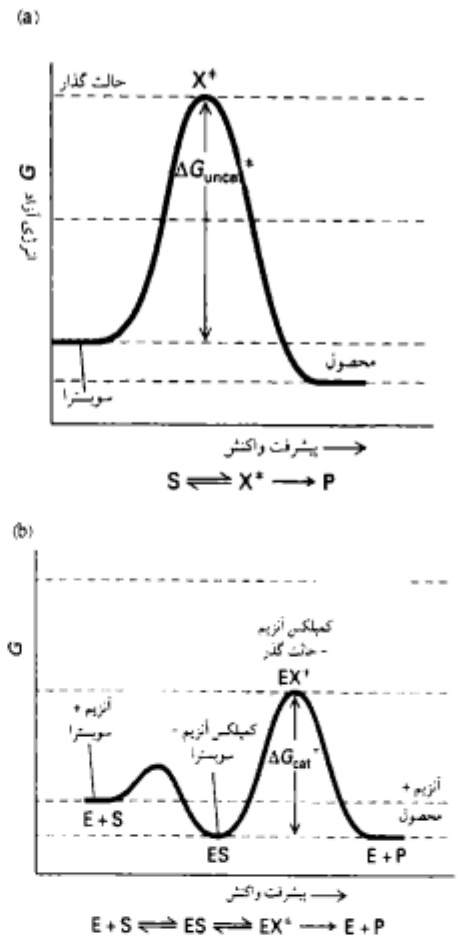


▲ **شکل ۲۳ـ۳ مدل شماتیک از مکانیسم واکنش یک آنزیم.** سینتیک آنزیم می‌گوید، آنزیم‌ها (E) از طریق جایگاه‌های ثابت و محدودی (جایگاه فعال) که دارند به مولکول سوبسترا (S) متصل می‌شوند. آنزیم‌های متصل شده به صورت کمپلکس آنزیم ـ سوبسترا (ES) هستند. کمپلکس ES با آنزیم متصل نشده و سوبسترا در تعادل بوده و مرحله حد واسط در تبدیل سوبستراها به محصولات (P) می‌باشد.

سوبسترا را ایجاد می‌کنند. آنها پیشنهاد کردند کمپلکس ES با آنزیم متصل نشده و سوبسترا در حال تعادل بوده و مرحله حد واسط در تبدیل برگشت‌ناپذیر سوبسترا به محصول (P) می‌باشد (شکل ۲۳ـ۳).

$$E + S \leftrightharpoons ES \rightarrow E + P$$

رابطه بین سرعت V_0 تشکیل محصول در غلظت خاص سوبسترا [S] به وسیله معادله‌ای بیان می‌شود که امروزه **معادله میکائیلیس ـ منتن** نامیده می‌شود:



▲ **شکل ۲۴ـ۳ نمودار انرژی آزاد واکنش کاتالیز نشده و واکنش چند مرحله‌ای کاتالیز آنزیم.** a) نمودار انرژی آزاد واکنش برای واکنش ساده کاتالیز نشده. در این واکنش (S) با عبور از یک مرحله گذار با انرژی بالا به (P) تبدیل می‌شود. b) اغلب آنزیم‌ها چنین واکنشی را با تقسیم آن به چند مرحله جداگانه انجام می‌دهند. در این مورد اول، کمپلکس ES تشکیل شده و در پی آن به حالت گذار ($EX^{\neq}$) و در نهایت به (E) و P تبدیل می‌شود. انرژی فعالسازی هر کدام از این مراحل به‌طور چشم‌گیری پایین‌تر از واکنش کاتالیز نشده است. بنابراین آنزیم به مقدار قابل توجهی سرعت واکنش را افزایش می‌دهد.

$$V_0 = V_{max} \times \frac{[S]}{[S] + K_m} \qquad (۳\text{ـ}۱)$$

در این‌جا K_m، **ثابت میکائیلیس**[1] بوده و اندازه تمایل آنزیم به سوبسترایش را نشان می‌دهد. K_m غلظتی از سوبسترا است که در آن، نصف سرعت حداکثر (یا ۱/۲ V_{max}) حاصل می‌شود، پس مشابه ثابت تجزیه K_d (فصل ۲) می‌باشد. هر اندازه مقدار K_m کوچک‌تر باشد، آنزیم به‌طور مشخص، در محلول‌های رقیق از سوبسترا، محصول تولید نموده و در غلظت کمتری از سوبسترا به نصف سرعت حداکثر می‌رسد. غلظت‌های مولکول‌های کوچک مختلف در یک سلول به‌طور گسترده‌ای تغییر می‌کند و به همین ترتیب مقدار آنزیم‌های متفاوتی که بر روی آنها عمل می‌نمایند نیز تغییر می‌نمایند. معمولاً غلظت درون سلولی سوبسترا تقریباً مساوی و یا کمی بیش از مقدار K_m آنزیمی است که به آن متصل می‌شود.

سرعت‌های واکنش در غلظت اشباع سوبسترا به‌طور چشم‌گیری در بین آنزیم‌ها تغییر می‌کند. حداکثر مقدار مولکول‌های سوبسترایی که در هر ثانیه توسط یک جایگاه فعال آنزیم به محصول تبدیل می‌شود، عدد تبدیل[2] نامیده می‌شود. عدد تبدیل برای آنزیم‌های خیلی کند می‌تواند کم‌تر از ۱ باشد. عدد تبدیل آنزیم کربنیک انیداز (یکی از سریع‌ترین آنزیم‌ها) ۶×۱۰^{۵} مولکول بر ثانیه است.

اکثر آنزیم‌ها تبدیل سوبستراها به محصولات را با تقسیم این فرآیند به چند واکنش شیمیایی متفاوت، کاتالیز می‌کنند. این واکنش‌های شیمیایی شامل چندین کمپلکس آنزیم - سوبسترای جداگانه (ES، ES′، ES″ و غیره) بوده و قبل از آزاد شدن محصول، تشکیل می‌شوند.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES' \rightleftharpoons ES'' \rightleftharpoons \ldots E + P$$

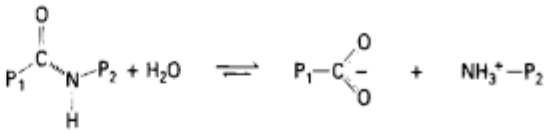
نمودار انرژی برای چنین واکنش‌های چند مرحله‌ای، شامل چند پستی و بلندی است (شکل ۲۴ـ۳) و روش‌هایی جهت به دام انداختن حد واسطها ایجاد شده‌اند. با این روش‌ها می‌توان با جزئیات بیشتری چگونگی کاتالیز آنزیمی و واکنش‌های چندین مرحله‌ای را بررسی کرد.

سرین پروتئازها، چگونگی عمل جایگاه فعال آنزیم را نشان می‌دهند

سرین پروتئازها خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتئولیزی بوده و در سراسر دنیای زنده از جمله هضم غذاها (آنزیم‌های پانکراسی تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز)، کنترل لخته شدن خون (آنزیم ترومبین) و حتی در کمک به پروانه ابریشم در جویدن پیله خویش و رها شدن از آن، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این کلاس از آنزیم‌ها، چگونگی همکاری جایگاه اتصال سوبسترا و جایگاه کاتالیزی که در آن سوبستراها طی واکنش چند مرحله‌ای به

1- Michaelis constant 2- Turnover number

محصولات تبدیل می‌شوند را نشان می‌دهند. در اینجا توضیح خواهیم داد که چگونه تریپسین و پروتئازهای پانکراسی مرتبط با آن یعنی کیموتریپسین و الاستاز، پیوند پپتیدی را می‌برند (تریپسین با کیموتریپسین و الاستاز ارتباط تکاملی دارد).



P_1 بخشی از پروتئین است که در طرف انتهای N پیوند پپتیدی و بخش P_2 در طرف انتهای C قرار می‌گیرد. ما اول شرح می‌دهیم، چگونه سرین پروتئازها به‌طور ویژه به سوبستراهایشان متصل می‌شود و سپس چگونگی انجام کاتالیز آنزیمی را با جزئیات نشان می‌دهیم.

شکل a ۲۵ـ۳ نشان می‌دهد چگونه سوبسترای پلی‌پپتیدی به جایگاه اتصال سوبسترا در جایگاه فعال تریپسین متصل می‌شود. در این اتصال دو میانکنش کلیدی وجود دارد. اول، سوبسترا و آنزیم پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند که شبیه به صفحه β است. دوم زنجیره جانبی کلیدی در سوبسترا است که با قرار گرفتن در **پاکت اتصال ویژه زنجیره جانبی**[1]، تعیین می‌کند کدام پیوند پپتیدی شکسته شود. در ته پاکت اتصال، زنجیره جانبی با بار منفی اسید آسپارتیک ۱۸۹ آنزیم قرار دارد. تریپسین به‌طور چشم‌گیری ترجیح می‌دهد پروتئین‌ها را در طرف کربوکسیل ریشه‌های با زنجیره جانبی بلند با بار مثبت (آرژنین و لیزین) هیدرولیز کند زیرا این زنجیره جانبی با بار منفی اسید آسپارتیک ۱۸۹ موجود در پاکت اتصال میانکش می‌دهد.

اختلاف اندک در ساختار پاکت اتصال درباره تفاوت ویژگی سوبسترایی در سرین پروتئازهای مرتبط دیگر نشان می‌دهد، کیموتریپسین گروه‌های آروماتیک (فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان) و الاستاز زنجیره‌های جانبی کوچک آلانین و گلیسین را ترجیح می‌دهند (شکل b ۲۵ـ۳). سرین ۱۸۹ در کیموتریپسین بدون بار بوده و به زنجیره‌های جانبی آبگریز، بدون بار و بزرگ امکان می‌دهد تا به‌طور پایدار به پاکت متصل شوند. در لبه‌های پاکت اتصال در تریپسین، گلیسین وجود دارد و این در حالی است که در الاستاز در لبه‌های پاکت اتصال، زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک شاخه‌دار والین و ترئونین وجود دارد بنابراین از اتصال الاستاز به سوبستراهایی با زنجیره‌های جانبی بزرگ جلوگیری می‌کنند اما باعث برقراری اتصال پایدار بین الاستاز با زنجیره‌های جانبی کوتاه آلانین و گلیسین می‌شود.

هر سه آنزیم در جایگاه فعالشان از گروه هیدروکسیل زنجیره جانبی سرین ۱۹۵ برای هیدرولیز پیوندهای پپتیدی موجود در سوبسترای پروتئینی، بهره می‌برند. **سه‌تایی**[2] کاتالیزی از زنجیره جانبی سرین ۱۹۵، هیستیدین ۵۷ و اسید آسپارتیک ۱۰۲ تشکیل شده است. سه‌تایی کاتالیزی در دو مرحله واکنش ضروری شرکت می‌کند. شکل ۲۶ـ۳ همکاری سه‌تایی کاتالیزی را در شکستن پیوند پپتیدی نشان می‌دهد. اسید آسپارتیک ۱۰۲ و هیستیدین ۵۷ از حمله اکسیژن گروه هیدروکسیل سرین ۱۹۵ به کربن گروه کربونیل سوبسترا، پشتیبانی می‌کنند. این حمله در اول یک حالت گذار ناپایدار تشکیل می‌دهد. در این حالت گذار، کربن گروه کربونیل سوبسترا به چهار گروه متصل می‌شود. (حد واسط چهار وجهی)، با شکستن پیوند پپتیدی بین C-N، یک قسمت از پروتئین [سوبسترا] (NH_3-P_2) آزاد می‌شود، در حالی‌که قسمت دیگر به وسیله پیوند استری به آنزیم متصل باقی مانده و حد واسطی نسبتاً پایدار (آسیل آنزیم) ایجاد می‌نماید. در مرحله بعد، اکسیژن مولکول آب جانشین اکسیژن پیوند استری می‌شود. در این واکنش حد واسط چهار وجهی ناپایدار دیگری تشکیل می‌شود و در آخر محصول نهایی (P_1-CooH) آزاد می‌گردد.

حد واسطهای چهار وجهی ایجاد شده در کل واکنش از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی با گروه‌های آمینوی اسکلت آنزیم (که **حفره اکسی آنیون** نامیده می‌شوند) مقداری پایدار می‌شوند. خانواده بزرگ سرین پروتئازها و آنزیم‌های مرتبط با جایگاه فعال حاوی سرین نشان می‌دهند که چگونه آنزیم‌های متفاوت برای انجام واکنش‌های مشابه از این مکانیسم واکنش به طور مکرر استفاده می‌کنند.

مکانیسم سرین پروتئاز چندین نکته کلیدی از کاتالیز آنزیمی را خاطرنشان می‌سازد:

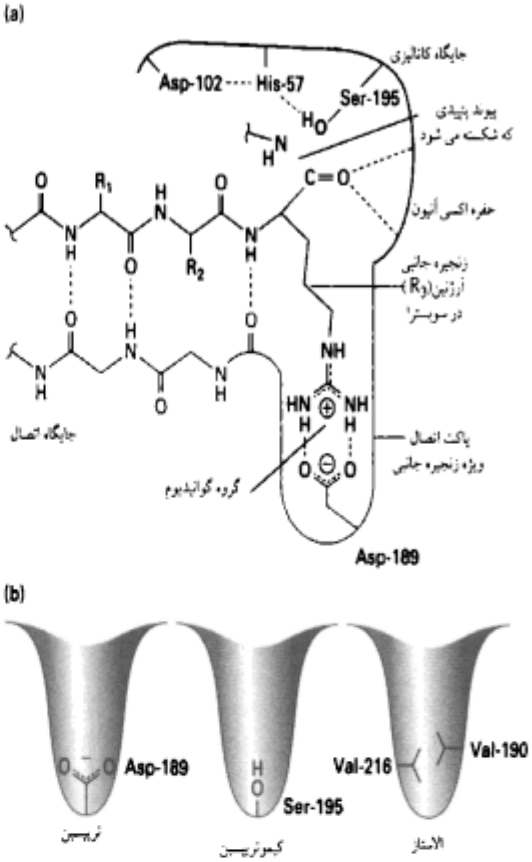
۱) جایگاه‌های فعال آنزیم طوری طراحی می‌شوند تا اتصال حالت گذار را پایدار نمایند، بنابراین انرژی فعال‌سازی را کاهش داده و سرعت کلی را افزایش می‌دهند.

۲) چند زنجیره جانبی از اسکلت پلی‌پپتیدی با همدیگر به‌طور دقیق به صورت سه‌بعدی سازمان یافته و با همدیگر برای تبدیل شیمیایی سوبسترا به محصول همکاری می‌کنند. این تبدیل اغلب از چندین مرحله واکنش تشکیل می‌شود.

۳) کاتالیز اسیدی ـ بازی که به وسیله یک یا چند اسیدآمینه انجام

1- Side-chain-specificity vinding pocket

2- Catalytic triad



▲ **شکل ۲۵ـ۳ اتصال سوبسترا به جایگاه فعال سرین پروتئازها شبیه تریپسین.** a) جایگاه فعال تریپسین به یک مولکول سوبسترا متصل می‌شود. سوبسترا با جایگاه اتصال، صفحه β دو رشته‌ای تشکیل می‌دهد و زنجیره جانبی آرژنین (R_3) در سوبسترا به پاکت اتصال ویژه زنجیره جانبی متصل می‌گردد. بار مثبت گروه گوانیدیوم آرژنین به وسیله بار منفی اسید آسپارتیک ۱۸۹ در آنزیم پایدار می‌شود. این اتصال، پیوند پپتیدی آرژنین را در موقعیت مناسبی قرار می‌دهد تا به وسیله سه‌تایی کاتالیزی جایگاه فعال آنزیم (زنجیره‌های جانبی سرین ۱۹۵، هیستیدین ۵۷ و اسید آسپارتیک ۱۰۲) هیدرولیز شود. b) اسیدهای آمینه موجود در پاکت اتصال ویژه زنجیره جانبی شکل و بار و در نتیجه خصوصیات اتصالی آن را تعیین می‌کنند. تریپسین زنجیره‌های جانبی بار مثبت لیزین و آرژنین را می‌پذیرد. کیموتریپسین زنجیره جانبی بزرگ و آبگریز همچون فنیل آلانین را قبول می‌کند و الاستاز زنجیره‌های جانبی کوچک همچون گلیسین و آلانین را می‌پذیرد.

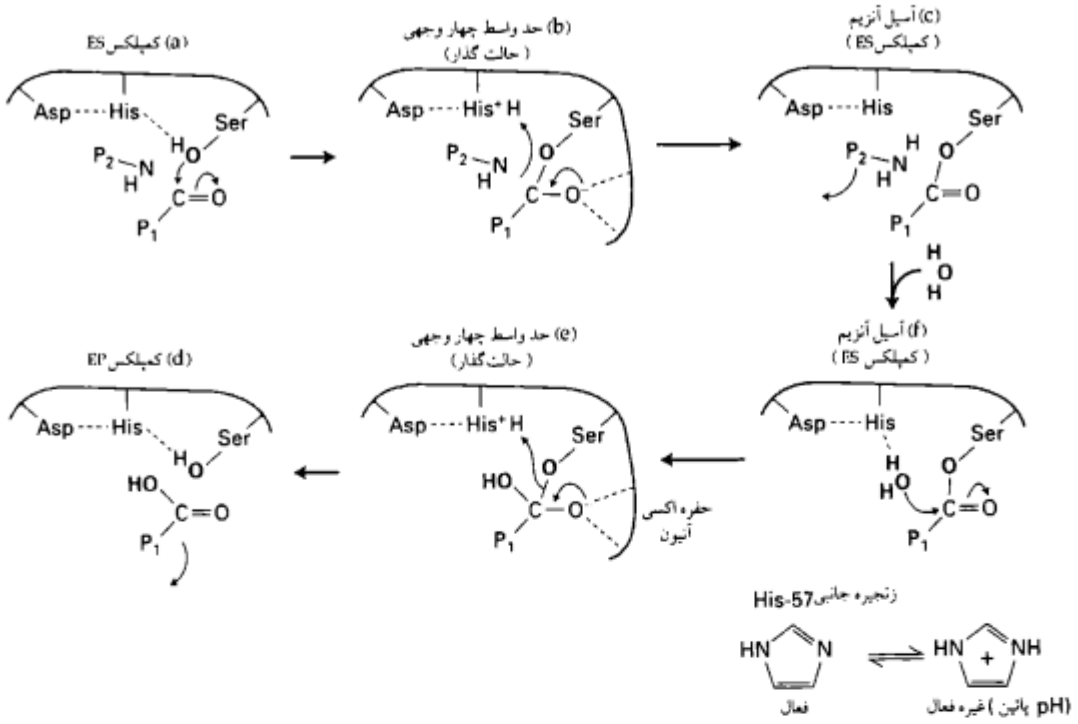
می‌شود، اغلب توسط آنزیم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سرین پروتئاز، گروه ایمیدازول هیستیدین ۵۷ به عنوان باز عمل کرده و هیدروژن را از گروه هیدروکسیل سرین ۱۹۵ بر می‌دارد. در نتیجه اغلب حالت یونیزاسیون خاص (پروتونه شدن یا بی‌پروتونه شدن) زنجیره جانبی یک یا چند اسیدآمینه در جایگاه فعال، متناسب با کاتالیز آنزیمی بوده و بنابراین فعالیت آنزیم وابسته به pH است.

به عنوان مثال گروه ایمیدازول هیستیدین ۵۷ در سرین پروتئازها دارای pKa≈۶/۸ است. این گروه فقط زمانی می‌تواند به هیدروکسیل سرین ۱۹۵ در حمله به سوبسترا کمک نماید که پروتونه نباشد. بنابراین فعالیت پروتئاز در pH پایین‌تر از ۶/۸ کم بوده و شکل نمودار فعالیت در pHهای ۴ تا ۸ با نمودار تیتراسیون زنجیره جانبی هیستیدین ۵۷ به جز در نزدیکی pH=۶/۸ مطابقت داشته و از معادله هندرسون ـ هاسلباخ تبعیت می‌کند. (شکل ۲۷ـ۳، در سمت راست و فصل ۲ را ملاحظه کنید). فعالیت در pHهای بالاتر افت نموده و نموداری به شکل زنگوله ایجاد می‌کند. زیرا تا خوردگی صحیح پروتئین هنگامی که گروه آمینو در انتهای آمینوی پروتئین دپروتونه می‌شود (pKa≈۹)، به هم ریخته و در نتیجه ساختمان فضایی در نزدیکی جایگاه فعال تغییر می‌کند.

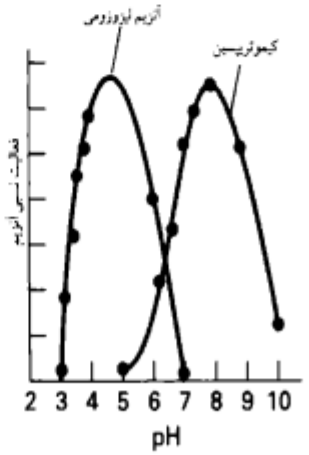
حساسیت فعالیت آنزیم به pH می‌تواند در اثر تغییر یونیزاسیون گروه‌های کاتالیزی، (گروه‌هایی که به صورت مستقیم در اتصال سوبسترا شرکت می‌کنند) یا گروه‌های مؤثر بر ساختمان فضایی پروتئین، باشد. پروتئازهای پانکراسی تکامل یافته‌اند تا در pHهای خنثی یا شرایط نسبتاً بازی (در روده) فعالیت نمایند، بنابراین pH بهینه آنها تقریباً ۸ است. پروتئازها یا آنزیم‌های هیدرولیزی دیگر که در شرایط اسیدی فعالیت می‌کنند بایستی از مکانیسم کاتالیزی دیگری استفاده نمایند. از این آنزیم‌ها می‌توان به آنزیم‌های موجود در معده (pH≈۱) مثل پپسین و یا آنزیم‌های موجود در لیزوزوم‌ها (pH≈۴/۵) اشاره کرد. آنزیم‌های لیزوزومی نقش کلیدی در تجزیه ماکرومولکول‌های سلولی ایفا می‌کنند (به شکل ۲۷ـ۳ سمت چپ را ملاحظه کنید). در واقع، هیدرولازهای لیزوزومی مقدار زیادی مولکول زیستی (پروتئین‌ها، لیپیدها و غیره) را تجزیه می‌کنند. این آنزیم‌ها در pH سیتوزولی (تقریباً ۷) غیرفعال هستند و این خصوصیت باعث می‌شود، در صورت خروج این آنزیم‌ها از لیزوزوم باعث خودهضمی سلول نشوند.

یک مشخصه مهم کاتالیز آنزیمی که در مورد سرین پروتئازها دیده نمی‌شود ولی در اغلب آنزیم‌های دیگر یافت می‌شود، **کوفاکتور**[1] یا **گروه پروستاتیک**[2] (کمک‌کننده) است. این گروه یون یا مولکول کوچک غیرپلی‌پپتیدی (مثلاً، آهن، روی، مس، منگنز) بوده، به جایگاه فعال متصل شده و نقش اساسی در مکانیسم واکنش بازی می‌کند. گروه‌های پروستاتیک آلی کوچک در آنزیم‌ها،

1- Cofactor 2- Prosthetic group



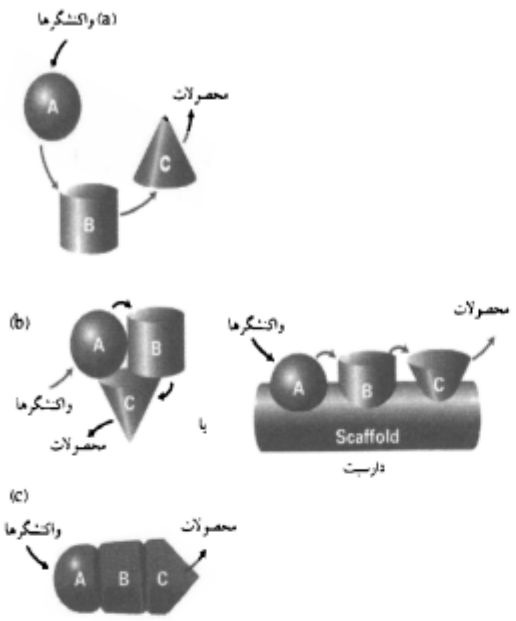
▲ **شکل ۲۶ـ۳ مکانیسم هیدرولیز پیوند پپتیدی به وسیله سرین پروتئاز.** سه‌تایی کاتالیزی، سرین ۱۹۵، هیستیدین ۵۷ و اسید آسپارتیک ۱۰۲ در جایگاه‌های فعال سرین پروتئازها، برای هیدرولیز پیوند پپتیدی در پروتئین هدف از یک مکانیسم چند مرحله‌ای بهره می‌گیرد. a) بعد از اتصال سوبسترای پلی‌پپتیدی به جایگاه فعال، اکسیژن گروه هیدروکسیل سرین ۱۹۵ به کربن کربونیل پیوند پپتیدی در سوبسترای هدف حمله می‌کند. حرکت الکترون‌ها با پیکان نشان داده شده است. b) در نتیجه این حمله، یک حالت گذار تشکیل می‌شود. این حالت گذار، ***حد واسط چهار وجهی*** نامیده شده و دارای بار منفی بر روی اکسیژن سوبسترا بوده و از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با ***حفره اکسی آنیون*** آنزیم، پایدار می‌شود. c) حرکت دیگری در الکترون‌ها باعث شکستن پیوند پپتیدی و آزاد شدن یکی از محصولات واکنش (NH_2-P_2) و تشکیل آسیل آنزیم می‌شود (کمپلکس ES′). d) سپس اکسیژن یک مولکول آب از مولکول‌های حلال به کربن کربونیل آسیل آنزیم حمله می‌کند. e) این حمله باعث ایجاد حد واسط چهار وجهی دوم می‌شود. f) در اینجا حرکت الکترونی دیگری انجام و باعث شکستن پیوند میان سرین ۱۹۵ و سوبسترا (تشکیل کمپلکس EP) و آزاد شدن محصول واکنش نهایی (P_1-CooH) می‌شود. زنجیره جانبی هیستیدین ۵۷، دارای آرایش مناسبی بوده و از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی با زنجیره جانبی اسید آسپارتیک ۱۰۲، دادن و گرفتن پروتون‌ها را طی واکنش کاتالیز، تسهیل می‌کند (ضمیمه). اگر pH به اندازه‌ای پایین باشد که زنجیره جانبی هیستیدین ۵۷ پروتونه شود، هیستیدین دیگر نمی‌تواند در کاتالیز شرکت نماید و آنزیم غیرفعال می‌شود.



▲ **شکل ۲۷ـ۳ وابستگی فعالیت آنزیم به pH.** گروه‌های قابل یونیزه (قابل تیتر با pH) در جایگاه‌های فعال یا در هر کجای آنزیم بایستی به صورت پروتونه یا دپروتونه باشند تا اجازه اتصال صحیح سوبسترا یا کاتالیز را بدهند و یا امکان دهند آنزیم به ساختمان فضایی صحیح خویش تطابق یابد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در pHهای مختلف می‌تواند جهت شناسایی pKa این گروه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. سرین پروتئازهای پانکراس همچون کیموتریپسین (نمودار سمت راست)، حداکثر فعالیت را در اطراف pH=۸ نشان می‌دهند زیرا هیستیدین ۵۷ جایگاه فعال (برای کاتالیز لازم بوده و pKa≈۶/۸ دارد) و انتهای آمینوی پروتئین (برای ساختمان فضایی صحیح آنزیم لازم بوده و pKa≈ ۱۰/۳ دارد) در حالت یونیزاسیون مطلوبی هستند. اغلب هیدرولازهای لیزوزومی طوری تکامل یافته‌اند که pH بهینه پایین‌تری (تقریباً ۴/۵، نمودار سمت چپ) داشته باشند تا با pH پایین موجود در داخل لیزوزوم‌ها تطابق یافته و عمل نمایند.

کوآنزیم[1] نامیده می‌شوند. بعضی از این گروه‌ها در طی واکنش آنزیمی به‌طور شیمیایی تغییر می‌یابند، بنابراین لازم است بعد از هر واکنش این گروه‌ها جایگزین و یا تجدید شوند. بقیه دچار تغییر شیمیایی نمی‌شوند. به عنوان مثالی از کوآنزیم‌هایی که تغییر می‌کنند می‌توان به NAD^+ (نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید) و FAD (فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید) اشاره نمود (شکل ۳۳ـ۲ را ملاحظه کنید)، گروه‌های هِم که در هموگلوبین به اکسیژن متصل شده و یا به عنوان ناقل الکترون در بعضی سیتوکروم‌ها عمل می‌نماید را می‌توان به عنوان مثالی از کوآنزیم‌هایی دانست که طی واکنش آنزیمی تغییری نمی‌یابند (شکل ۱۴ـ۱۲). بنابراین شیمی کاتالیز آنزیمی، محدود به اسیدهای آمینه موجود در زنجیره‌های پلی‌پپتیدی نمی‌شود. اغلب ویتامین‌ها همچون ویتامین‌های B، تیامین[2] (B_1)، ریبوفلاوین[3] (B_2)، نیاسین[4] (B_3)، پیریدوکسین[5] (B_6) و ویتامین C که به وسیله سلول‌های جانوری آلی نمی‌توانند سنتز شوند، یا خود به عنوان کوآنزیم بوده و یا در ساخت کوآنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرند. اضافه نمودن مکمل‌های ویتامینی به محیط مایع رشد سلول‌های جانوری در آزمایشگاه نیز به این دلیل می‌باشد (فصل ۹).

مولکول‌های کوچکی که به جایگاه فعال متصل شده و واکنش را متوقف می‌نمایند، **مهارکننده‌های آنزیمی**[6] نامیده می‌شوند. چنین مهارکننده‌هایی ابزارهای مفیدی برای مطالعه نقش آنزیم‌ها در سلول‌ها و در کل بدن موجود زنده می‌باشد. این مواد با از بین بردن فعالیت آنزیمی، امکان تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از نبود آن آنزیم را می‌دهند. بنابراین مهارکننده‌ها استفاده از جهش‌ها را در مطالعه عملکرد آنزیم در سلول‌ها تکمیل می‌نمایند (فصل ۵ را ملاحظه کنید). با این حال تفسیر نتایج حاصل از مطالعات مهارکننده‌ها پیچیده است زیرا در اغلب موارد مهارکننده‌ها بیش از یک پروتئین را بلوکه می‌کنند. مهار فعالیت پروتئین با مولکول‌های کوچک پایه و اساس اغلب داروها (همچون آسپیرین که آنزیم سیکلواکسیژناز را مهار می‌کند) و مواد موجود در جنگ‌افزارهای شیمیایی است. سارین[7] و گازهای اعصاب دیگر با گروه‌های هیدروکسیل سرین فعال در سرین پروتئازها و یک آنزیم مرتبط (استیل کولین استراز) واکنش می‌دهند. استیل کولین استراز آنزیم کلیدی در تنظیم هدایت عصبی است (فصل ۲۳ را ملاحظه کنید).



▲ **شکل ۲۸ـ۳ تجمع آنزیم‌ها به صورت کمپلکس‌های چند آنزیمی کارآمد.** در مسیرهای واکنش فرضی نشان داده شده در این جا واکنشگرهای اولیه در اثر عملکرد پشت سرهم سه آنزیم (A، B و C) به محصولات نهایی تبدیل می‌شوند. a) هنگامی که آنزیم‌ها در محلول آزاد هستند و یا حتی درون یک ساختار سلولی محدود می‌شوند، حد واسط‌های ایجاد شده در واکنش‌ها، بایستی از یک آنزیم به آنزیم دیگر انتشار یابند. انتشار به‌طور ذاتی یک فرآیند آهسته است. b) هنگامی که آنزیم‌ها به صورت کمپلکس‌های چند زیر واحدی تجمع می‌یابند، انتشار به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. تجمع یافتن آنزیم‌ها به صورت کمپلکس، به وسیله خودشان و یا با کمک یک پروتئین داربستی انجام می‌شود. c) نزدیک‌ترین حالت به هم پیوستگی فعالیت‌های کاتالیزی زمانی رخ می‌دهد که آنزیم‌ها در سطح ژنتیکی با هم ادغام شوند به‌طوری که هر کدام از آنزیم‌ها دمینی از یک زنجیره پلی‌پپتیدی را تشکیل دهند.

آنزیم‌ها در مسیری مشترک اغلب به‌طور فیزیکی با یکدیگر تجمع می‌یابند

آنزیم‌هایی که در یک فرآیند متابولیسمی (هم‌چون تجزیه گلوکز به پیروات) شرکت می‌کنند روی یک ساختار سلولی جای می‌گیرند (مثلاً در سیتوزول، غشاء یا درون اندامک خاص). در درون یک ساختار سلولی، محصولات یک واکنش از طریق انتشار به طرف

1- Coenzyme
2- Thiamine
3- Riboflavin
4- Niacin
5- Pyridoxine
6- Enzyme Inhibitors
7- Sarin

آنزیم بعدی در مسیر متابولیسمی حرکت می‌کنند. با این حال، انتشار شامل حرکات تصادفی است که این حرکات می‌تواند انتشار را کند نموده و بدین ترتیب فرآیند انتقال مولکول‌ها بین آنزیم‌های پراکنده را ناکارآمد سازد (شکل a ۲۸ـ۳). برای غلبه بر این مشکل، در سلول‌ها مکانیسم‌هایی تکامل یافته‌اند تا آنزیم‌های دخیل در یک مسیر را کنار هم قرار دهند.

در ساده‌ترین مکانیسم، چند رشته پلی‌پپتیدی با فعالیت‌های کاتالیزی مختلف کنار هم قرار گرفته و زیر واحدهای یک آنزیم چند زیرواحدی را تشکیل می‌دهند و یا این که این رشته‌های پلی‌پپتیدی به روی یک داربست مشترک، جمع شده و توسط آن کنار هم نگه داشته می‌شوند (شکل c ۲۸ـ۳). این آرایش به محصولات یک واکنش امکان می‌دهد تا به‌طور مستقیم به طرف آنزیم بعدی در مسیر متابولیسمی جریان یابند. در بعضی موارد پروتئین‌های مستقل، در سطح ژنتیکی با همدیگر ادغام می‌شوند و آنزیمی با چند عملکرد و چند دُمین را می‌سازند (شکل c ۲۸ـ۳).

آنزیم‌هایی که مولکول‌های حرکتی نامیده می‌شوند، انرژی را به حرکت تبدیل می‌کنند

در مقیاس نانوی سلول‌ها و مولکول‌ها، تحرک تحت تأثیر نیروهایی قرار می‌گیرند که این نیروها متفاوت از نیروهای موجود در دنیای ماکروسکوپی است. به عنوان مثال غلظت بالای پروتئین (۲۰۰ـ۳۰۰ mg/ml) در سیتوپلاسم اجازه نمی‌دهد، اندامک‌ها و وزیکول‌ها با سرعت بیشتر از ۱۰۰μm در سه ساعت انتشار یابند. حتی یک باکتری در اندازه میکرومتر متحمل نیروی کششی آب می‌شود بطوریکه این نیرو در هنگام توقف حرکت باکتری، از حرکت رو به جلوی آن در مقیاس نانومتر ممانعت می‌کند. جهت تولید نیروی لازم برای اغلب حرکات سلولی، سلول‌ها به آنزیم‌های تخصص یافته‌ای نیازمندند، که **مولکول حرکتی** یا **پروتئین‌های حرکتی** نامیده می‌شوند. این آنزیم‌های مکانوشیمیایی، انرژی آزاد شدهٔ هیدرولیز ATP و یا انرژی موجود در شیب‌های یونی را به نیروی مکانیکی تبدیل می‌نمایند و معمولاً حرکت خطی و یا چرخشی تولید می‌کنند. از فعالیت‌های مشاهده شده برای پروتئین‌های حرکتی به سه خصوصیت کلی آنها پی ببریم:

- توانایی تبدیل یک منبع انرژی (ATP یا شیب یونی) به حرکت خطی یا چرخشی
- توانایی اتصال به سوبسترا و جابه‌جایی در طول آن
- حرکت در یک جهت خاص

ما مثال‌های زیادی از این مولکول‌های حرکتی را در فصل‌های بعدی خواهیم دید.

نکات کلیدی بخش ۳.۳

عملکرد پروتئین

- تقریباً عملکرد همه پروتئین‌ها، وابسته به اتصال به مولکول دیگر (لیگاند) است.
- ویژگی یک پروتئین به لیگاندی خاص، به اتصال ترجیحی آن به یک یا چند لیگاند مرتبط، بر می‌گردد.
- تمایل یک پروتئین به لیگاند خاص نشان‌دهندهٔ قدرت اتصال بوده و معمولاً با ثابت تجزیه (K_d) بیان می‌شود.
- جایگاه‌های اتصال به لیگاند بر روی پروتئین‌ها و لیگاندهای مرتبط با آنها، از لحاظ شیمیایی و فضایی مکمل هستند.
- آنزیم‌ها پروتئین‌های کاتالیزی بوده و سرعت واکنش‌های سلولی را افزایش می‌دهند. آنزیم‌ها این عمل را با کاهش انرژی فعال‌سازی و پایدار نمودن حد واسطهای حالت گذار، انجام می‌دهند.
- جایگاه فعال آنزیم قسمت کوچکی از پروتئین است و شامل دو قسمت عملکردی می‌باشد: جایگاه اتصال به سوبسترا و جایگاه کاتالیز. اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده جایگاه فعال، در توالی اسیدهای آمینه الزاماً کنار هم نیستند بلکه در ساختمان فضایی طبیعی نزدیک هم قرار می‌گیرند.
- جایگاه اتصال به سوبسترا مسئول ویژگی استثنایی آنزیم‌هاست. این ویژگی در اثر مکمل شدن مولکولی جایگاه اتصال به سوبسترا یا سوبسترا و حالت گذار، ایجاد می‌شود.
- اتصال سوبسترا (S) به آنزیم (E) باعث تشکیل کمپلکس آنزیم ـ سوبسترا (ES) شده و تحت یک یا چند واکنش قرار می‌گیرد. این واکنش‌ها به وسیله گروه‌های کاتالیزی موجود در جایگاه فعال انجام می‌گیرد تا محصول (P) تشکیل شده و به بیرون از آنزیم انتشار یابد.
- از روی نمودار اثر غلظت سوبسترا بر سرعت واکنش، دو پارامتر از آنزیم را می‌توان تعیین نمود: ثابت میکائیلیس (K_m)، این پارامتر تمایل آنزیم را برای تبدیل سوبسترا به محصول نشان می‌دهد و سرعت حداکثر (V_{Max}) که اندازه قدرت کاتالیزی آنزیمی را نشان می‌دهد (شکل ۲۲ـ۳ را ملاحظه کنید).
- سرعت واکنش‌های کاتالیز شده با آنزیم به‌طور چشم‌گیری متفاوت است. واکنش‌های آنزیمی، اعداد تبدیلی (تعدادی از

مولکول‌های سوبسترا که توسط یک جایگاه فعال، در غلظت نسبتاً سوبسترا به محصول تبدیل می‌شوند) در محدوده کوچک‌تر از یک تا 6×10^5 مولکول بر ثانیه دارند.

■ غشاء آنزیم‌ها با تقسیم نمودن یک فرآیند به چند واکنش شیمیایی مجزا، سوبستراها را به محصولات تبدیل می‌کنند. این واکنش‌ها حاوی چند کمپلکس آنزیم ـ سوبسترای جداگانه هستند (ES'، ES" و غیره).

■ سرین پروتئازها با استفاده از زنجیره‌های جانبی سرین ۱۹۵، هیستیدین ۵۷ و اسید آسپارتیک ۱۰۲ به عنوان گروه‌های کاتالیزی، پیوندهای پپتیدی را در سوبستراهای پروتئینی، هیدرولیز می‌کنند.

■ اسیدهای آمینه قرار گرفته در پاکت اتصال ویژه موجود در جایگاه اتصال سرین پروتئازها، ریشه‌های سوبسترای پروتئینی را که باید هیدرولیز شود تعیین می‌کنند، بنابراین دلیل تفاوت ویژگی آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز می‌باشند.

■ آنزیم‌ها اکثراً از کاتالیز اسید ـ بازی استفاده نموده و این عمل را با استفاده از زنجیره جانبی یک یا چند اسید آمینه (مثلاً گروه ایمیدازول هیستیدین ۵۷ در سرین پروتئازها) انجام می‌دهند.

■ وابستگی به pH پروتونه شدن گروه‌های کاتالیزی (pKa) اغلب در نمودار سرعت ـ pH، فعالیت آنزیمی منعکس می‌شود. حساسیت به pH فعالیت آنزیمی می‌تواند به دلیل تغییر در یونیزاسیون گروه‌های کاتالیزی، یا گروه‌هایی که به‌طور مستقیم در اتصال سوبسترا نقش دارند و یا گروه‌هایی مؤثر بر ساختمان فضایی پروتئین باشد.

■ در بعضی آنزیم‌ها، یون‌ها یا مولکول‌های کوچک غیرپپتیدی به نام کوفاکتور یا گروه‌های پروستاتیک می‌توانند به جایگاه فعال آنزیم متصل شوند و نقش اصلی در کاتالیز آنزیمی ایفا نمایند. در آنزیم‌ها گروه‌های پروستاتیک که از مولکول‌های آلی کوچک تشکیل شده‌اند، کوآنزیم نامیده می‌شوند. از این مولکول‌های آلی می‌توان به ویتامین‌ها اشاره کرد. ویتامین‌ها در سلول‌های جانوران عالی سنتز نمی‌شوند و به عنوان کوآنزیم عمل نموده و یا در ساخت آن مورد استفاده قرار می‌گیرند.

■ آنزیم‌های دخیل در یک مسیر مشترک در ساختار سلولی خاصی قرار گرفته و همچنین می‌توانند به صورت دُمین‌های یک پروتئین تک زیرواحدی یا زیر واحدهای پروتئین چند زیرواحدی به هم بپیوندند و یا می‌توانند اجزاء یک کمپلکس پروتئینی را فراهم نموده و بر روی یک داربست مشترک تجمع یابند.

■ پروتئین‌های حرکتی، آنزیم‌های مکانوشیمیایی بوده و انرژی آزاد شده از هیدرولیز ATP را به حرکت خطی یا چرخشی تبدیل می‌کنند.

۳ـ۴ تنظیم عملکرد پروتئین ۱: تجزیه پروتئین

اغلب فرآیندهای سلولی به‌طور مستقل از هم و یا با ثابت سرعت مستقل، انجام نمی‌شوند. فعالیت همه پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی طوری تنظیم می‌شود تا عملکرد آنها برای حیات، بهینه باشد. به عنوان مثال، فعالیت کاتالیزی آنزیم‌ها طوری تنظیم می‌شود تا مقدار محصول واکنش به اندازه نیاز سلول باشد. در نتیجه، غلظت‌های حالت پایای سوبستراها و محصولات بسته به شرایط سلولی تغییر خواهد کرد. تنظیم پروتئین‌های غیرآنزیمی (به‌طور مثال، باز و بسته شدن کانال‌های غشایی و تجمع کمپلکس ماکرومولکولی) نیز ضروری است.

در کل سه روش برای تنظیم فعالیت پروتئین وجود دارد. اول این‌که، سلول‌ها می‌توانند با تغییر سرعت سنتز یا تخریب پروتئین و یا هر دو، سطح پروتئین را افزایش یا کاهش دهند. دوم، سلول‌ها می‌تواند جدای از مقدار پروتئین، فعالیت ذاتی آن را نیز تغییر دهند (مثل تمایل اتصال به سوبسترا، مدت زمان بودن پروتئین در ساختمان فضایی فعال نسبت به ساختمان فضایی غیرفعال). سوم، سلول‌ها می‌توانند با تغییر غلظت و موقعیت موادی که پروتئین بر روی آن عمل می‌کند (مثل سوبسترای آنزیم) و یا سایر مواد دیگر مورد نیاز برای فعالیت پروتئین (هم‌چون کوفاکتور)، فعالیت پروتئین را تنظیم نمایند. هر سه نوع تنظیم، نقش اساسی را در حیات و عملکرد سلول‌ها، ایفا می‌کنند.

سنتز و تجزیه تنظیم شده پروتئین‌ها، یک خصوصیت اساسی سلول‌ها است

کنترل سنتز پروتئین : سرعت سنتز پروتئین‌ها به وسیله سرعت تبدیل DNA رمزدهی‌کننده پروتئین به mRNA (رونویسی)، مقدار mRNAی فعال در سلول و سرعت تبدیل mRNA به پروتئین تازه سنتز شده، تعیین می‌شود. این مسیرهای مهم با جزئیات بیشتری در فصل ۴ توضیح داده شده‌اند.

کنترل تجزیه پروتئین : طول عمر پروتئین‌های درون سلولی از مدت زمانی به کوتاهی چند دقیقه برای سیکلین‌های سلولی (به تنظیم

عبور از مرحله میتوزی تقسیم سلولی کمک می‌کنند) تا مدت زمانی به درازای طول عمر موجود زنده در مورد پروتئین‌های عدسی چشم، متغیر است. طول عمر پروتئین به‌طور عمده از طریق تجزیه پروتئین کنترل می‌شود.

تجزیه پروتئین، دو نقش مهم اختصاصی دارد. نقش اول تجزیه پروتئین‌ها این است که پروتئین‌های بالقوه سمی، پروتئین‌های اشتباه تا خورده یا تجمع یافته به‌طور نامناسب و یا آسیب‌دیده (شامل محصولات ژن‌های جهش یافته و پروتئین‌های آسیب‌دیده از متابولیت‌های فعال شیمیایی سلول) را حذف می‌نماید. علی‌رغم اینکه پروتئین‌ها به وسیله چاپرون‌ها تا می‌خورند تخمین زده می‌شود حدود ۳۰ درصد از پروتئین‌های تازه سنتز شده به دلیل تا خوردگی نامناسب، تجمع به صورت کمپلکس‌های ناقص و یا نامناسب سریعاً تجزیه می‌شوند. اغلب پروتئین‌های دیگر به آرامی و با سرعت حدود ۲ـ۱ درصد تجزیه در ساعت، در سلول‌های پستانداران، تجزیه می‌شوند. نقش دوم این که تجزیه کنترل‌شده پروتئین‌های طبیعی، مکانیسم قدرتمندی را برای نگهداری پروتئین‌ها و فعالیت‌شان در سطح مناسب فراهم آورده و امکان تغییر سریع در این سطوح را برای کمک به سلول‌ها در پاسخ به تغییر شرایط می‌دهد.

سلول‌های یوکاریوتی مسیرهای متعددی برای تجزیه پروتئین‌ها دارند. یک مسیر اصلی، تجزیه به وسیله آنزیم‌های لیزوزومی است. لیزوزوم اندامکی محدود به غشاء است که درون آن اسیدی (pH≈۴/۵) بوده و با آنزیم‌های هیدرولیزی پر شده است. تجزیه لیزوزومی به‌طور عمده به طرف اندامک‌های مسن یا آسیب‌دیده (این فرآیند اتوفاژی نامیده می‌شود، شکل ۲ـ۹ را ملاحظه کنید) و هم‌چنین به طرف پروتئین‌های بیرون سلولی که به وسیله سلول جذب شده‌اند، هدایت می‌شود. لیزوزوم‌ها در فصل بعد توضیح داده خواهند شد. در این جا ما بر روی تجزیه پروتئین به وسیله پروتئوزوم‌ها تمرکز می‌کنیم.

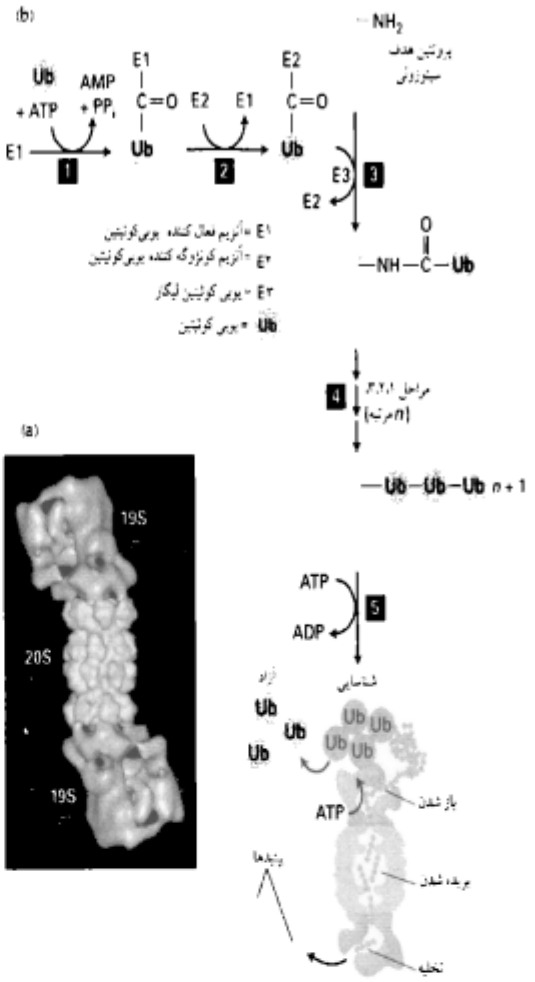
پروتئوزوم ماشین پیچیده مولکولی است و برای تجزیه پروتئین‌ها به کار می‌رود

پروتئوزوم‌ها ماشین‌های ماکرومولکولی خیلی بزرگ بوده و تقریباً از ۵۰ زیر واحد پروتئینی با وزن مولکولی $۲/۴\times۱۰^{۶}$ـ۲ دالتون تشکیل شده‌اند. آنها بدنه کاتالیزی بشکه مانند و استوانه‌ای به نام پروتئوزوم ۲۰S داشته (S واحد سودبرگ براساس خصوصیات رسوبی است، خصوصیات رسوبی یک ذره با اندازهٔ آن متناسب است) و با اتصال سر، به یک یا دو انتهای بدنه، فعالیت پروتئوزومی آن تنظیم می‌شود. تقریباً ۳۰۰۰۰ پروتئوزوم در هر سلول پستانداران وجود دارد.

چندین شکل پروتئوزومی وجود دارد که از بین آنها پروتئوزوم ۲۶S (شکل a ۲ـ۳) بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است. بدنه کاتالیزی پروتئوزوم ۲۶S تقریباً ۱۴/۸ nm طول و ۱۱/۳ nm عرض داشته و در هر انتها حاوی یک سر تنظیمی ۱۹S می‌باشد. کمپلکس‌های سر تنظیمی مختلف و با فعالیت‌های متفاوتی وجود دارد. سر ۱۹S، ۱۸ـ۱۶ زیر واحد پروتئینی دارد، ۶ تا از این زیر واحدها می‌توانند ATP را کاتالیز نموده و انرژی لازم را برای باز نمودن سوبسترای پروتئینی و انتقال گزینشی آن به داخل محفظه پروتئوزوم، فراهم نمایند. مطالعات ژنتیکی در مخمر نشان داده، سلول‌ها نمی‌توانند بدون پروتئوزوم‌های عملکردی زنده بمانند. این اهمیت پروتئوزوم‌ها را نشان می‌دهد. علاوه بر این، فعالیت صحیح پروتئوزومی به اندازه‌ای مهم است که سلول‌ها به مقدار ۳۰ درصد از انرژی لازم برای سنتز پروتئین را صرف تجزیه آن در پروتئوزوم می‌کنند.

بدنه کاتالیزی پروتئوزومی، حاوی دو حلقه با شش جایگاه فعال پروتئولیزی به طرف محفظه داخلی با قطر ۱/۷ نانومتر و دو حلقه بیرونی که دسترسی به سوبسترا را کنترل می‌کنند، دارد. پروتئوزوم‌ها، می‌توانند اغلب پروتئین‌ها را به طور کامل تجزیه نمایند چون آنها جایگاه‌های فعالی دارند (هر کدام دو جایگاه) که پیوند پپتیدی را بعد از ریشه‌های آب‌گریز اسیدی و بازی، می‌شکنند. سوبسترای پلی‌پپتیدی بایستی از طریق یک دریچه تنظیم شده در مرکز حلقه‌های بیرونی وارد محفظه [پروتئولیزی] شوند. در پروتئوزوم ۲۶S باز شدن دریچه (این دریچه نازک بوده و فقط به پروتئین‌های باز شده، امکان ورود می‌دهد) به وسیله ATPآزهای موجود در سر ۱۹S کنترل می‌شود. قطعات کوتاه پپتیدی (با طول ۲۴ـ۲ ریشه) حاصل از تجزیه پروتئوزومی از محفظه خارج شده و سریعاً به وسیله پپتیدازهای سیتوزولی مورد تجزیه بیشتر قرار گرفته و در آخر به اسیدآمینه تبدیل می‌شوند. بعضی مواقع به شوخی گفته می‌شود، پروتئوزوم «اتاق سلولی سرنوشت» است که در آن پروتئین‌ها با هزار برش، می‌میرند.

مهارکننده‌های عملکرد پروتئوزومی می‌توانند به صورت دارویی مصرف شوند. با وجود اهمیت زیاد پروتئوزوم‌ها برای سلول‌ها، مهار کامل و پیوسته پروتئوزوم‌ها، سلول‌ها را می‌کشد. با این حال، مهار جزئی و ناپیوسته پروتئوزوم به عنوان راهی برای درمان سرطان ارائه شده است. برای زنده ماندن و رشد نمودن، سلول‌ها به‌طور طبیعی به فعالیت قدرتمند پروتئین تنظیمی به نام



▲ **شکل ۲۹ـ۳ یوبی‌کوئیتین و پروتئولیز به وسیله پروتئوزوم.** a) تصویر ساخته شده با کامپیوتر نشان می‌دهد، پروتئوزوم با یک سر ۱۹S در دو انتهای بدنه ۲۰S، ساختار استوانه‌ای دارد. پروتئین‌های نشاندار شده با یوبی‌کوئیتین در درون بدنه پروتئوزوم، پروتئولیز می‌شوند. b) پروتئین‌ها از طریق پلی‌یوبی کوئیتنیه شدن، هدف تجزیه پروتئوزومی قرار می‌گیرند. آنزیم E1 با اتصال یک مولکول یوبی‌کوئیتین (Uh) فعال می‌شود (مرحله ❶). سپس این مولکول یوبی‌کوئیتین به ریشه سیستئین در E2 منتقل می‌شود (مرحله ❷)، یوبی‌کوئیتین لیگاز (E3) مولکول Uh منتقل شده به E2 را به NH_2 زنجیره جانبی ریشه لیزین در پروتئین هدف منتقل می‌کند (مرحله ❸) مولکول‌های Ub دیگر با تکرار مراحل ۱ و ۳ به پروتئین هدف افزوده شده و زنجیره پلی‌یوبی‌کوئیتین را تشکیل می‌دهند (مرحله ❹). پروتئین هدف پلی‌یوبی کوئیتنیه شده، به وسیله سر پروتئوزوم شناخته می‌شود. سر پروتئوزوم با استفاده از هیدرولیز ATP، گروه‌های Ub را بر می‌دارد. پروتئین هدف باز شده و به داخل محفظه پروتئولیز در بدنه پروتئوزوم منتقل می‌شود. بعد از آن قطعات پپتیدی کوتاه حاصل از تجزیه از محفظه پروتئولیز در پروتئوزوم آزاد می‌شوند (مرحله ❺).

$NF_{\kappa}B$ و همچنین سایر پروتئین‌های پیش بقایی[1] نیاز دارند. $NF_{\kappa}B$ زمانی می‌تواند به‌طور کامل فعال باشد و باعث بقاء شود که مهارکننده آن یعنی $I_{\kappa}B$ از $NF_{\kappa}B$ رها شود و به وسیله پروتئوزوم تجزیه گردد (فصل ۱۶). مهار جزئی فعالیت پروتئوزومی به وسیله داروی مهارکننده، باعث افزایش سطح $I_{\kappa}B$ می‌شود و در نتیجه فعالیت $NF_{\kappa}B$ کاهش می‌یابد (از بین رفتن فعالیت پیش بقایی). به دنبال آن سلول‌ها به وسیله مکانیسمی که **آپوپتوز**[2] (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فصل ۲۱) نامیده می‌شود، می‌میرند. چون، بعضی از انواع سلول‌های توموری در مقابل مهارکننده‌های آنزیمی، حساس‌تر از سلول‌های معمولی بوده و زود می‌میرند، می‌توان با تجویز **کنترل شده** مهارکننده‌های پروتئوزومی (به مقداری که سلول‌های سرطانی را کشته و بر روی سلول‌های طبیعی اثری نداشته باشد) به درمان مؤثری حداقل برای یک سرطان کشنده یعنی میلومای چندگانه[3]، دست یافت.

یوبی‌کوئیتین پروتئین‌های سیتوزولی را برای تجزیه شدن، در پروتئوزوم‌ها نشانه‌گذاری می‌کند

گرچه پروتئوزوم‌ها سریعاً فقط پروتئین‌های معیوب و همچنین پروتئین‌هایی که باید به موقع برداشته شوند، را تجزیه می‌کند، با این حال آنها بایستی قادر باشند تا پروتئین‌هایی که بایستی تجزیه شوند را از بین پروتئین‌های دیگر شناسایی نمایند. برای حل این مسئله، سلول‌ها پروتئین‌هایی را که بایستی تجزیه شوند با اتصال کووالان چندین نسخه از پلی‌پپتیدی به نام **یوبی‌کوئیتین**[4] شناسایی می‌کنند. یوبی‌کوئیتین ۷۶ اسید آمینه داشته و از مخمر تا انسان شدیداً حفاظت شده است. یک سیستم حسگر پیچیده، تکامل یافته تا پروتئین‌هایی را که باید تجزیه شوند، تعیین نموده و سپس در یک فرآیند سه مرحله‌ای پروتئین‌های هدف، پلی‌یوبی‌کوئیتینه می‌شوند. سد تنظیمی ۱۹S در پروتئوزوم ۲۶S پروتئین‌های نشاندار شده با یوبی‌کوئیتین را شناسایی نموده، ساختارشان را باز کرده و برای تجزیه، آنها را به داخل پروتئوزوم انتقال می‌دهد. فرآیند یوبی‌کوئیتینه شدن (شکل b ۲۹ـ۳) شامل:

۱ـ فعال‌سازی *آنزیم فعال‌کننده یوبی‌کوئیتین*[5] **(E1)** با افزودن یک مولکول یوبی‌کوئیتین، این واکنش احتیاج به ATP دارد.

1- Pro-Survival Proteins

2- Apoptosis

3- Multiple myeloma

4- Ubiquitin

5- Ubiquitin-actiating enzyme

۲ـ انتقال مولکول یوبی‌کوئیتین به ریشه سیستئین در آنزیم **کونژوگه کننده یوبی‌کوئیتین**[1] **(E2)**

۳ـ تشکیل پیوند ایزوپپتیدی بین انتهای کربوکسیل از یوبی‌کوتیئین متصل شده به E2 و گروه آمینی زنجیره جانبی ریشه لیزین در پروتئین هدف. این واکنش به وسیله آنزیم **پروتئین ـ یوبی‌کوئیتین لیگاز**[2] **(E3)** انجام می‌شود. واکنش‌های بعدی لیگاز، یوبی‌کوئیتین‌های دیگری را به زنجیره جانبی لیزین۴۸ در یوبی‌کوئیتینی که قبلاً به پروتئین هدف متصل شده اضافه نموده و پلیمری خطی از یوبی‌کوئیتین یا پروتئین هدف تغییر یافته با پلی‌یوبی‌کوئیتین را می‌سازد.

اختصاصی بودن فرایند تجزیه : هدف قرار دادن پروتئین‌های ویژه ابتدا از طریق ویژگی سوبسترایی لیگاز E3 حاصل می‌شود. صدها لیگاز E3 در سلول‌های پستانداران وجود داشته و هر وقت نیاز باشد، باعث پلی‌یوبی‌کوئیتینه شدن مقدار وسیعی از پروتئین‌ها می‌شود.

مثالی از کنترل فعالیت یک پروتئین کلیدی سلول که با سیستم پروتئوزوم ـ یوبی‌کوئیتین تنظیم می‌شود، تجزیه تنظیم شده پروتئین‌هایی به نام **سیکلین‌ها**[3] است. این پروتئین‌ها چرخه سلولی (فصل ۲۰) را کنترل می‌کنند. سیکلین‌ها دارای توالی درونی Arg-X-X-Leu-Gy-X-Ile-Gly-Asp-Asn (x هر اسیدآمینه‌ای می‌تواند باشد) هستند که به وسیله کمپلکس‌های آنزیمی یوبی‌کوئیتینه کننده اختصاصی شناخته می‌شوند. در یک برههٔ خاص زمانی در چرخه سلولی، هر سیکلین به وسیله سیکلین کینازی ویژه، فسفریله می‌شود. به نظر می‌رسد این فسفریله شدن باعث تغییر ساختمان فضایی شده، توالی‌های مورد شناسایی در معرض آنزیم‌های یوبی‌کوئیتینه کننده قرار می‌گیرد و منجر به پلی‌یوبی‌کوئیتینه شدن و تجزیه پروتئوزومی می‌شود.

دنباله‌های یوبی‌کوئیتین با چند عملکرد: یوبی‌کوئیتینه شدن غیر از تجزیه پروتئین هدف، اعمال دیگری در سلول انجام می‌دهد. مثال‌هایی از یوبی‌کوئیتینه شدن‌های دیگر شامل: (۱) اضافه شدن کووالان یک مولکول یوبی‌کوئیتین (مونو یوبی‌کوئیتینه شدن) به یک لیزین در روی پروتئین هدف. (۲) افزوده شدن چند یوبی‌کوئیتین منفرد (یوبی‌کوئیتینه شدن چندگانه) به پروتئین. (۳) اتصال یوبی‌کوئیتین به انتهای N پروتئین هدف و (۴) پلی‌یوبی‌کوئیتینه شدنی که در آن یوبی‌کوئیتین‌ها به جای لیزین ۴۸، از طریق لیزین ۶۳ به یکدیگر متصل می‌شوند. این تغییرات می‌توانند رفت و آمد (دسته‌بندی) پروتئین‌ها در درون سلول (همچون به درون آمدن از سطح غشاء)، کنترل تعمیر DNA و تنظیم رونویسی را تحت تأثیر قرار دهند. بدون شک تغییرات حاصل از یوبی‌کوئیتینه شدن، اعمال زیاد دیگری را انجام می‌دهند که تاکنون کشف نشده‌اند. سلول‌ها همچنین انواع مختلفی از آنزیم‌های دِیوبی‌کوئیتینه کننده دارند که یوبی‌کوئیتین‌ها را از پروتئین‌های هدف برداشته و در بعضی موارد باعث می‌شود تنظیم حاصل از یوبی‌کوئیتینه شدن، برگشت نماید.

نکات کلیدی بخش ۳.۴

تنظیم عملکرد پروتئین I: تجزیه پروتئین

- پروتئین‌ها ممکن است در سطح سنتز پروتئین، تجزیه پروتئین و یا از طریق تأثیر میانکنش‌های کووالان یا غیرکووالان بر روی فعالیت ذاتی پروتئین‌ها تنظیم شوند.
- طول عمر پروتئین‌ها درون سلولی به میزان زیادی توسط مستعدبودن آنها نسبت به تجزیه پروتئولیزی تعیین می‌شود.
- اغلب پروتئین‌ها برای تخریب با دنباله یوبی‌کوئیتین نشاندار شده سپس درون پروتئوزوم (کمپلکس استوانه‌ای بزرگ با چندین پروتئاز در درون تجزیه می‌شود (شکل ۲۹-۳ را ملاحظه کنید.)
- تغییرِ ماهیت اتصال کووالان یوبی‌کوئیتین به پروتئین‌ها در عملکردهای دیگری غیر از تجزیه با پروتئوزوم همچون تغییر در موقعیت یا فعالیت پروتئین‌ها نقش دارد.

۳ـ۵ تنظیم عملکرد پروتئین II: تغییرات کووالان و غیرکووالان

فعالیت ذاتی پروتئین‌ها توسط تغییرات غیرکووالان و کووالان پروتئین تنظیم می‌شود. تغییرات غیرکووالان معمولاً شامل اتصال و جدا شدن یک مولکول است، این عمل باعث تغییر در ساختمان فضایی پروتئین می‌شود. در چنین مواردی فعال‌سازی پروتئین اغلب شامل رها شدن یا نوآرایی یک زیر واحد یا دمین مهاری است.

تغییرات کووالان شامل هیدرولیز زنجیره پلی‌پپتیدی یا اضافه شدن یک مولکول به زنجیره جانبی یک یا چند ریشه و یا به انتهای C و انتهای N پروتئین است. چنین تغییراتی می‌تواند باعث تغییر ساختمان فضایی در پروتئین شده و در نتیجه باعث تغییر فعالیت آن

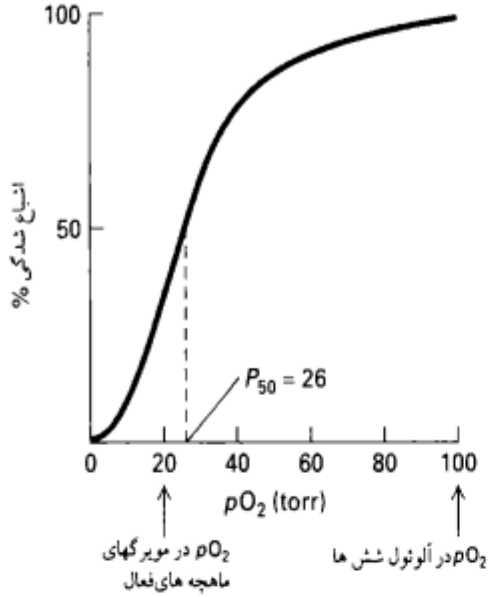
1- Ubiquitin-conjugating enzyme
2- Ubiquitin-protein ligase
3- Cyclin

شود (شکل، عملکرد است). تغییرات کووالان همچنین شکل پروتئین را بدون تغییر در ساختمان فضایی پلی‌پپتیدی و زنجیره‌های جانبی آن، تغییر می‌دهد. این تغییر، مثلاً با افزوده شدن یک گروه باردار یا حجیم انجام می‌گیرد که می‌تواند توانایی پروتئین را در اتصال به مولکول‌های دیگر، عوض کند. در نهایت، تغییرات کووالان می‌توانند پروتئین را به جایگاه‌هایی خاصی در سلول (مثلاً سطح سیتوپلاسمی غشاء پلاسمایی) هدایت نمایند.

اغلب تغییرات غیرکووالان و کووالان برگشت‌پذیرند و بنابراین امکان می‌دهند فعالیت یک پروتئین در طی طول عمرش، چندین بار کاهش یا افزایش یابد. تغییرات دیگر از قبیل پروتئولیز، برگشت‌ناپذیر بوده و پروتئین تغییر یافته از طریق تجزیه پروتئین و فقط توسط سنتز دوباره آن می‌تواند جایگزین شود. در مورد آنزیم‌ها، این تغییرات تنظیمی، K_m و V_{max} و یا هر دو را تغییر می‌دهند. طبیعت استراتژی‌های مختلفی برای تنظیم کووالان و غیرکووالان فعالیت [پروتئین‌ها] استفاده می‌کند. در این جا بعضی از مکانیسم‌های رایجِ تنظیمِ عملکردِ پروتئین را توضیح می‌دهیم، مثال‌های دیگری در فصول بعدی مورد بحث قرار خواهند گرفت.

اتصال غیرکووالان امکان تنظیم آلوستریک یا متعاون پروتئین‌ها را می‌دهد

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های تنظیم عملکرد پروتئین از طریق میانکنش‌های آلوستریک انجام می‌گیرد. **آلوستری** (واژه یونانی «شکل دیگر») هر تغییری را که با اتصال غیرکووالان یک لیگاند، در ساختار سوم و چهارم پروتئین و یا هر دو القاء می‌شود، نشان می‌دهد. هنگامی که لیگاندی به یک جایگاه (A) در پروتئین متصل شده و تغییر ساختمان فضایی مرتبطی را در فعالیت جایگاه متفاوتی (B) القاء کند، در این حالت لیگاند، **عامل آلوستریک**[1] پروتئین، جایگاه A، **جایگاه اتصال آلوستریک**[2] و پروتئین، **پروتئین آلوستریک**[3] نامیده می‌شوند. براساس تعریف، پروتئین‌های آلوستریک چندین جایگاه اتصال برای یک یا چند نوع لیگاند دارند. تغییر آلوستریکِ فعالیت می‌تواند مثبت یا منفی باشد یعنی می‌تواند فعالیت پروتئین را افزایش یا کاهش دهد. تنظیم آلوستریک به طور اختصاصی در آنزیم‌ها و یا پروتئین‌های چند زیر واحدی مطرح است. در آنها تغییرات ساختمان فضایی در یک زیر واحد به زیر واحد مجاور انتقال می‌یابد. تعاونی[4] واژه‌ای است که اغلب مترادف با آلوستری استفاده می‌شود و معمولاً اثر (مثبت یا منفی) اتصال یک لیگاند به یک جایگاه و اثرش بر روی اتصال لیگاندهای مشابه در



▲ **شکل تجربی ۳ـ۳۰ هموگلوبین به‌طور متقارن به اکسیژن متصل می‌شود.** هر پروتئین هموگلوبین چهارزیرواحدی، چهار جایگاه اتصال به اکسیژن دارد. در حالت اشباع همه جایگاه‌ها با اکسیژن پر شده‌اند. غلظت اکسیژن به‌طور معمول به صورت فشار نسبی اندازه‌گیری می‌شود (PO_2)، P_{50}، $PO]_2$ فشاری از اکسیژن] است که در آن فشار نصف جایگاه‌های اتصال در غلظتی از هموگلوبین با اکسیژن اشغال شده‌اند. بعضی مواقع PO_2 را شبیه K_m در واکنش‌های آنزیمی در نظر می‌گیرند. تغییرات بزرگ در مقدار اکسیژن متصل شده در اثر تغییرات کم و در مقادیر کم از PO_2، امکان می‌دهد تا هموگلوبین به طور مؤثری اکسیژن را در بافت‌های محیطی همچون ماهیچه تخلیه کند. سیگموئیدی بودن نمودار درصد اشباع شدن علیه غلظت لیگاند نشان‌دهنده اتصال متعاون است. در غیاب اتصال متعاون، نمودار اتصال، نموداری سهمی شکل، شبیه به نمودارهای شکل ۳ـ۲۲ است.

جایگاهی متفاوت، نشان می‌دهد.

هموگلوبین یک مثال کلاسیک از اتصال متعاون مثبت را نشان می‌دهد. در این پروتئین اتصال یک لیگاند (اکسیژن) تمایل اتصالی مولکول اکسیژن بعدی را افزایش می‌دهد. هر کدام از چهار زیر واحد هموگلوبین، حاوی یک مولکول هم است. گروه‌های هم ترکیبات متصل‌شونده به اکسیژن در هموگلوبین هستند (شکل ۳ـ۱۳ را ملاحظه کنید).

اتصال اکسیژن به مولکول هم در یکی از چهار زیر واحد هموگلوبین

1- Allosteric effector
2- Allosteric binding site
3- Allosteric protein
4- cooperativity

تغییرات ساختمان فضایی را القاء می‌کند که این تغییر به زیر واحدهای دیگر منتقل و باعث کاهش K_m (افزایش تمایل) اتصال مولکول‌های دیگر اکسیژن به هم‌های باقیمانده شده و در نتیجه باعث ایجاد نمودار سیگموئیدی برای اتصال اکسیژن (شکل ۳۰ـ۳) گردد. به دلیل سیگموئیدی بودن نمودار اشباع اکسیژنی، فقط افزایش چهاربرابر غلظت اکسیژن باعث می‌شود درصد اشباع جایگاه‌های اتصال اکسیژنی هموگلوبین از ۱۰ تا ۹۰ درصد افزایش یابد. در حالیکه اگر اثر تعاونی وجود نداشت و شکل نمودار مثل نمودار میکائیلیس ـ منتن بود، برای حصول به چنین اشباع شدنی، بایستی غلظت اکسیژن ۸۱ برابر افزایش می‌یافت. این تعاونی به هموگلوبین امکان می‌دهد تا اکسیژن را به‌طور مؤثری در شش‌ها که غلظت اکسیژن زیاد است، جذب نموده و آن را در بافت‌ها که غلظت اکسیژن کم است، از دست بدهد. بنابراین اثر تعاونی حساسیت یک سیستم را در قبال تغییرات غلظت لیگاندهایش تشدید نموده و در بسیاری از موارد مزیت تکاملی را فراهم می‌کند.

در اثر تعاونی منفی اغلب محصول یک مسیر بیوشیمیایی چند مرحله‌ای، به آنزیم مرحله کنترل‌کننده سرعت متصل شده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد. در این مسیر از تولید بیش از اندازه محصول جلوگیری می‌شود. این نوع تنظیم مسیر متابولیسمی، **مهار با محصول نهایی**[1] یا **مهار پس نورد**[2] نیز نامیده می‌شود.

اتصال غیرکووالان کلسیم و GTP به‌طور وسیعی به عنوان سوئیچ‌های آلوستریک استفاده می‌شوند تا فعالیت پروتئین را کنترل کند

بر خلاف اکسیژن که باعث تغییرت آلوستریک مرحله به مرحله در فعالیت هموگلوبین می‌شود، سایر عوامل آلوستریک باعث ایجاد تغییراتی می‌شوند که فعالیت اغلب پروتئین‌ها را روشن یا خاموش می‌کنند. دو تغییر آلوستریک مهم که ما در سراسر این کتاب چندین بار با آن مواجه خواهیم شد، کلسیم و GTP است.

تغییر آلوستریک به واسطه کلسیم / کالمودولین: غلظت کلسیم آزاد در سیتوزول (کلسیم اتصال نیافته به مولکول‌هایی غیر از آب) در حد پایینی (حدوداً 10^{-7} M) نگه داشته می‌شود. این عمل به وسیله پروتئین‌های انتقالی غشایی تخصص یافته انجام می‌شود که به‌طور پیوسته Ca^{2+} را به بیرون از سیتوزول پمپ می‌کنند. همانطور که در فصل ۱۱ خواهیم دید، غلظت سیتوزولی Ca^{2+}، می‌تواند از ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش یابد. این حالت هنگامی اتفاق می‌افتد که کانال‌های نفوذپذیر Ca^{2+} در غشاءهای سطحی سلول باز شده و امکان جریان

▲ **شکل ۳۱ـ۳ تغییرات کونفورماسیونی ناشی از اتصال Ca^{2+} به کالمودولین.** کالمودولین پروتئین سیتوزولی است که به‌طور گسترده‌ای توزیع شده و حاوی چهار جایگاه اتصال به کلسیم می‌باشد. یک جایگاه در هر دست EFاش. دست EF موتیف مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ دارد. در غلظت‌های سیتوزولی کلسیم تا حدود 5×10^{-7}M، اتصال کلسیم به کالمودولین، ساختمان فضایی دمبلی شکل آن یعنی فرم اتصال نیافته a) را به فرمی تغییر می‌دهد که در آن زنجیره‌های جانبی آبگریز بیشتر در معرض حلال قرار می‌گیرند. کمپلکس کلسیم / کالمودولین حاصل می‌تواند اطراف مارپیچ‌های در دسترس از پروتئین‌های هدف، حلقه زده b) و بدین ترتیب فعالیت آنها را تغییر دهد.

یافتن Ca^{2+} بیرون سلولی را به درون سلول فراهم می‌کنند. افزایش کلسیم سیتوزولی توسط پروتئین‌های ویژه متصل‌شونده به کلسیم حس می‌شود. این پروتئین‌ها با روشن یا خاموش کردن پروتئین‌های دیگر، رفتار سلولی راتغییر می‌دهند. اهمیت Ca^{2+} بیرون سلولی برای فعالیت سلولی اولین بار توسط اس. رینگر[3] در سال ۱۸۸۳ نشان داده شد. او کشف کرد که قلب جدا شده موش رات وقتی در محلول NaCl درست شده با آب سخت (غنی از Ca^{2+}) لندن انداخته شود، منقبض می‌گردد. اما اگر به جای این آب، آب مقطر استفاده شود، قلب

1- End-product inhibition
2- Feed back inhibition
3- S.Ringer

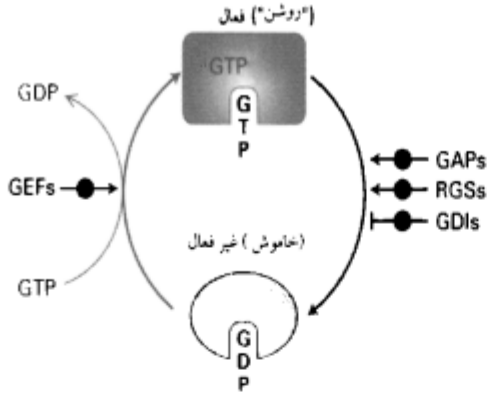
به طور بدی تپیده و سریعاً متوقف می‌گردد.

غلب پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم با استفاده از موتیف ساختاری دست EF / مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ به Ca^{2+} متصل می‌شوند. این موتیف قبلاً توضیح داده شده است (شکل b ۹ـ۳ را ملاحظه کنید). یک نمونه اصلی از پروتئین دست EF یعنی **کالمودولین**[1] در همه سلول‌های یوکاریوتی یافت شده و ممکن است به صورت تک زیرواحدی انفرادی و یا زیر واحدی از یک پروتئین چند زیر واحدی باشد. کالمودولین مولکول دمبلی شکل بوده و حاوی چهار دست EF متصل‌شونده به کلسیم با K_d حدوداً برابر با $10^{-6}M$ می‌باشد. اتصال کلسیم به کالمودولین باعث تغییر ساختمان فضایی شده و امکان می‌دهد تا کلسیم / کالمودولین به توالی‌های حفاظت‌شده‌ای در پروتئین‌های هدف مختلف متصل شده و بنابراین فعالیت آنها را روشن یا خاموش کنند (شکل ۳۱ـ۳). پس کالمودولین و پروتئین‌های دست EF مشابه، به عنوان **پروتئین‌های تغییردهنده**[2] عمل کرده و به موازات تغییر در سطح Ca^{2+}، فعالیت پروتئین‌های دیگر را تغییر می‌دهند.

تغییر به واسطه پروتئین‌های متصل‌شونده به نوکلئوتید گوآنین: گروه دیگری از پروتئین‌های تغییردهنده، **ابرخانواده GTPآز**[3] را تشکیل می‌دهند. همان‌طوری که از نام این گروه بر می‌آید، این پروتئین‌ها، آنزیم‌های GTPآز بوده و می‌توانند GTP (گوآنوزین تری‌فسفات) را به GDP (گوآنوزین دی‌فسفات) تجزیه کنند. آنها حاوی پروتئین تک زیرواحدی Ras (شکل ۸ـ۳ را ملاحظه کنید) و زیر واحد $G\alpha$ در پروتئین‌های G سه زیرواحدی می‌باشد. هر دو این پروتئین‌ها با جزئیات بیشتری در فصل ۱۵ توضیح داده شده‌اند. هم Ras و هم $G\alpha$ می‌توانند به غشاء پلاسمایی متصل شده (در پیام‌رسانی عمل می‌کنند) و نقش کلیدی را در تکثیر و نمو سلول ایفاء کنند. سایر اعضای خانواده GTPآز در سنتز پروتئین، انتقال پروتئین‌ها بین هسته و سیتوپلاسم و نوآرایی در اسکلت سلولی نقش دارند. پروتئین چاپرون Hsp70 که قبلاً درباره آن بحث کردیم مثالی از یک سوئیچ ATP/ADP بوده و در بسیاری از جنبه‌ها به سوئیچ GTP/GDP شباهت دارد.

همه پروتئین‌های تغییردهنده GTPآز به دو شکل یا ساختمان فضایی (شکل ۳۲ـ۳) وجود دارند:

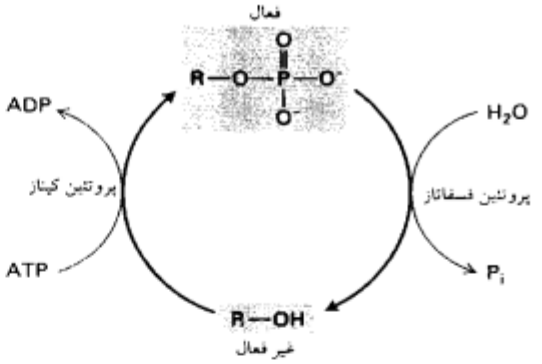
(۱) شکل فعال («روشن») که به GTP اتصال یافته و فعالیت پروتئین‌های هدف خاصی را تنظیم می‌کند. (۲) شکل غیرفعال («خاموش») که به GDP متصل می‌شود، این شکل از طریق



▲ **شکل ۳۲ـ۳ سوئیچ** GTPase. تبدیل فرم فعال یعنی GTPآز متصل به GTP به فرم غیرفعال از طریق هیدرولیز GTP انجام می‌گیرد. هیدرولیز GTP به وسیله پروتئین‌های فعال‌کننده GTPآز (GAPs) و تنظیم‌کننده‌های پیام‌دهی G پروتئین (RGSS) افزایش یافته و به وسیله مهارکننده‌های جدا شدن نوکلئوتید گوانین[4] (GDIS) مهار می‌شود. دوباره فعال‌سازی GTPآز از طریق تعویض GDP با GTP به وسیله فاکتورهای تعویض نوکلئوتید گوآنین[5] (GEFs) انجام می‌شود.

هیدرولیز نسبتاً آهسته GTP از شکل فعال ایجاد می‌گردد. مقدار زمان فعال بودن تغییردهنده GTPآز به سرعت فعالیت GTPآز آن وابسته است. بنابراین فعالیت GTPآز مثل یک زمان سنج این تغییر [در فعالیت GTPآز] را کنترل می‌کند. سلول‌ها پروتئین‌های مختلفی داشته و می‌تواند مقدار پایه فعالیت GTPآز را برای سوئیچ GTPآز تنظیم نمایند. به عنوان مثال، فعالیت GTPآز می‌تواند به وسیله پروتئین‌های فعال‌کننده GTPآز[6] تخصص یافته‌ای که GAPs نامیده می‌شوند، افزایش یافته و یا فعالیت GTPآز می‌تواند توسط پروتئین‌های دیگری که به عنوان تنظیم‌کننده‌های آلوستریک عمل می‌نمایند، کم شود. بعد از این که تغییر آلوستریک مرتفع شد (GTP هیدرولیز شد)، تغییر آلوستریکی دوباره می‌تواند توسط عامل تعویض‌کننده GTP[7] برگردد. این عامل GDP متصل شده را با مولکول‌های GTP محیط اطراف جایگزین می‌کند. بنابراین این سلول‌ها می‌توانند زمان و طول مدت باقیمانده تغییر آلوستریکی را تنظیم نمایند. ما نقش پروتئین‌های تغییردهنده GTPآز مختلف را

1- Calmodulin
2- Switch proteinss
3- GTPase super family
4- Guanine nucleotide dissociation inhibitors
5- Guanine nucleotide exchany factors
6- GTPase-activating proteins
7- Regulators



▲ **شکل ۳ـ۳۳ تنظیم فعالیت پروتئین با سوئیچ کیناز / فسفاتاز.** چرخه فسفریله و دفسفریله شدن پروتئین، مکانیسم سلولی متداولی در تنظیم فعالیت پروتئین است. در این مثال، پروتئین هدف R وقتی فسفریله می‌شود، فعال است (بالا) و در هنگام دفسفریله شدن، غیرفعال (پایین) است. بعضی پروتئین‌ها، پاسخ‌های متضادی به فسفریله شدن می‌دهند.

در تنظیم پیام‌رسانی درون سلولی و فرآیندهای دیگر در فصل‌های بعدی بررسی خواهیم کرد.

فسفریله و دفسفریله شدن، به‌طور کووالان فعالیت پروتئین را تنظیم می‌کند

یکی از متداول‌ترین مکانیسم‌های تنظیم فعالیت پروتئین، **فسفریله شدن**[1] است. در فسفریله شدن، گروه‌های فسفات به گروه‌های هیدروکسیل در روی ریشه‌های سرین، ترئونین یا تیروزین اضافه می‌شوند. پروتئین **کینازها** عمل فسفریله شدن و **فسفاتازها**، **دفسفریله شدن** را کاتالیز می‌کنند. اعمال متقابل کینازها و فسفاتازها سوئیچی را برای سلول فراهم می‌سازند تا بتواند عملکرد بسیاری از پروتئین‌ها را روشن یا خاموش کند (شکل ۳ـ۳۳). فسفریله شدن، بار پروتئین را تغییر داده و منجر به تغییر ساختمان فضایی می‌شود. این تأثیرات می‌تواند به‌طور چشم‌گیری اتصال لیگاند به پروتئین و یا سایر خصوصیات پروتئین را تغییر داده و در آخر باعث افزایش یا کاهش فعالیت آن شود.

تقریباً ۳ درصدِ کل پروتئین‌های مخمر، پروتئین کیناز یا فسفاتاز است که اهمیت واکنش‌های فسفریله و دفسفریله شدن را حتی در سلول‌های ساده نشان می‌دهد. همه خانواده‌های پروتئینی از جمله پروتئین‌های ساختاری، داربستی، آنزیم‌ها، کانال‌های غشایی و مولکول‌های ویژهٔ انتقال پیام، اعضایی دارند که با سوئیچ‌های کیناز / فسفاتاز تنظیم می‌شوند. پروتئین کیناز و فسفاتازهای مختلف برای پروتئین‌های هدف مختلف، اختصاصی بوده و بنابراین همان‌طوری که در فصل‌های بعدی توضیح داده شده، می‌توانند مسیرهای سلولی مختلفی را تنظیم کنند. بعضی از این آنزیم‌ها روی یک و یا تعداد محدودی از پروتئین‌های هدف عمل می‌کند، در حالی که بعضی دیگر هدف‌های زیادی دارند. کینازها و فسفاتازهایی که روی تعداد زیادی از پروتئین‌های هدف عمل می‌نمایند، در یکپارچه نمودن فعالیت پروتئین‌ها مفید می‌باشند و این آنزیم‌ها به طور هماهنگ به وسیله یک سوئیچ کیناز / فسفاتاز کنترل می‌شوند. اغلب، پروتئین‌های هدف کیناز (و فسفاتاز)، کیناز یا فسفاتازهای دیگری بوده و اثر آبشاری ایجاد می‌کند. مثال‌هایی بسیاری از چنین آبشارهای کینازی وجود دارد و امکان تشدید و کنترل دقیق را در بسیاری از سطوح می‌دهد.

برش پروتئولیزی به‌طور برگشت‌ناپذیری بعضی پروتئین‌ها را فعال یا مهار می‌کند

بر خلاف فسفریله شدن که برگشت‌پذیر است، فعال‌سازی یا غیرفعال‌سازی پروتئین از طریق برش پروتئولیزی مکانیسمی برگشت‌ناپذیر در تنظیم فعالیت پروتئین است. به عنوان مثال اغلب هورمون‌های پلی‌پپتیدی مثل انسولین به صورت پیش‌سازهای طویلی سنتز شده و قبل از ترشح شدن از سلول، بعضی از پیوندهای پپتیدی‌شان هیدرولیز می‌شود تا آنها به‌طور صحیحی تا بخورند. در بعضی موارد پیش هورمون یک پیش‌ساز طویل پلی‌پپتیدی بوده و می‌تواند به صورت چند هورمون متفاوت فعال، بریده شود. برای ممانعت از هضم نامناسب پروتئین‌ها قبل از رسیدن به روده کوچک، سرین پروتئازهای پانکراسی به صورت **زیموژن**[2] (پروتئین پیش‌ساز غیرفعال) سنتز می‌شوند. برش پیوند پپتیدی نزدیک انتهای N در تریپسینوژن (زیموژن تریپسین) به وسیله یک پروتئاز بسیار ویژه یافته در روده کوچک ریشه انتهای N جدیدی (ایزولوسین ۱۶) را ایجاد می‌کند که گروه آمینی آن می‌تواند با زنجیره جانبی اسید کربوکسیلیک از یک اسید آسپارتیک داخلی پیوند یونی ایجاد نماید. این عمل باعث تغییر ساختمان فضایی شده و در نهایت منجر به باز شدن جایگاه اتصال به سوبسترا و فعال شدن آنزیم می‌شود. سپس تریپسین فعال شده می‌تواند تریپسینوژن، کیموتریپسینوژن و زیموژن‌های دیگر را فعال کند. به‌طور مشابه اما پیچیده‌تر، آبشارهای پروتئازی (یک پروتئاز می‌تواند پیش‌سازهای غیرفعال پروتئازهای دیگر را فعال کند) که می‌توانند یک پیام را تشدید نمایند، نقش‌های مهمی در سیستم‌های مختلف همچون آبشار لخته شدن خون، دارند. اهمیت دقت در تنظیم چنین سیستم‌هایی واضح است. اگر لخته شدن

1- Phosphorylation 2- Zymogen

به‌طور نامناسب اتفاق افتد سیستم گردش خود مسدود می‌شود در حالی که لخته شدن ناکافی می‌تواند منجر به خونریزی غیرقابل کنترل شود.

یک نوع پردازش پروتئولیزی کمیاب و غیرمعمول که **خودپیرایش پروتئین**[1] نامیده می‌شود، در باکتری‌ها و بعضی یوکاریوت‌ها اتفاق می‌افتد. این فرآیند شبیه به ویرایش فیلم است: یک قطعه داخلی از پلی‌پپتید برداشته و انتهای‌های پلی‌پپتیدی به هم می‌پیوندند (متصل می‌شوند). بر خلاف سایر اشکال پردازش پروتئولیزی، خودپیرایش پروتئین فرآیندی اتوکاتالیزی است که در آن پروتئین، بدون مشارکت آنزیم‌های دیگر پردازش می‌شود. مشخص شده، پپتید برش یافته، خود را مشابه مکانیسم مورد استفاده در پیرایش بعضی از مولکول‌ها همچون RNA، از پروتئین خارج می‌سازد (فصل ۸). در سلول‌های مهره‌داران، پردازش بعضی از پروتئین‌ها شامل خود ـ برش است اما مرحله متصل شدن [قطعات پروتئینی] وجود ندارد. هجهوگ[2] یکی از این پروتئین‌ها است. هجحوک مولکول پیام‌رسان متصل به غشاء می‌باشد که برای شماری از فرآیندهای رشد و نمو ضروری است.

سطح بالاتر تنظیم شامل کنترل موقعیت و غلظت پروتئین است

همه مکانیسم‌هایی که تاکنون مورد بحث قرار دادیم، پروتئین را به‌طور موضعی در جایگاه عمل خود تحت تأثیر قرار داده و فعالیتش را روشن یا خاموش می‌کردند. با این حال عملکرد طبیعی سلول نیاز دارد تا پروتئین‌ها به اندامک‌هایی هم‌چون میتوکندری، هسته و لیزوزوم‌ها تقسیم شوند. در مورد آنزیم‌ها، تقسیم آنها به اندامک‌ها فرصتی را فراهم می‌کند تا رساندن سوبسترا و خارج نمودن محصول، کنترل شود و همچنین امکان می‌دهد تا واکنش‌هایی که با هم رقابت می‌کنند به‌طور همزمان در قسمت‌های مختلف سلول، انجام شوند. با مکانیسم‌های مورد استفاده سلول برای هدایت پروتئین‌های متفاوت به اندامک‌های مختلف، در فصل‌های ۱۲ و ۱۳ آشنا خواهیم شد.

نکات کلیدی بخش ۳.۵

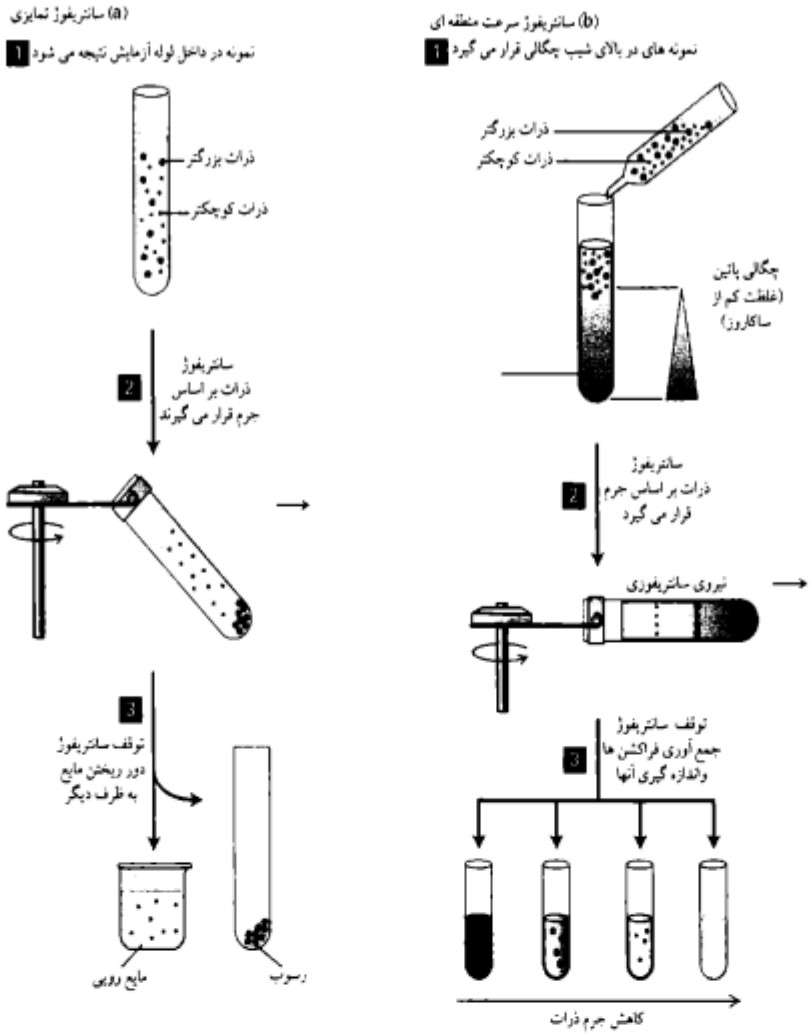
تنظیم پروتئین II: تغییرات کووالان و غیرکووالان

- در آلوستری اتصال غیرکووالان لیگاند (عامل آلوستریک) تغییر ساختمان فضایی را القاء می‌کند که فعالیت با تمایل پروتئین را به لیگاندهای دیگر تغییر می‌دهد. ساختمان فضایی آلوستریک می‌تواند از لحاظ ساختاری مشابه یا متفاوت از لیگاندهایی باشد که اتصال آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عامل آلوستریک می‌تواند سوبسترا فعال‌کننده یا مهارکننده باشد.
- در پروتئین‌های چندزیرواحدی همچون هموگلوبین که به چند مولکول لیگاند یکسان متصل می‌شوند (همچون اکسیژن)،اتصال یک مولکول لیگاند ممکن است تمایل اتصال را برای مولکلول‌های لیگاند بعدی افزایش یا کاهش دهد این نوع آلوستری به عنوان اثر تعاونی شناخته می‌شود.
- مکانیسم‌های آلوستریک مختلف به عنوان سوئیچ و به صورت برگشت‌پذیر فعالیت پروتئین را خاموش یا روشن می‌کنند.
- دو خانوادهٔ پروتئین‌های سوئیچ داخل سلولی فرآیندهای سلولی متفاوتی را تنظیم می‌کنند. (۱) پروتئین‌های متصل شونده به Ca^{2+} (همچون کالمودولین) و (۲) اعضای ابرخانواده GTPآز (همچون Ras) که دارای شکل متصل به GTP فعال و شکل متصل به GDP غیرفعال هستند (شکل ۳-۳۳ را ملاحظه کنید).
- فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون گروههای هیدروکسیل در زنجیره‌های جانبی رزیدودهای سرین، توئونین یا تیروزین یا پروتئین کینازها و فسفاتازها، فعال یا غیرفعال شدن شمار زیادی از پروتئین‌ها را تنظیم می‌کند.
- انواع زیادی از تنظیمات کووالان و غیرکووالان برگشت‌پذیر هستند اما بعضی از اشکال تنظیم همچون برش پروتئولیزی، برگشت‌پذیر نیستند.
- تنظیم در سطح بالاتر شامل تقسیم‌بندی پروتئین‌های و کنترل غلظت پروتیئن است.

۳ـ۶ خالص‌سازی، شناسایی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها

قبل از مطالعه مکانیسم عمل و ساختار یک پروتئین، بایستی آن را خالص نمود. چون پروتئین‌ها از لحاظ اندازه، بار و حلالیت در آب متفاوتند، روش خاصی برای جدا نمودن همه پروتئین‌ها وجود ندارد. جداسازی یک پروتئین خاص از بین ۱۰۰۰۰ پروتئین در یک نوع سلول، کار سنگینی بوده و به روش‌های مختلفی هم برای جداسازی پروتئین‌ها و هم برای شناسایی وجود پروتئین‌های خاص نیاز دارد. هر مولکولی اعم از پروتئین، کربوهیدرات یا اسید نوکلئیک را می‌توان

1- Protein self-spliciny 2- Hedgehog



▲ **شکل تجربی ۳۴ـ۳ تکنیک‌های سانتریفوژ ذرات را براساس تفاوت در جرم یا چگالی جدا می‌کنند.** a) در سانتریفوژ افتراقی، عصاره سلولی یا مخلوط‌های دیگر به قدری سانتریفوژ می‌شوند تا ذرات بزرگ‌تر (هم‌چون اندامک‌های سلولی سلول‌ها) ته‌نشین شده و به صورت رسوب در ته لوله آزمایش جمع شوند (مرحله ❷). ذرات کوچک‌تر (هم‌چون پروتئین‌های محلول، اسیدهای نوکلئیک) در مایع رویی مانده و می‌توان آنها را به لوله آزمایش دیگر منتقل کرد (مرحله ❸). b) در سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای، مخلوط به قدری سانتریفوژ می‌شود تا مولکول‌هایی که جرم مختلف اما احتمالاً شکل و چگالی مشابهی دارند (هم‌چون پروتئین‌های کروی ، مولکول‌های RNA) به صورت مناطق جداگانه‌ای در شیب چگالی حاصل از محلول ساکارز غلیظ، جدا شوند. این مناطق از ته لوله آزمایش برداشته شده و آزمایش می‌شوند.

براساس تفاوت در یک یا چند خصوصیت شیمیایی و فیزیکی جدا نمود. هر اندازه تفاوت بین دو پروتئین زیاد باشد، جداسازی‌شان آسان‌تر و مؤثرتر خواهد بود. دو خصوصیت عمده‌ای که به‌طور گسترده برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده می‌شود، **اندازه** (با طول و جرم مولکول تعیین می‌شود) و تمایل اتصال به یک لیگاند خاص است. در این قسمت به‌طور خلاصه تکنیک‌های مهم مختلفی را برای جداسازی پروتئین‌ها بررسی می‌کنیم. این تکنیک‌های جداسازی را می‌توان برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول‌های زیستی به کار برد. (روش‌های تخصص‌یافته جهت برداشتن پروتئین‌های غشایی از غشاء در فصل ۱۰ بعد از بررسی خصوصیات استثنایی این پروتئین‌ها، توضیح داده شده‌اند). سپس استفاده از ترکیبات رادیواکتیو را در جهت پیگیری فعالیت زیستی، مورد توجه قرار می‌دهیم. در آخر تکنیک‌های مختلفی را که برای تشخیص جرم، توالی و ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، بررسی می‌کنیم.

سانتریفوژ می‌تواند ذرات و مولکول‌هایی را که جرم یا چگالی متفاوتی دارند، جدا کند

مرحله اول در خالص‌سازی پروتئین، سانتریفوژ است. مبنای سانتریفوژ این است که دو ذره متفاوت از لحاظ جرم یا چگالی در حالت معلق (سلول‌ها، قطعات سلولی، اندامک‌ها یا مولکول‌ها) با سرعت متفاوتی در ته لوله آزمایش ته‌نشین می‌شوند. اینجا باید متذکر شد که جرم، وزن نمونه (باگرم اندازه‌گیری می‌شود) و چگالی، نسبت وزن به حجم (گرم بر لیتر) است. پروتئین‌ها به‌طور چشم‌گیری از لحاظ جرم با هم متفاوتند اما از لحاظ چگالی تفاوت چندانی ندارند. اگر به یک پروتئین، لیپید یا کربوهیدرات متصل شده باشد، چگالی بیش از ۱۵ درصد از $1/37 g/cm^3$ (چگالی متوسط پروتئین) تغییر نخواهد کرد. مولکول‌های سنگین‌تر یا با چگالی بالاتر سریع‌تر از مولکول‌های سبک و یا با چگالی پایین‌تر ته‌نشین خواهند شد. سانتریفوژ سرعت رسوب ذرات را با اعمال نیروی سانتریفوژی به بزرگی ۱۰۰۰۰۰۰ برابر نیروی گرانشی زمین افزایش داده و می‌تواند ذراتی به کوچکی ۱۰ کیلودالتون را نیز رسوب دهد. اولتراسانتریفوژهای مدرن با رسیدن به سرعت ۱۵۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) یا بیشتر به این نیروی سانتریفوژی می‌رسند. با این حال ذرات کوچک با جرم ۵ کیلودالتون حتی در چنین سرعت‌های بالایی به طوری یکدست ته‌نشین نمی‌شوند.

سانتریفوژ برای دو هدف اصلی استفاده می‌شود: (۱) به صورت تکنیک فراهم‌آورنده جهت جداسازی یک ماده از مواد دیگر و ۲ـ به صورت یک تکنیک آنالیزی جهت اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی (از قبیل وزن مولکولی، چگالی، شکل و ثابت تعادل اتصال) ماکرومولکول‌ها. ثابت سرعت رسوب یعنی S یک پروتئین، معیاری از سرعت رسوب آن است. ثابت سرعت به‌طور متداول، سودبرگ (S) گفته می‌شود، به عنوان مثال کمپلکس پروتئینی بزرگ در حدود S ۳.۵ است در حالیکه ریبوزوم یوکاریوتی ۸۰S است.

سانتریفوژ افتراقی: مرحله اول متداول در تخلیص پروتئین است. در سانتریفوژ افتراقی[1] پروتئین‌های محلول در آب سلول‌ها و بافت‌ها از مواد نامحلول سلولی جدا می‌شوند. مخلوطی که برای سانتریفوژ استفاده می‌شود، معمولاً عصاره سلولی (سلول‌هایی که شکسته‌اند) بوده و به داخل لوله آزمایش ریخته شده و به مدت مشخصی سانتریفوژ می‌شوند. طی این عمل به اندامک‌های سلول همچون هسته، سلول‌های شکسته نشده، یا قطعات سلولی نیرو وارد می‌شود تا به صورت رسوب در ته لوله جمع شوند. پروتئین‌های محلول در مایع رویی (شکل a ۳ـ۳۴) باقی می‌مانند. مایع رویی سپس برداشته می‌شود. در این حالت از رسوب سلولی یا مایع رویی را می‌توان جدا نموده و با استفاده از روش‌های تخلیص دیگر پروتئین‌های مختلف موجود در آنها را جدا نمود.

سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای : در این روش پروتئین‌ها در محلولی قرار می‌گیرند که چگالی محلول در طول لوله آزمایش افزایش می‌یابد. این افزایش چگالی، **شیب چگالی**[2] نامیده می‌شود. پروتئین‌ها در شیب چگالی می‌توانند به وسیله سانتریفوژ براساس تفاوت جرم‌شان جدا شوند. معمولاً از یک محلول ساکارز غلیظ برای تشکیل شیب غلظت استفاده می‌شود. وقتی مخلوط پروتئینی در بالای شیب ساکاروز در لوله آزمایش قرار گرفته و سانتریفوژ شود، هر پروتئین موجود در مخلوط، با سرعت خاصی به ته لوله مهاجرت می‌کند. سرعت مهاجرت به ته لوله با عوامل متأثر از ثابت ته‌نشینی مرتبط است. مهاجرت همه پروتئین‌ها از منطقه نازکی در بالای لوله آزمایش شروع شده و به صورت نوارها یا مناطقی (به صورت دیسک‌هایی) از پروتئین‌هایی با جرم‌های متفاوت، جدا می‌شوند. در این تکنیک جداسازی که سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای نامیده می‌شود، سانتریفوژ تا زمانی انجام گردد تا مولکول‌های مورد نظر به صورت مناطق جداگانه‌ای جدا شوند (شکل b ۳ـ۳۴). اگر نمونه به مدت خیلی کمی سانتریفوژ شود، مولکول‌های مختلف پروتئین به اندازه کافی جدا نخواهند شد. اگر نمونه بیش از حد مورد نیاز سانتریفوژ شود، همه پروتئین‌ها به صورت رسوب در ته لوله جمع خواهند شد. گرچه سرعت ته‌نشینی شدیداً به وسیله جرم ذره تحت تأثیر قرار می‌گیرد، با این حال سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای در تعیین دقیق وزن مولکولی کارایی کمی دارد زیرا تغییر شکل مولکول نیز در این سانتریفوژ، سرعت ته‌نشینی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اندازه‌گیری تأثیر شکل در سانتریفوژ، مخصوصاً برای پروتئین‌ها یا مولکول‌های دیگری همچون مولکول‌های اسید نوکلئیک تک رشته‌ای که می‌توانند اشکال پیچیده‌ای به خود بگیرند، سخت است. با وجود این، سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای، روش عملی برای جداسازی انواع مختلفی از پلیمرها و ذرات می‌باشد. تکنیک دوم در شیب ـ چگالی، **سانتریفوژ شیب ـ چگالی تعادلی**[3] نامیده می‌شود و اغلب برای جداسازی DNA، لیپوپروتئین‌های حامل لیپید در سیستم گردش خود و اندامک‌ها (شکل ۲۶ـ۹ را ملاحظه کنید) به کار می‌رود.

1-Differential centrifugation

2- Density gradient

3- Equilibrium density-gradient centrifugation

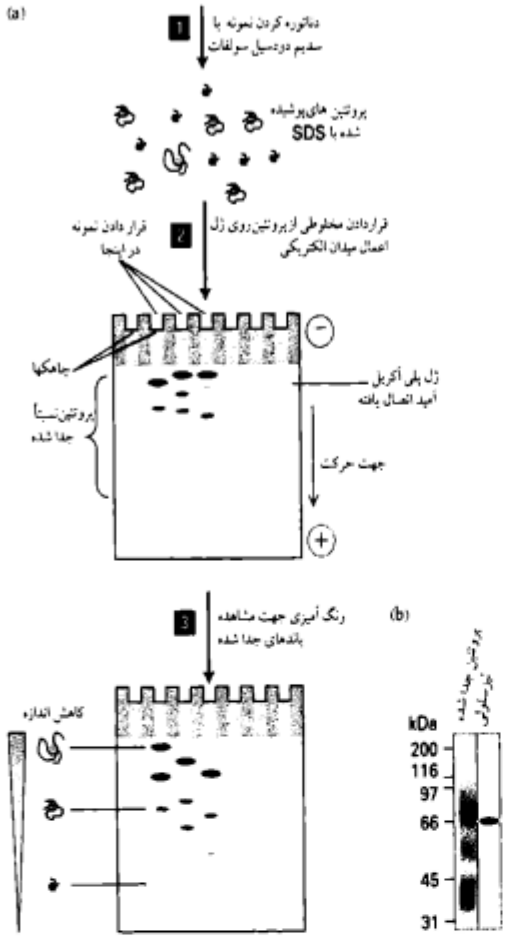
الکتروفورز مولکول‌ها را براساس نسبت بار به جرم‌شان جدا می‌کند

الکتروفورز[1] تکنیکی است که مخلوطی از مولکول‌ها را با ایجاد میدان الکتریکی از هم جدا می‌کند. الکتروفورز به‌طور گسترده‌ای جهت مطالعه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود. مولکول‌های محلول در یک زمینه الکتریکی با سرعت خاصی حرکت یا مهاجرت می‌کنند. سرعت حرکت مولکول‌ها را نسبت بار به جرم آنها تعیین می‌کند. به عنوان مثال اگر دو مولکول، جرم و شکل مشابهی داشته باشند، مولکولی که بار بیشتری دارد به طرف الکترود مخالف با سرعت بیشتری حرکت می‌کند.

الکتروفورز ژل SDS ـ آکریل‌آمید: چون اغلب پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک که از لحاظ اندازه و شکل متفاوت هستند تقریباً نسبت بار به جرم یکسانی دارند، با الکتروفورز این ماکرومولکول‌ها، مولکول‌های با طول متفاوت یا از هم جدا نمی‌شوند و یا به مقدار خیلی کمی جدا می‌شوند. جداسازی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به وسیله الکتروفورز در ژل‌های مختلف (سوسپانسیون‌های نیمه جامد در آب مشابه ژلاتین موجود در سرها) موفقیت‌آمیزتر از الکتروفورز در محلول مایع است. جداسازی الکتروفورزی به‌طور متداول در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید انجام می‌شود. وقتی مخلوطی از پروتئین‌ها در ژل قرار گرفته و جریان الکتریکی برقرار شد، پروتئین‌های کوچک‌تر سریع‌تر از پروتئین‌های بزرگ‌تر در ژل حرکت می‌کنند زیرا ژل به عنوان یک غربال عمل نموده و مولکول‌های کوچک سریع‌تر از مولکول‌های بزرگ از منافذ ژل عبور می‌کنند. شکل مولکول نیز می‌تواند سرعت مهاجرت را تحت تأثیر قرار دهد (مولکول‌های نامتقارن طویل آهسته‌تر از مولکول‌های کروی با جرم مشابه مهاجرت می‌کنند).

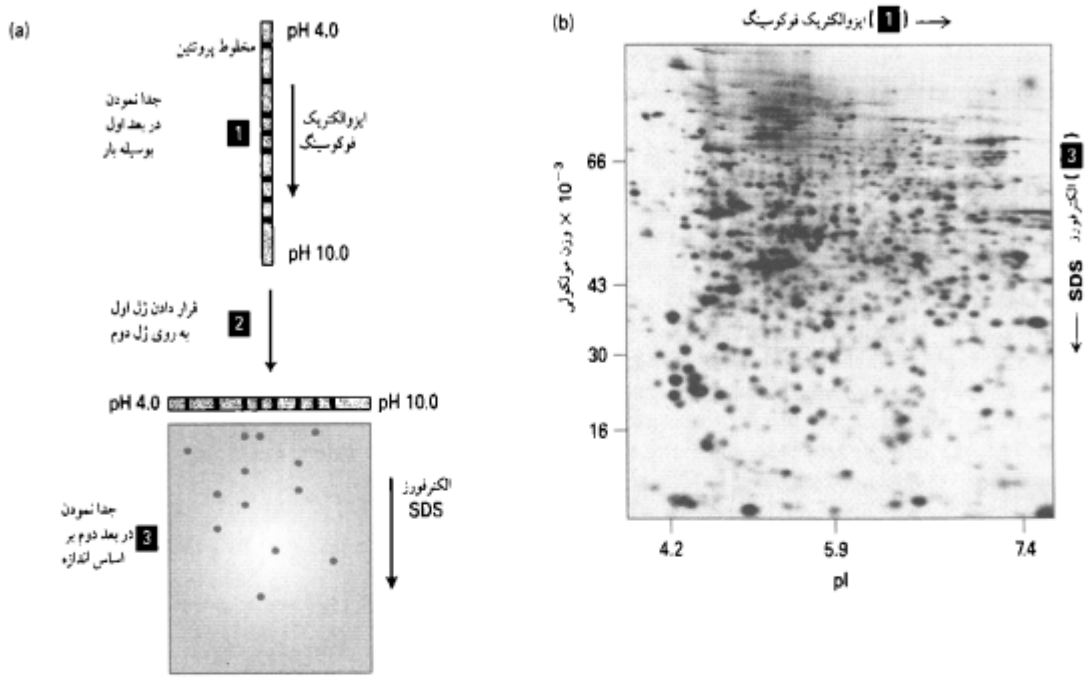
ژل‌ها با پلیمریزه شدن محلول مونومرهای آکریل‌آمید به رشته‌های پلی‌آکریل‌آمید بین یک جفت صفحه شیشه‌ای قالب‌بندی می‌شوند. همزمان با پلیمریزه شدن رشته‌های پلی‌آکریل‌آمید، این رشته‌ها در زمینه نیمه جامد به هم متصل می‌شوند. اندازه، منافذ ژل را می‌توان با تنظیم غلظت پلی‌آکریل‌آمید و مواد اتصال‌دهنده، تغییر داد. سرعت حرکت پروتئین در ژل تحت تأثیر اندازه منافذ ژل و قدرت الکتریکی است. با تنظیم مناسب این عوامل، پروتئین‌هایی با اندازه‌های کاملاً متنوع می‌توانند با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE) از هم دیگر جدا شوند.

در تکنیک بسیار قدرتمندی که پروتئین‌ها را از هم جدا می‌کند، پروتئین‌ها قبل از الکتروفورز و در حین آن در معرض دترجنت یونی



▲ **شکل تجربی ۳.۳۵ الکتروفورز ژل SDS ـ آکریل‌آمید (SDS-PAGE) پروتئین‌ها را براساس جرم‌شان جدا می‌کند.** a) تیمار با SDS (دترجنت با بار منفی) پروتئین‌های چندزیرواحدی را تجزیه نموده و همه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی را دناتوره می‌کند (مرحله ❶). در الکتروفورز، کمپلکس‌های SDS ـ پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید مهاجرت می‌کنند (مرحله ❷). کمپلکس‌های کوچک‌تر قادرند سریع‌تر از کمپلکس‌های بزرگ‌تر از منافذ عبور کنند. بنابراین پروتئین‌ها به موازات مهاجرت در ژل، باندهایی را براساس اندازه‌شان تشکیل می‌دهند. باندهای پروتئین جدا شده به وسیله رنگ‌آمیزی با یک رنگ دیده می‌شوند (مرحله ❸). b) مثالی از جداسازی SDS-PAGE برای همه پروتئین‌های موجود در سلول لیز شده (سلول‌های حل شده با دترجنت): (چپ) پروتئین‌های جدا شده و رنگ‌آمیزی شده تقریباً به صورت پیوسته مشخص هستند. (راست) پروتئین خالص شده یا کروماتوگرافی تمایل به آنتی‌بادی. پروتئین‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی با رنگ نقره مشاهده می‌شوند.

1- Electrophoresis



▲ **شکل تجربی ۳۶-۳ الکتروفورز ژل دوبعدی، پروتئین‌ها را براساس بار و جرم از هم جدا می‌کند.** a) در این تکنیک، پروتئین‌ها در اول با ایزوالکتریک فوکوسینگ و براساس بارهایشان جدا می‌شوند (مرحله ❶). نوار ژل حاصل بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید SDS گذاشته شده (مرحله ❷) و پروتئین‌ها براساس جرمشان به صورت لکه‌هایی از هم جدا می‌شوند (مرحله ❸). b) در این ژل دوبعدی از عصاره پروتئین سلول‌های کشت داده شده، هر لکه، یک پلی‌پپتید است. پلی‌پپتیدها را می‌توان با رنگ (اینجا) یا با تکنیک‌های دیگر نظیر اتورادیوگرافی تشخیص داد. هر پلی‌پپتید با نقطه ایزوالکتریک (pI) و وزن مولکولی‌اش شناخته می‌شود.

SDS (سدیم دودسیل سولفات[1]) قرار می‌گیرند. SDS به زنجیره‌های جانبی آبگریز در پروتئین‌ها متصل شده و میانکنش‌های آبگریزی راکه باعث پایداری آن می‌شوند، از بین برده و باعث دناتوره شدن پروتئین می‌شود. (تیمار با SDS معمولاً همراه با گرم کردن نمونه در حضور یک ماده احیاءکننده صورت می‌گیرد. عامل احیاءکننده، پیوندهای دی‌سولفیدی را می‌شکند). در نتیجه، پروتئین‌های چند زیرواحد به زیر واحدهای سازنده‌شان تجزیه شده و به ساختمان فضایی باز همه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی با نسبت بار به جرم مشابه نیرو وارد می‌شود.

تیمار با SDS، تفاوت‌های شکل در ساختارهای طبیعی را کاهش داده و بنابراین طول زنجیره پلی‌پپتیدی که به جرم آن بستگی دارد، سرعت مهاجرت پروتئین‌ها را در **الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید SDS** (SDS-PAGE) تعیین می‌کند. حتی زنجیره‌هایی که کم‌تر از ۱۰ درصد وزن مولکولی‌شان با هم اختلاف دارند، با این تکنیک جدا می‌شوند. علاوه بر این، وزن مولکولی یک پروتئین را می‌توان با مقایسه فاصله پیموده شده توسط آن در ژل با فاصله پیموده شده پروتئینی با وزن مولکولی مشخص (ارتباط خطی بین فاصله مهاجرت و لگاریتم وزن مولکولی وجود دارد) تخمین زد. پروتئین‌هایی در درون ژل را می‌توان برای تجزیه و تحلیل بیشتر (همچون برای شناسایی با روش‌های توضیح داده شده در این فصل) از ژل جدا نمود.

الکتروفورز ژل دوبعدی: الکتروفورز پروتئین‌های سلولی با SDS-PAGE می‌تواند پروتئین‌هایی را که اختلاف نسبتاً زیادی در جرم دارند، را از هم جدا نماید اما قادر به جداکردن پروتئین‌هایی با وزن مولکولی مشابه نیست (مثلاً جداکردن پروتئین ۴۱ کیلودالتونی از پروتئین ۴۲ کیلودالتونی). برای جدا نمودن پروتئین‌های با جرم مشابه، بایستی از یک خصوصیت فیزیکی دیگر استفاده شود. این

1- Sodium dodecyl sulfate

خصوصیت فیزیکی اغلب، بار الکتریکی است. بار الکتریکی با pH و تعداد نسبی اسیدهای آمینه با بار مثبت و منفی در پروتئین تعیین می‌شود. بار اسیدهای آمینه هم وابسته به pKa گروه‌های قابل یونیزه می‌باشد (فصل ۲ را ملاحظه کنید). دو پروتئین غیرمرتبط با جرم‌های مشابه، بعید است. بار یکسانی داشته باشند، چون توالی آنها و بنابراین تعداد ریشه‌های اسیدی و بازی آنها متفاوت است.

در الکتروفورز دوبعدی، پروتئین‌ها اول براساس بار و سپس براساس جرم‌شان (شکل a ۳ـ۳۶) جدا می‌شوند. در مرحله اول، عصاره سلولی یا بافتی با غلظت بالای اوره (۸ مولار) دناتوره شده و سپس روی نوار ژلی با شیب پیوستهٔ pH قرار می‌گیرد. در این مرحله نمی‌توان از SDS استفاده کرد، زیرا با اتصال به پروتئین‌ها، بار آنها را تغییر می‌دهد. شیب pH به وسیله آمفولین‌ها (مخلوطی از مولکول‌های پلی‌آنیونیک و پلی‌کاتیونیک) در درون ژل تشکیل می‌شود. آمفولین‌های اسیدی در یک انتها و آمفولین‌های بازی در انتهای دیگر قرار می‌گیرند. یک پروتئین باردار تا حدی در ژل حرکت خواهد کرد که به **نقطه ایزوالکتریک**[1] (pI) خود برسد. نقطه ایزوالکتریک pHی است که در آن بار خالص پروتئین صفر است. این تکنیک **ایزوالکتریک فوکوسینگ**[2] (IEF) نامیده شده و می‌تواند پروتئین‌هایی راکه حتی یک واحد بار اختلاف دارند، جداکند. سپس پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل IEF را می‌توان در بعد دوم براساس وزن مولکولی‌شان جدا نمود. برای این جداسازی، نوار ژل IEF به‌طور افقی بر روی لبه بالایی ژل صفحه‌ای شکل پلی‌آکریل‌آمید (دوبعدی) قرار داده شده و با SDS اشباع می‌شود. در این هنگام اگر میدان الکتریکی برقرار گردد، پروتئین‌ها از ژل IEF به ژل SDS منتقل شده و سپس براساس جرمشان از هم جدا می‌شوند.

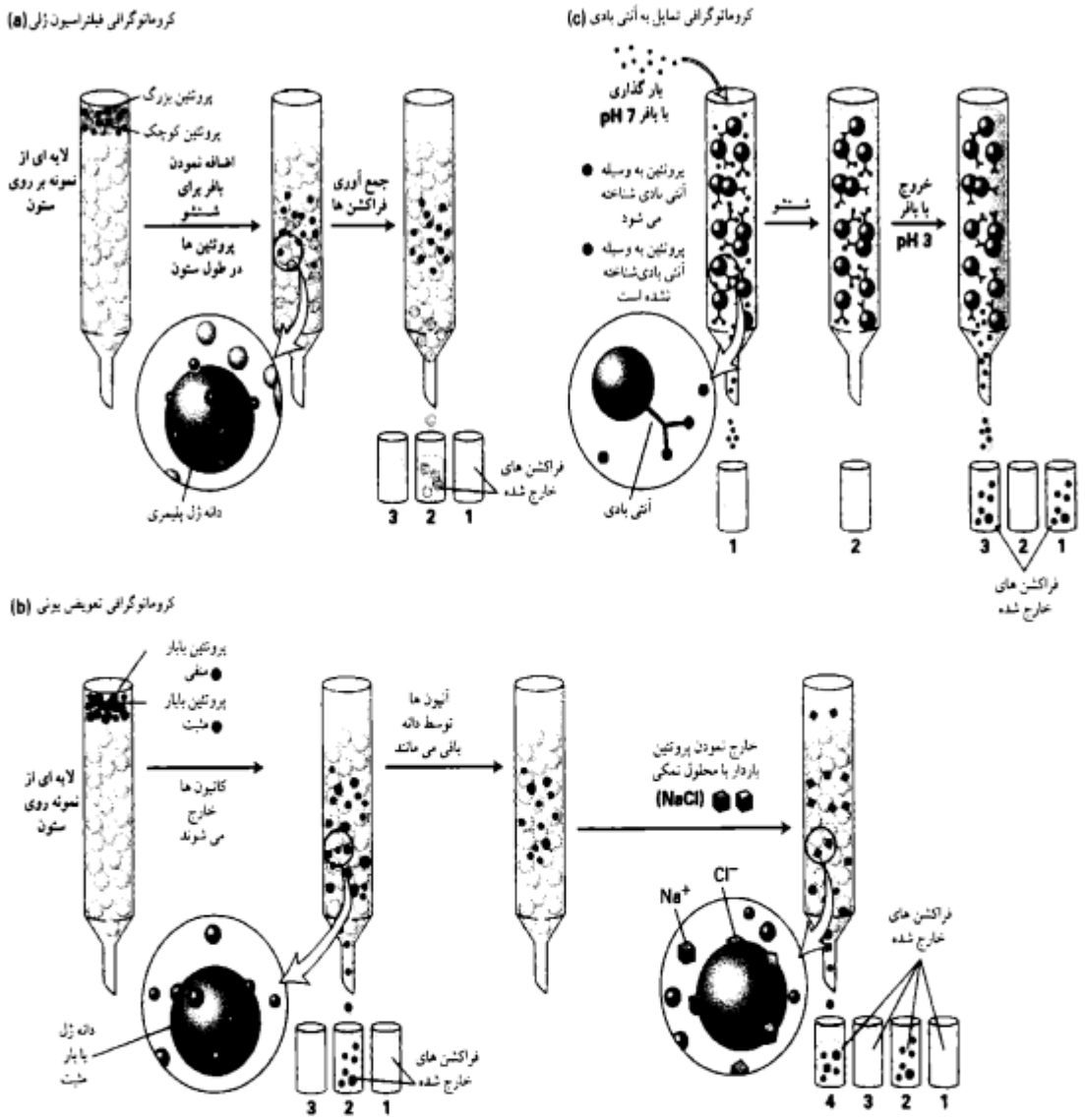
تفکیک پشت سرهم پروتئین‌ها براساس بار و جرم باعث می‌شود تا پروتئین‌های سلولی به‌طور بی‌نظیری از هم جدا شوند (شکل b ۳ـ۳۶). به عنوان مثال، ژل‌های دوبعدی برای مقایسه پروتئوم بین سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته و یا سلول‌های سرطانی و طبیعی بسیار سودمند هستند چون به‌طور همزمان ۱۰۰۰ پروتئین می‌تواند به صورت لکه‌هایی از هم جدا شوند. روش‌های پیشرفته‌ای گسترش یافته و امکان می‌دهند تا الگوهای پیچیده پروتئین‌ها را در ژل‌های دوبعدی حاصل از نمونه‌های مرتبط اما متفاوت (مثلاً بافت طبیعی و بافت جهش یافته) مقایسه نموده و تفاوت‌های ایجاد شده در نوع و مقدار پروتئین‌ها را در نمونه‌ها شناسایی کرد (قسمت پروتئومیکس را ملاحظه کنید).

کروماتوگرافی مایع، پروتئین‌ها را براساس جرم، بار یا تمایل اتصالی جدا می‌کند

تکنیک متداول سوم برای جداسازی مخلوطی از پروتئین‌ها یا قطعاتی از پروتئین‌ها و همچنین مولکول‌های دیگر، بر این اساس استوار است که مولکول‌های حل شده در محلول به‌طور متفاوتی با سطح جامد خاصی میانکنش (اتصال و جدا شدن) می‌دهند. این میانکنش به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مولکول و سطح بستگی دارد. اگر محلولی از میان سطحی جریان یابد، مولکول‌هایی که بیشتر با سطح میانکنش می‌دهند، مدت زیادی را به صورت متصل به سطح باقی مانده و آهسته‌تر از مولکول‌هایی که میانکش کمی با سطح دارند، خارج می‌شوند. این تکنیک، **کروماتوگرافی مایع**[3] (LC) نامیده شده و در آن نمونه در بالای ستونی شدیداً فشرده از دانه‌های کروی قرار می‌گیرد. این ستون در درون استوانه شیشه‌ای یا پلاستیکی نگه داشته می‌شود. نمونه سپس به طرف پایین ستون معمولاً توسط نیروی جاذبه یا هیدرواستاتیک و یا باکمک پمپ جریان می‌یابد. مایع خارج شده از ستون به صورت مقادیر کمی که جزء خروجی[4] نامیده می‌شود، به صورت پشت سر هم جمع‌آوری شده و جهت بررسی در مورد وجود پروتئین مورد نظر تحت بررسی قرار می‌گیرد. طبیعت دانه‌ها در ستون تعیین می‌کنند، که جداسازی پروتئین وابسته به اختلاف جرم، بار یا تمایل اتصالی باشد.

کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی: پروتئین‌ها با جرم متفاوت می‌توانند با استفاده از ستون‌های ساخته شده از پلی‌آکریل‌آمید، دکستران (پلی‌ساکارید باکتریایی) یا آگارز (حاصل از جلبک دریایی) از هم جدا شوند. این تکنیک کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی نامیده می‌شود. گرچه پروتئین‌ها در کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی اطراف دانه‌های کروی جریان می‌یابد، آنها گهگاهی وارد حفرات موجود در دانه‌ها می‌شوند. پروتئین‌های کوچک‌تر راحت‌تر از پروتئین‌های بزرگ‌تر می‌توانند وارد حفرات دانه‌ها شوند، بنابراین پروتئین‌های کوچک‌تر در طول ستون فیلتراسیون ژلی آهسته‌تر از پروتئین‌های بزرگ حرکت می‌کنند (شکل a ۳ـ۳۷)، (در الکتروفورز، پروتئین‌ها از منافذ موجود در ژل الکتروفورز حرکت می‌کنند، بنابراین پروتئین‌هایی کوچک‌تر، سریع‌تر از پروتئین‌های بزرگ حرکت می‌کنند). حجم مایع مورد نیاز جهت خارج نمودن (یا جدا کردن و

1- Isoelectric Point 2- Isoelectric focusing
3- Liquid chromatography
4- Fraction



▲**شکل تجربی ۳ـ۳۷ سه تکنیک مورد استفاده از کروماتوگرافی مایع که پروتئین‌ها را براساس جرم، بار و یا تمایل به یک مولکول خاص، جدا می‌کنند.** a) کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی پروتئین‌هایی را که از لحاظ اندازه با هم تفاوت دارند، جدا می‌کند. مخلوطی از پروتئین‌ها به دقت در بالای ستونی فشرده از دانه‌های منفذدار، قرار داده می‌شود. پروتئین‌های کوچک‌تر خیلی آهسته‌تر از مولکول‌های بزرگ در ستون حرکت می‌کنند. بنابراین پروتئین‌های متفاوت در زمان‌های متفاوتی از ستون خارج شده (حجم‌های خروج متفاوت) و در لوله‌های آزمایش جداگانه‌ای که **جزء خروجی** نامیده می‌شوند، جمع‌آوری می‌گردند. b) کروماتوگرافی تعویض یونی، پروتئین‌های متفاوت از لحاظ بار را در ستون فشرده‌ای از دانه‌های حامل بار مثبت (نشان داده شده در اینجا) یا بار منفی از هم جدا می‌کند. پروتئین‌های دارای بار مشابه با بار دانه‌ها، دفع شده و از ستون عبور می‌کنند در حالیکه پروتئین‌هایی با بار مخالف با دانه‌ها به‌طور محکم و یا سست متصل می‌شوند. قدرت اتصال به ساختار پروتئین‌ها بستگی دارد. پروتئین‌های متصل شده (در اینجا، پروتئین‌های با بار منفی) با برقرار نمودن شیب غلظت نمکی (معمولاً NaCl یا KCl) از ستون خارج می‌شوند. به موازات اتصال یون‌ها به دانه‌ها، آنها پروتئین‌ها را جدا می‌کنند (پروتئین‌هایی که به‌طور محکم به ستون اتصال یافته‌اند به غلظت نمکی بالاتری جهت آزاد شدن از ستون نیاز دارند). c) در کروماتوگرافی و تمایل به آنتی‌بادی، مخلوطی از پروتئین‌ها از ستون فشرده شده از دانه‌های حاوی یک آنتی‌بادی خاص عبور داده می‌شوند (آنتی‌بادی به‌طور کووالان به دانه‌ها متصل شده است). فقط پروتئین‌هایی در ستون باقی می‌مانند که تمایل شدیدی به آنتی‌بادی داشته باشند و پروتئین‌های اتصال نیافته از ستون عبور می‌کنند. بعد از شست‌وشوی ستون، پروتئین‌های اتصال یافته با محلول اسیدی یا محلول مشابه دیگری خارج می‌شوند. این محلول‌ها کمپلکس‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن را از بین می‌برند. پروتئین آزاد شده سپس از ستون خارج شده و جمع‌آوری می‌گردد.

برداشتن) یک پروتئین از ستون فیلتراسیون ژلی به جرم آن بستگی دارد. هر اندازه جرم کوچک‌تر باشد، مدت زمان بیشتری در حفرات دانه‌ها به دام افتاده و در نتیجه به حجم زیادی مایع نیاز دارد که خارج شود. با استفاده از پروتئین‌هایی با جرم مشخص به عنوان استاندارد جهت کالیبره نمودن ستون، از روی حجمی که پروتئین خارج می‌شود، می‌توان جرم یک پروتئین را تخمین زد. شکل پروتئین نیز مثل جرمش می‌تواند حجم خروج پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد.

کروماتوگرافی تعویض یونی: در کروماتوگرافی تعویض یونی (نوع دوم از کروماتوگرافی مایع) پروتئین‌ها براساس تفاوت در بارشان جدا می‌شوند. در این تکنیک از دانه‌هایی استفاده می‌شود که سطح‌شان با گروه‌های آمینی یا کربوکسیل پوشیده شده و بنابراین در pH خنثی یا دارای بار مثبت (NH_3^+) و یا دارای بار منفی (COO^-) هستند.

پروتئین‌ها در مخلوطی با pH خاص، بارهای خالص متنوعی دارند. هنگامی که مخلوط پروتئینی از ستونی با دانه‌های حاوی بار مثبت جریان یابد، فقط پروتئین‌هایی با بار خالص منفی (پروتئین‌های اسیدی) به دانه‌ها چسبیده و پروتئین‌های با بار مثبت (بازی) و خنثی بدون هیچ ممانعتی از ستون عبور می‌کنند (شکل b ۳ـ۳۷). پروتئین‌های اسیدی سپس با عبور دادن محلولی که غلظت نمکی‌اش رو به افزایش است (شیب نمکی)، به‌طور انتخابی از ستون خارج می‌شوند. در غلظت‌های پایین نمک، مولکول‌های پروتئین و دانه‌ها با بارهای مخالف‌شان همدیگر را جذب می‌کنند. در غلظت‌های بالاتر نمک، یون‌های نمکی با بار منفی به دانه‌های با بار مثبت متصل شده و جایگزین پروتئین‌های با بار منفی می‌شوند. با افزایش غلظت نمک پروتئین‌هایی با بار نسبتاً پایین (پروتئین‌هایی که به‌طور ضعیف به دانه‌ها متصل شده‌اند) در ابتدا خارج شده و پروتئین‌های با بار زیاد در آخر از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند. به‌طور مشابه، ستون‌های دارای بار منفی می‌توانند برای جداسازی پروتئین‌های بازی (با بار مثبت) استفاده شود.

کروماتوگرافی تمایلی: توانایی پروتئین‌ها در اتصال ویژه به مولکول‌های دیگر، اساس کروماتوگرافی تمایلی[1] است. در این تکنیک، لیگاند یا مولکول‌های دیگری که به پروتئین مورد نظر متصل می‌گردند، به‌طور کووالان به سطح دانه‌های تشکیل‌دهنده ستون چسبانده می‌شوند. لیگاندها می‌توانند، سوبستراها یا مهارکننده‌های آنزیم و یا مواد مشابه آنها و یا مولکول‌های دیگر باشند که به پروتئین اختصاصی‌شان متصل می‌شوند. در **کروماتوگرافی ایمونوافینیتی یا تمایل به آنتی‌بادی** که بیشترین شکل مورد استفاده کروماتوگرافی تمایلی می‌باشد، مولکول متصل شده به دانه‌های تشکیل‌دهنده ستون، آنتی‌بادی ویژه پروتئین مورد نظر است (شکل c ۳ـ۳۷). (درباره آنتی‌بادی‌ها به عنوان ابزارهایی در مطالعه پروتئین‌ها، توضیح خواهیم داد).

در ستون کروماتوگرافی تمایلی، فقط پروتئین‌هایی باقی می‌مانند که به مولکول‌های چسبانده شده به دانه‌ها اتصال یابند. بقیه پروتئین‌ها بدون توجه به بار و جرم‌شان از ستون عبور کرده و به آن متصل نمی‌شوند. با این حال اگر پروتئین باقیمانده در ستون به سایر مولکول‌ها اتصال یابد، تشکیل کمپلکسی را می‌دهد، بنابراین کمپلکس در روی ستون باقی می‌ماند. سپس پروتئین‌های متصل شده به ستون تمایلی سپس با افزودن لیگاند متصل‌شونده به ستون و یا با تغییر غلظت نمکی یا pH از ستون خارج می‌گردد. تغییر غلظت نمکی یا pH تا حدی است که مولکول را از ستون جدا کند. توانایی این تکنیک در جدا نمودن پروتئین‌های خاص بستگی به انتخاب یک مولکول متصل‌شونده مناسب دارد تا این مولکول به پروتئین مورد نظر محکم‌تر از بقیه پروتئین‌ها متصل شود.

سنجش با آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌های کاملاً اختصاصی می‌تواند پروتئین‌های خاصی را شناسایی نماید

تخلیص پروتئین یا هر مولکول دیگر احتیاج به یک سنجش ویژه دارد تا بتواند وجود پروتئین مورد نظر را به موازات جدا شدن از مولکول‌های دیگر، شناسایی کند (مثلاً در ستون، اجزاء خروجی شیب چگالی، باندهای ژلی یا لکه‌ها). سنجش براساس خصوصیات ویژه یک پروتئین همچون توانایی اتصال به یک لیگاند خاص، کاتالیز واکنش خاص یا شناخته شدن با یک آنتی‌بادی ویژه، استوار است. سنجش همچنین بایستی ساده و سریع باشد تا خطاها را کاهش داده و امکان دهد پروتئین قبل از دناتوره یا تجزیه شدن مورد سنجش قرار گیرد. هدف تخلیص جدا نمودن مقدار مناسب یک پروتئین برای مطالعه است. بنابراین سنجش مفید بایستی به قدری حساس باشد تا مقدار کمی از ماده را مصرف نماید. در اغلب سنجش‌های پروتئینی متداول فقط به مقدار 10^{-9} تا 10^{-12} گرم از ماده سنجش‌شونده احتیاج دارند.

واکنش‌های آنزیمی رنگ‌زا و منتشرکننده نور: اغلب سنجش‌ها براساس شناسایی یک جنبه عملکردی از پروتئین است. به عنوان

1-Affinity chromatography

مثال سنجش فعالیت آنزیمی براساس توانایی شناسایی کاهش سوبسترا یا تشکیل محصول است. بعضی سنجش‌های آنزیمی از سوبستراهای رنگ‌زا استفاده می‌کنند که در طی واکنش رنگ آنها تغییر می‌نماید. (بعضی سوبستراها به‌طور طبیعی رنگ‌زا هستند، و بعضی دیگر رنگ‌زا نیستند و به یک مولکول رنگ‌زا متصل می‌شوند). به دلیل اختصاصی بودن یک آنزیم به سوبسترایش، اگر در نمونه آنزیم وجود داشته باشد، در حضور سوبسترای رنگ‌زا، رنگ تغییر خواهد کرد. سرعت واکنش آنزیمی، مقدار آنزیم موجود در نمونه را نشان می‌دهد. آنزیم‌هایی که واکنش‌های رنگ‌زا را کاتالیز می‌کنند می‌توان به‌طور شیمیایی به آنتی‌بادی متصل نموده و از آن به عنوان گزارش وجود آنتی‌ژن یا موقعیت آنتی‌ژنی که به آن آنتی‌بادی متصل شده، استفاده کرد.

سنجش‌های آنتی‌بادی: همان‌طور که قبلاً اشاره شد، آنتی‌بادی‌ها دو خصوصیت جداگانه یعنی اتصال محکم و ویژه به آنتی‌ژن دارند. در نتیجه می‌توان آنتی‌بادی‌هایی برای شناسایی آنتی‌ژن پروتئینی مورد نظر تهیه نمود و برای شناسایی وجود آن پروتئین در مخلوط با چند پروتئین دیگر (پیداکردن سوزن در انبارکاه) و یا در یک مخلوط نسبتاً تخلیص شده از آن پروتئین، مورد استفاده قرار داد. اتصال محکم آنتی‌بادی به آنتی‌ژن (بنابراین وجود آنتی‌ژن) را می‌توان با نشاندار نمودن آنتی‌بادی با آنزیم، مولکول فلورسانس و یا ایزوتوپ‌های رادیواکتیو مشاهده نمود. به عنوان مثال، لوسیفراز آنزیمی است که در حشرات شب‌تاب و بعضی باکتری‌ها وجود دارد و می‌توان آن را به آنتی‌بادی متصل نمود. در حضور ATP و سوبسترای لوسیفرین، لوسیفراز واکنشی را کاتالیز می‌کند که طی آن نور ساطع می‌شود. در هر مورد، بعد از اتصال آنتی‌بادی به پروتئین مورد نظر (آنتی‌ژن) و شست‌وشوی آنتی‌بادی اتصال نیافته، سوبسترای آنزیم متصل شده به آنتی‌بادی اضافه می‌شود و تولید رنگ یا انتشار نور دیده می‌شود.

شدت نور یا رنگ متناسب با مقدار آنتی‌بادی متصل به آنزیم بوده و بنابراین نشان‌دهنده مقدار آنتی‌ژن موجود در نمونه است. نوع دیگر این تکنیک در شناسایی پروتئین‌های خاص در درون سلول‌های زنده و با استفاده از **پروتئین فلورسانت سبز**[1] (GFP) انجام می‌شود. GFP پروتئین فلورسنت طبیعی موجود در ستاره دریایی است (شکل ۱۲-۹ را ملاحظه کنید). یک روش سنجش دیگر بدین ترتیب است، بعد از اتصال آنتی‌بادی اول به پروتئین هدف آنتی‌بادی دوم که نشاندار است برای اتصال به کمپلکس حاصل از آنتی‌بادی اول با هدف‌اش، استفاده می‌شود. ترکیب دو آنتی‌بادی این امکان را فراهم می‌آورد تا شناسایی پروتئین هدف به صورت خیلی حساس صورت گیرد.

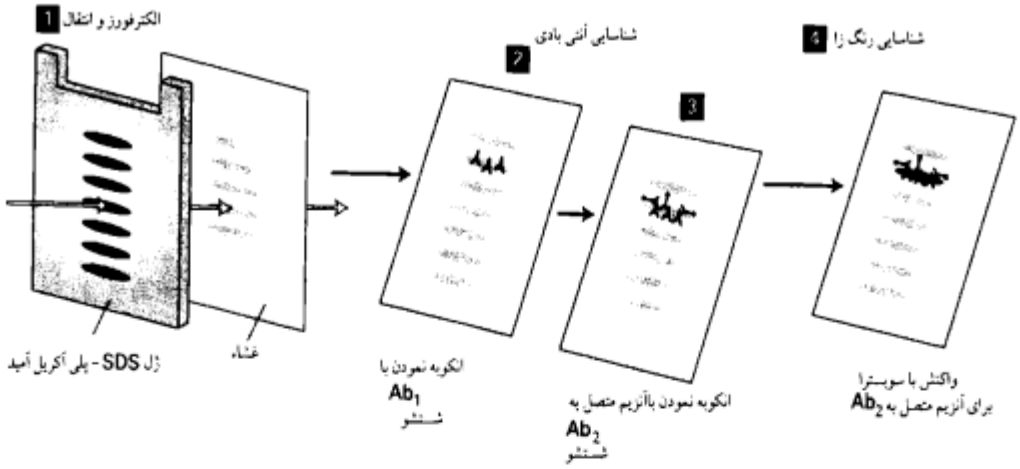
برای تولید آنتی‌بادی، پروتئین مورد نظر یا قطعه‌ای از آن به یک حیوان (معمولاً، خرگوش، موش یا بز) تزریق می‌شود. بعضی مواقع از پپتید سنتزی کوتاه با طول ۱۰ الی ۱۵ اسید آمینه به عنوان آنتی‌ژن جهت القاء تولید آنتی‌بادی استفاده می‌شود. این پپتید سنتزی براساس توالی پروتئین مورد نظر ساخته می‌شود و هنگامی که به یک حامل پروتئینی بزرگ متصل می‌گردد، می‌تواند تولید آنتی‌بادی‌ها را القاء نماید. این آنتی‌بادی‌ها به قسمت مورد نظر (اپی‌توپ) در پروتئین طبیعی متصل می‌شوند. اتصال بیوسنتزی یا شیمیایی اپی‌توپ به پروتئین غیرمرتبط را **دم‌دار نمودن اپی‌توپ**[2] می‌نامند و همان‌طوری که در کل این کتاب خواهیم دید، آنتی‌بادی‌هایی که به وسیله استفاده از اپی‌توپ‌های پپتیدی یا پروتئین‌ها تولید شده‌اند موادی چندکاره برای جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها می‌باشند.

شناسایی پروتئین‌ها در ژل: پروتئین‌های جای گرفته در درون ژل یک‌بعدی یا دوبعدی معمولاً قابل مشاهده نیستند. دو روش کلی برای شناسایی پروتئین‌ها در ژل، نشاندار نمودن یا رنگ‌آمیزی پروتئین‌های موجود در ژل و یا انتقال الکتروفورزی پروتئین‌ها به غشاهای ساخته شده از نیتروسلولز یا پلی‌وینیلیدین دی‌فلورید و سپس شناسایی آنها می‌باشد. پروتئین‌ها در درون ژل‌ها معمولاً با رنگ آلی یا رنگ حاوی نقره رنگ‌آمیزی می‌شوند در هر دو، رنگ ایجاد شده را با نور معمولی می‌توان مشاهده نمود. اما اگر رنگ استفاده شده فلورسنت باشد، برای مشاهده آن به ابزار خاصی نیاز است. کوماسی آبی متداول‌ترین رنگ مورد استفاده بوده و معمولاً برای شناسایی حدوداً ۱۰۰۰ نانوگرم پروتئین به کار می‌رود. کم‌ترین مقدار پروتئینی را که می‌توان با کوماسی آبی شناسایی نمود، حدود ۴ الی ۱۰ نانوگرم است. رنگ‌آمیزی نقره یا فلورسانس خیلی حساس ترند (کم‌تر از ۱ نانوگرم را نیز شناسایی می‌کنند). کوماسی و رنگ‌های دیگر را می‌توان برای مشاهده پروتئین‌ها بعد از انتقال به غشاء مورد استفاده قرار داد. با این حال روش متداول مشاهده پروتئین‌ها در این غشاءها لکه‌گذاری با ایمونوگلوبولین است این روش معمولاً لکه‌گذاری وسترن نامیده می‌شود.

لکه‌گذاری وسترن این تکنیک قدرت جداسازی الکتروفورز ژلی

1- Green fluorescent protein

2- Epitope tagging



▲ **شکل تجربی ۳۸ـ۳ لکه‌گذاری وسترن (لکه‌گذاری با ایمونوگلوبولین‌ها).** مرحله ❶: بعد از انجام الکتروفورز ژل SDS، باندهای جدا شده (یا لکه‌ها در الکتروفورز دوبعدی) از روی ژل به غشاء منفذ دارای منتقل می‌شوند. باندها در این غشاء به راحتی حذف نمی‌شوند. مرحله ❷: غشاء در معرض محلولی از آنتی‌بادی اختصاصی (Ab_1) پروتئین مورد نظر قرار گرفته و مدتی با آن انکوبه می‌گردد. فقط باند اتصال یافته به غشاء که حاوی پروتئین مورد نظر باشد به آنتی‌بادی اتصال یافته و لایه‌ای از مولکول‌های آنتی‌بادی را تشکیل می‌دهد (این موقعیت‌ها در اینجا قابل مشاهده نیستند). سپس غشاء شسته شده و Ab_1های متصل نشده حذف می‌شوند. مرحله ❸: غشاء با آنتی‌بادی دوم (Ab_2) انکوبه می‌شود. Ab_2 به‌طور اختصاصی Ab_1 را شناخته و به آن متصل می‌شود. این آنتی‌بادی دوم به‌طور کووالان به یک آنزیم (مثلاً: آلکالین فسفاتاز که یک واکنش رنگ‌زا را می‌تواند کاتالیز نماید)، ایزوتوپ رادیواکتیو یا مواد دیگر که وجودشان را می‌توان با حساسیت زیادی شناسایی نمود، متصل می‌شوند. مرحله ❹: در آخر موقعیت و مقدار Ab_2 متصل، شناسایی شده (مثلاً با ایجاد رسوب ارغوانی تیره حاصل از واکنش رنگ‌زا)، و امکان می‌دهد، تحرک الکتروفوزی (و بنابراین جرم) پروتئین مورد نظر و همچنین مقدار آن (براساس شدت باند) تعیین شود.

را با اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها ادغام می‌کند. این روش چند مرحله‌ای معمولاً برای جداسازی پروتئین و سپس شناسایی پروتئین خاص استفاده می‌شود. همان‌طوری که در شکل ۳۸ـ۳ نشان داده شده است دو آنتی‌بادی مختلف در این روش استفاده می‌شود. یکی از این آنتی‌بادی‌ها مختص به پروتئین مورد نظر بوده و آنتی‌بادی دوم به آنتی‌بادی اول اتصال می‌یابد. آنتی‌بادی دوم به یک آنزیم یا مولکولی دیگر متصل است که بدین طریق امکان شناسایی آنتی‌بادی اول (و بنابراین پروتئین مورد نظر را که آنتی‌بادی اول به آن متصل شده است) را فراهم می‌نماید. آنزیم‌های چسبانده شده به آنتی‌بادی دوم یا می‌توانند رنگ قابل مشاهده تولید نمایند و یا طی فرآیند **شیمیولومینسانس**[1] نور تولید کند که به راحتی می‌توان آن را با یک فیلم یا شناساگر حساس، ثبت نمود. دو آنتی‌بادی متفاوت (بعضی مواقع ساندویچ نامیده می‌شود) جهت تشدید پیام و افزایش حساسیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر یک آنتی‌بادی قابل دسترس نباشد، اما ژن رمزدهی‌کننده آن در دسترس باشد، می‌توان از آن برای بیان پروتئین استفاده کرد. به‌کمک روش‌های DNA نوترکیب (فصل ۵) می‌توان یک اپی‌توپ پپتیدی کوچک (دنباله‌دار کردن اپی‌توپ) را به توالی طبیعی پروتئین وارد نمود. این پروتئین خود می‌تواند به وسیله آنتی‌بادی‌های تجاری که بر علیه اپی‌توپ وارد شده هستند، شناسایی شود.

رادیوایزوتوپ‌ها ابزار مهمی برای شناسایی مولکول‌های زیستی هستند

رادیواکتیویته حاصل از رادیوایزوتوپ‌های موجود در مولکول، روشی حساس برای ردیابی پروتئین یا مولکول‌های زیستی دیگر است. حداقل یک اتم در مولکول‌های نشاندار به صورت رادیواکتیو یا **رادیو ایزوتوپ**[2] می‌باشد.

رادیوایزوتوپ‌های مورد استفاده در تحقیقات زیستی: صدها ترکیب زیستی (مثل اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها و حد واسطهای متابولیسمی مهم) که با رادیو ایزوتوپ‌های مختلفی نشاندار شده‌اند به‌طور تجاری در دسترس هستند. این مواد به‌طور چشم‌گیری در

1- Chemiluminscence 2- Radio isotope

فعالیت ویژه[1] (که مقدار رادیو اکتیویته در واحد ماده است) با هم متفاوت بوده و با مقدار تجزیه در دقیقه[2] (dpm) به ازای هر میلی مول اندازه‌گیری می‌شوند. فعالیت ویژه یک ماده نشاندار شده به احتمال تخریب رادیو ایزوتوپ که این خود **نیمه عمر**[3] آن را تعیین می‌کند بستگی دارد. نیمه عمر مدت زمان لازم برای نیمی از اتم‌ها است تا تحت تأثیر تخریب رادیو اکتیو قرار گیرند. در کل هر اندازه نیمه عمر رادیو ایزوتوپی کوتاه‌تر باشد، فعالیت ویژه‌اش بالاتر است (جدول ۱-۳).

فعالیت ویژه ترکیب نشاندار بایستی به حدی باشد که بتواند رادیو اکتیویته مناسب را به مولکول‌ها داده و بدین ترتیب به‌طور دقیق شناسایی شود. به عنوان مثال متیونین و سیستئین نشاندار شده با سولفور ۳۵ (^{35}S) به‌طور وسیعی برای نشاندار نمودن پروتئین‌های سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، چون تهیه این اسیدهای آمینه با فعالیت ویژه بالا ($>10^{15}$ dpm/mol) امکان‌پذیر است. همچنین پیش‌سازهای اسید نوکلئیک که با ^{3}H نشاندار شده‌اند و به صورت تجاری در دسترس می‌باشند، فعالیت اختصاصی بیشتری نسبت به همان مواد اما نشاندار شده با ^{14}C دارند. در اغلب آزمایشات اشکال نشاندار شده با ^{3}H ترجیح داده می‌شود زیرا امکان می‌دهند RNA یا DNA بعد از مدت کوتاهی نشاندار شوند یا به نمونه سلولی کمی نیاز باشد. ترکیبات مختلف حاوی فسفات که در آن هر اتم فسفر، رادیو ایزوتوپ فسفر ۳۲ است، به راحتی در دسترس است. به دلیل فعالیت اختصاصی بالا نوکلئوتیدهای نشاندار با ^{32}P، به‌طور معمول برای نشاندار کردن اسیدهای نوکلئیک در سیستم‌های بدون سلول به کار می‌رود.

جدول ۱-۳: رادیو ایزوتوپ‌های رایج در تحقیقات زیستی

ایزوتوپ	نیمه عمر
فسفر ۳۲	۱۴/۳ روز
ید ۱۲۵	۶۰/۴ روز
سولفور ۳۵	۸۷/۵ روز
تریتیوم (هیدروژن ۳)	۱۲/۴ سال
کربن ۱۴	۵۷۳۰/۴ سال

ترکیبات نشاندار شده با رادیو ایزوتوپ‌ها، خصوصیات شیمیایی مشابهی با ترکیبات نشاندار نشده مرتبط دارند. به عنوان مثال، آنزیم‌ها در کل نمی‌توانند بین سوبستراهای نشاندار و نشاندار نشده، تمایز قائل شوند. وجود اتم‌های رادیو اکتیو را با قرار دادن ایزوتوپ در داخل کروشه و به صورت پیشوند نشان می‌دهند (مثلاً، [^{3}H] لوسین). اما در عوض برای نشاندار کردن تقریباً همه مولکول‌های زیستی (هم‌چون پروتئین یا اسید نوکلئیک) با رادیو ایزوتوپ ید ۱۲۵ (^{125}I) لازم است، ^{125}I را به صورت کووالان به مولکول اضافه شود زیرا ید بطور طبیعی جزء ساختار مولکول زیستی نیست. چون این روش نشاندار نمودن ساختار شیمیایی را تغییر می‌دهد، در بعضی موارد فعالیت زیستی مولکول نشاندار متفاوت از فرم غیرنشاندار می‌باشد. وجود چنین اتم‌های رادیو اکتیوی به صورت پیشوند و با خط تیره نشان داده می‌شود (مثلا ^{125}I-تریپسین). روش‌های استاندارد برای نشاندار نمودن پروتئین‌ها با ^{125}I، باعث می‌شوند ^{125}I به‌طور کووالان به حلقه‌های آروماتیک زنجیره‌های جانبی تیروزین (مونو و دی‌ید و تیروزین) متصل شود.

آزمایشات نشاندار نمودن و شناسایی مولکول‌های نشاندار شده با رادیو ایزوتوپ‌ها: ترکیبات نشاندار به وسیله **اتورادیوگرافی** (یک روش اندازه‌گیری نیمه کمی قابل مشاهده) شناسایی می‌شوند و یا رادیو اکتیویته آنها با شمارشگرهای[4] مناسبی اندازه‌گیری می‌شود. شمارشگر روش سنجش کمّی بوده و می‌تواند مقدار ترکیبات نشاندار با رادیو ایزوتوپ‌ها را در نمونه و بسته به ماهیت آزمایش تعیین نماید. در بعضی آزمایشات هر دو روش شناسایی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در یکی از کاربردهای اتو رادیوگرافی، یک بافت، سلول یا ترکیبات سازنده سلول با ترکیبات رادیواکتیو نشاندار شده و مواد رادیو اکتیوی که در ساختار وارد نشده‌اند، شسته می‌شوند. ساختار نمونه با برقراری اتصالات عرضی شیمیایی بین ماکرومولکول‌ها (تثبیت) و یا منجمد نمودن ساختار پایدار می‌شود. سپس نمونه با امولسیون عکسبرداری حساس به تشعشع پوشانده می‌شود. بعد از پوشانده شدن با امولسیون، ذرات نقره کوچکی ایجاد می‌شوند، پراکندگی این ذرات به مقدار ماده رادیو اکتیو بستگی داشته و معمولاً با میکروسکوپ شناسایی می‌شود. مطالعات اتو رادیوگرافی کل سلول‌ها در تعیین جایگاه‌های داخل سلولی که ماکرومولکول‌ها سنتز شده و سپس در داخل سلول حرکت می‌نمایند، ضروری می‌باشند. تکنیک‌های مختلفی که از میکروسکوپ فلورسانت استفاده می‌کنند (در فصل ۹ توضیح می‌دهیم) معمولاً در این نوع مطالعات اغلب رادیوگرافی را کنار زده‌اند. با وجود این، اتو رادیوگرافی به‌طور متداول در اندازه‌گیری‌های مختلفی و برای شناسایی توالی‌های RNA یا DNA خاصی مورد استفاده قرار می‌گیرد (فصل ۵).

1- Specific activity
2- Disintegrations per minute
3- Half-life
4- Autoradiography

اندازه‌گیری‌های کمی مقدار رادیو اکتیوتیه در مواد نشاندار با ابزارهای مختلفی انجام می‌شود. شمارشگر گایگر یون‌هایی را که به وسیله ذرات β یا اشعه گامای ساطع‌شده از رادیو ایزوتوپ گازی تولید می‌شوند را اندازه‌گیری می‌کند. در شمارشگر سنتیلاسیون، نمونه نشاندار با مایعی حاوی ترکیب فلورسانت مخلوط می‌شود. ترکیب فلورسانت هنگامی که انرژی ذرات β یا اشعه گامای حاصل از تخریب رادیو ایزوتوپ را جذب نمود، باعث تابش نور می‌شود. یک فتوتیوپ در دستگاه، این تابش‌های نور را شناسایی نموده و آن را می‌شمارد. فسفوریماگر[1] برای اندازه‌گیری رادیواکتیوتیه به کار می‌رود. فسفوریماگر با استفاده از آرایش دوبعدی شناساگر، اطلاعات دیجیتالی را براساس تعداد تخریب‌ها برحسب مقدار تخریب در دقیقه بر روی پیکسل کوچکی از یک سطح، ذخیره می‌کند. این دستگاه‌ها که می‌توانند به عنوان نوعی فیلم الکترونیکی قابل بازیابی فرض شوند، به‌طور متداول برای تعیین مقدار مولکول‌های رادیو اکتیو جدا شده با ژل الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفته و برای این هدف جایگزین امولسیون‌های عکسبرداری می‌شوند.

ترکیبی از تکنیک‌های بیوشیمیایی و نشاندار کردن و روش‌های شناسایی کمّی و مشاهده‌ای، به مقدار زیادی در آزمایشات نشاندار نمودن مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان مثال، برای شناسایی اغلب پروتئین‌های سنتز شده توسط یک نوع سلول خاص، نمونه‌ای از سلول‌ها با اسید آمینه رادیواکتیو (همچون [^{35}S] متیونین) برای چند دقیقه انکوبه می‌شود، طی این مدت اسید آمینه نشاندار با اسیدهای آمینه غیرنشاندار سلول مخلوط شده و مقداری از اسیدهای آمینه نشاندار شده، به صورت بیوسنتزی وارد ساختار پروتئین‌های تازه سنتز شده می‌گردند. سپس اسیدهای آمینه رادیو اکتیوی که وارد پروتئین‌ها نشده‌اند، از سلول‌ها شسته می‌شوند، سلول‌ها جمع‌آوری شده، مخلوط پروتئین‌های سلولی از سلول‌ها استخراج (مثلاً با یک محلول دترجنت) و سپس با الکتروفورز ژلی جدا می‌شوند. ژل حاصل با اتورادیوگرافی و فسفوریماگر مورد آنالیز قرار می‌گیرد. باندهای رادیو اکتیو به پروتئین‌های تازه سنتز شده مربوط می‌باشد که اسیدهای آمینه نشاندار در آن وارد شده‌اند. هم‌چنین پروتئین‌ها را می‌توان با کروماتوگرافی مایع جدا نموده و رادیو اکتیویته را در اجزاء خارج شده به‌طور کمی با یک شمارشگر تعیین کرد. جهت شناسایی یک پروتئین ویژه از بین همه پروتئین‌هایی که در این روش نشاندار شده‌اند، از آنتی‌بادی اختصاصی برای پروتئین مورد نظر می‌توان استفاده نمود و آن پروتئین را از پروتئین‌های دیگر در نمونه شناسایی کرده و رسوب داد (رسوب دادن با ایمونوگلوبولین[2]). رسوب حاصله سپس در یک دترجنت حل شده و پروتئین از آنتی‌بادی جدا می‌شود. نمونه با SDS-PAGE جدا شده و اتو رادیوگرافی می‌شود. در این نوع آزمایشات، یک ترکیب فلورسانت که با تشعشع فعال می‌گردد، اغلب به داخل ژل ریخته می‌شود به‌طوری که با انتشار نور می‌تواند وجود پروتئین نشاندار را شناسایی کند. در این روش از فیلم و یا شناساگر الکترونیک دوبعدی استفاده می‌شود.

آزمایشات **ضربه ـ تعقیب**[3] به‌طور اختصاصی برای دنبال نمودن تغییرات در موقعیت داخل سلولی پروتئین یا تغییر یک پروتئین و یا متابولیت در طی زمان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این دستورالعمل آزمایشگاهی، نمونه سلولی در معرض ترکیب نشاندار قرار می‌گیرد. این ترکیب نشاندار می‌تواند وارد ساختار مولکول مورد نظر در سلول شود و یا به آن بچسبد (ضربه)، بعد از مدت کوتاهی، نمونه با بافر شسته شده و ترکیب‌های نشانداری که وارد ساختار مولکولی نشده‌اند، برداشته شده و در آخر با شکل غیرنشاندار ترکیب مورد نظر انکوبه می‌شود (تعقیب) (شکل ۳۹ـ۳). نمونه طی زمان‌های متفاوتی در مرحله تعقیب مورد بررسی قرار می‌گیرد تا موقعیت یا شکل شیمیایی ترکیب نشاندار در طی زمان تعیین شود. آزمایش‌های ضربه ـ تعقیب که در آن پروتئین مورد نظر بعد از رسوب‌دهی با ایمونوگلوبولین‌ها و جداسازی با SDS-PAGE به وسیله اتو رادیوگرافی شناسایی می‌شود، اغلب جهت بررسی سرعت سنتز، تغییر و تجزیه پروتئین استفاده می‌شود. این عمل با افزودن پیش‌سازهای اسیدآمینه‌ای نشاندار در مرحله ضربه و شناسایی مقدار و خصوصیات پروتئین رادیو اکتیو طی مرحله تعقیب انجام می‌گیرد. بنابراین با این روش می‌توان تغییرات بعد از ترجمه پروتئین را که باعث تغییر تحرک الکتروفورزی و سرعت تخریب آن می‌شود، مشاهده نمود. یک استفاده کلاسیک از تکنیک ضربه ـ تعقیب در بررسی مسیر انتقال پروتئین‌های ترشحی از جایگاه سنتزشان در شبکه آندوپلاسمی به سطح سلول می‌باشد (فصل ۱۴).

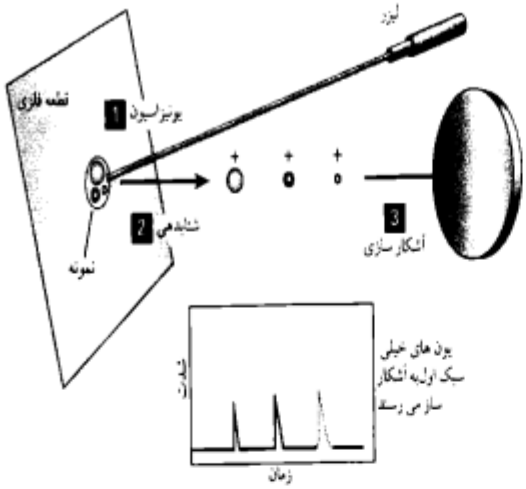
طیف‌سنجی جرمی می‌تواند جرم و توالی پروتئین‌ها را تعیین کند

طیف‌سنجی جرمی (MS) تکنیک قدرتمندی برای تعیین خصوصیات پروتئین‌ها است. طیف‌سنجی جرمی به‌طور اختصاصی در تعیین جرم پروتئین یا قطعات پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

1- Phosphorimagers 2- Immunopre cipitation
3- pulse-chase

▲ شکل تجربی ۳ـ۳۹ آزمایشات ضربه و تعقیب می‌تواند مسیر تغییر پروتئین یا حرکت آن را ردیابی کند. a) برای پیگیری سرنوشت یک پروتئین تازه سنتز شده در سلول، سلول‌ها به مدت نیم ساعت در حضور [^{35}S] متیونین انکوبه شدند (ضربه) تا همه پروتئین‌های تازه سنتز شده، نشاندار گردند. سپس اسیدهای آمینه رادیو اکتیوی که وارد سلول‌ها نشده بودند، شسته شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر دوباره انکوبه گردیدند (مرحله تعقیب). در این ۲۴ ساعت در فواصل زمانی متفاوت نمونه‌برداری انجام شده و پروتئین موردنظر به وسیله رسوب‌دهی با ایمونوگلوبولین جدا می‌شود (در اینجا گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین). SDS-PAGE رسوب‌های حاصل و به دنبال آن اتو رادیوگرافی این امکان را می‌دهد تا یک پروتئین خاص از لحظات اولیه سنتز تا زمان بلوغ مورد بررسی قرار گیرد. در این‌جا پروتئین اول به صورت پیش‌ساز کوچک (p) سنتز شده و سپس سریعاً به وسیله افزوده شدن کربوهیدرات‌ها به فرم بالغ بزرگ‌تر (m) تغییر می‌یابد. حدود نصفی از پروتئین نشاندار طی مرحله ضربه و بقیه در نیم ساعت اول مرحله تعقیب، از p به m تبدیل می‌شوند. پروتئین به مدت ۶ الی ۸ ساعت پایدار باقیمانده و سپس شروع به تجزیه شدن می‌کند (تجزیه شدن به وسیله کاهش شدت باند دیده می‌شود). b) همین آزمایش در سلول‌هایی انجام شد که فرم جهش یافته پروتئین را می‌ساختند. فرم p جهش یافته نمی‌تواند به‌طور صحیح به فرم m تبدیل شود و بنابراین سریع‌تر از پروتئین طبیعی تجزیه می‌شود.

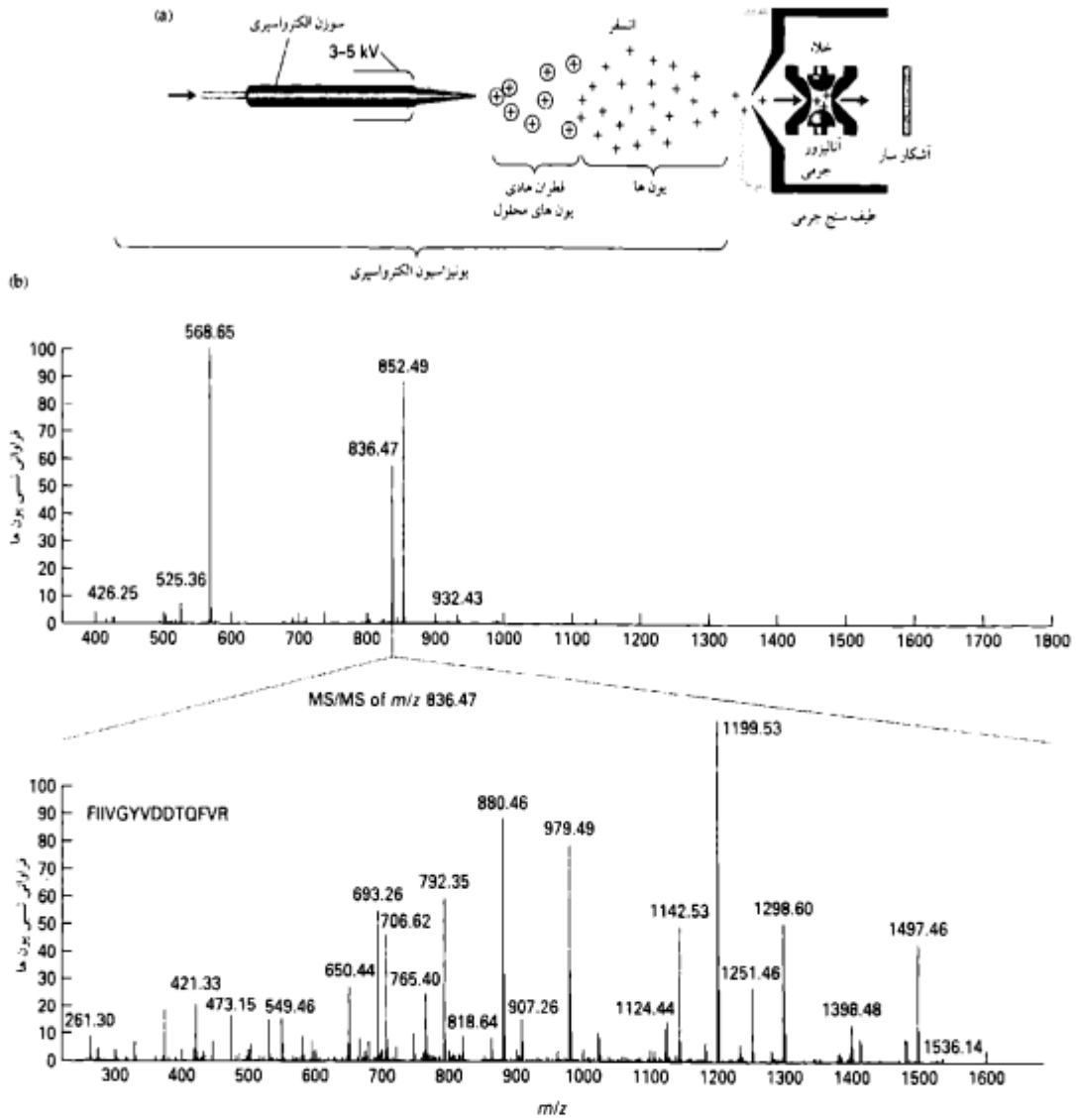
داشتن اطلاعات لازم، همچنین می‌توان توالی قسمتی از پروتئین و همه آن را تعیین نمود. این روش امکان می‌دهد، به‌طور خیلی دقیق نسبت جرم (m) یک مولکول باردار (یون) را نسبت به بار آن (z) یا m z تعیین نمود. این تکنیک جرم دقیق یون را تعیین می‌کند. طیف‌سنج‌های جرمی چهار قسمت کلیدی دارند. قسمت اول منبع یون است، در این قسمت بار معمولاً به صورت پروتون به مولکول‌های پپتید یا پروتئین منتقل می‌شود. تشکیل این یون‌ها در حضور یک



▲ شکل تجربی ۳ـ۴۰ جرم مولکولی را می‌توان با طیف‌سنجی جرمی جداسازی / یونیزاسیون لیزری با کمک ماتریکس زمان پرواز (MALD-TOF) تعیین نمود. در طیف‌سنج جرمی (MALD-TOF)، پالس‌های نوری لیزر، مخلوط پپتیدی یا پروتئین جذب شده به روی صفحه فلزی را یونیزه می‌کند (مرحله ❶). یک میدان الکتریکی یون‌ها را به طرف آشکارساز شتاب می‌دهد (مراحل ❷ و ❸). زمان رسیدن به آشکارساز با نسبت بار به جرم (m/z) یون‌ها متناسب است. در مورد یون‌های دارای بار یکسان، یون‌های کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند (در زمان کوتاهی به آشکارساز می‌رسند). وزن مولکولی با استفاده از زمان پرواز یک یون استاندارد، محاسبه می‌شود.

میدان الکتریکی با قدرت بالا ایجاد می‌شود. این میدان الکتریکی مولکول‌های باردار را به سوی قسمت دوم هدایت می‌کند. قسمت دوم دستگاه آنالیزکننده جرمی است. آنالیزکننده جرمی در داخل محفظه خلاء قرار گرفته و به‌طور فیزیکی یون‌ها را براساس اختلاف بار به جرم (m/z) جدا نموده و باعث می‌شود یون‌ها به طرف آشکارساز هدایت و به آن برخورد کنند. آشکارساز قسمت سوم دستگاه را تشکیل می‌دهد. آشکارساز فراوانی نسبی هر کدام از یون‌ها را در نمونه اندازه‌گیری می‌کند. قسمت چهارم، سیستم اطلاعات می‌باشد که کامپیوتری شده است. این سیستم دستگاه را تنظیم می‌کند و عمل جمع‌آوری و پردازش اطلاعات حاصل را به عهده داشته و می‌تواند به‌طور جداگانه دستگاه را در جهت جمع‌آوری اطلاعات خاصی از نمونه و براساس مشاهدات اولیه هدایت نماید. این نوع تنظیم خودکار برای تعیین توالی پپتید با MS پشت سر هم (MS/MS) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

دو روش عمده مورد استفاده برای تولید یون پروتئین‌ها و قطعات



▲ **شکل تجربی ۴۱-۳ جرم مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها را می‌توان به وسیله طیف‌سنجی یونیزاسیون الکترواسپری ـ تله یونی تعیین نمود.** a) یونیزاسیون الکترواسپری، پروتئین‌ها و پپتیدهای محلول را با عبور دادن محلول از یک سوزن (که قطرات را تشکیل داده و با داشتن ولتاژ بالا، قطرات را باردار می‌کند) به یون‌های گازی شدیداً باردار تبدیل کند. تبخیر حلال، یون‌های گازی تولید می‌کند که وارد طیف‌سنج جرمی می‌شوند. یون‌ها به وسیله یک آنالیزور تله یونی، جدا شده و سپس یون‌ها به طرف آشکارساز هدایت می‌شوند. b) نمودار بالا: طیف جرمی مخلوطی از سه پپتید بزرگ و چند پپتید کوچک را به صورت فراوانی نسبی یون‌های رسیده به آشکارساز (محور Y) علیه نسبت بار به جرم (محور X) نشان می‌دهد. نمودار پایین: در دستگاه MS/MS (همان‌طوری که در قسمت a نشان داده شده) یک یون پپتیدی خاص را می‌توان انتخاب و به یون‌های کوچک‌تر قطعه قطعه کرد و سپس مورد آنالیز و شناسایی قرار داد. طیف MS/MS (که طیف محصول یون نیز نامیده می‌شود) اطلاعات ساختاری زیادی از یون مادر همچون اطلاعاتی درباره توالی پپتیدها را در اختیار قرار می‌دهد. در اینجا یونی با m/z، ۸۳۶/۷ انتخاب شده و قطعه قطعه می‌گردد و طیف جرمی محصولات یونی اندازه‌گیری می‌شود. توجه داشته باشید در طیف ایجاد شده یونی با m/z بزرگ‌تر از ۸۳۶/۴۷ وجود ندارد، زیرا خود این یون قطعه قطعه می‌شود. با بررسی اندازه‌های مختلف محصولات یونی، و با توجه به این‌که در چنین آزمایش‌هایی اغلب پیوند پپتیدی شکسته می‌شود و هم‌چنین با دانستن مقادیر m/z اسیدهای آمینه و با اطلاعات موجود در منابع اطلاعاتی، می‌توان توالی پپتیدی را که که در اینجا FIIVGYVDDTQFVR است به دست آورد.

پروتئینی: (۱) جداسازی / یونیزاسیون لیزری با کمک ماتریکس[۱] (MALDI) و (۲) الکترواسپری[۲] (ES) می‌باشد. در MALDI

1- Matricx-assisted laser desorption/ionization

2- Electrospray

(شکل ۴۰ـ۳) نمونه پپتیدی یا پروتئینی با یک اسید آلی (ماتریکس) که وزن مولکولی پائینی داشته و نور UV را جذب می‌کند، مخلوط و سپس بر روی یک صفحه فلزی خشک می‌شود. انرژی حاصل از تابش لیزر باعث یونیزه و بخار شدن نمونه می‌شود. این عمل باعث تولید یون‌های مولکولی باردار می‌گردد. در ES (شکل a ۴۱ـ۳)، نمونه پپتیدی یا پروتئینی در محلول به غباری از قطرات ریز تبدیل می‌شود. این عمل از طریق لوله موئین نازک و با فشار اتمسفری انجام می‌گیرد. قطرات در حضور میدان الکتریکی شدید ایجاد می‌شود. این میدان باعث باردار شدن قطرات می‌شود. حلال قطرات در مسیر کوتاه ورود به آنالیزور در اسپکترومترجری تبخیر شده، یون‌های باردار چندگانه از پروتئین‌ها و پپتیدها ایجاد می‌شود. یون‌های گازی در قسمت آنالیزور دستگاه MS، براساس m/z شان به وسیله میدان الکتریکی شتاب یافته و جدا می‌شوند.

دو آنالیزور جرمی که بیشترین استفاده را دارند عبارتند از آنالیز زمان پرواز[1] (TOF) و تله یونی[2]. آنالیز در دستگاه TOF براساس مدت زمانی است که طول می‌کشد یون قبل از رسیدن به آشکارساز از طول آنالیزور عبور کند. این زمان با مقدار m/z (یون‌های کوچک‌تر سریع‌تر از یون‌های بزرگ‌تر با بار یکسان حرکت می‌کنند، (شکل ۴۰ـ۳ را ملاحظه کنید) متناسب است. در آنالیزورهای تله یونی، میدان الکتریکی قابل تنظیم برای گرفتن یا به تله انداختن یون‌هایی با m/z خاص به کار می‌رود. سپس یون‌های به تله افتاده از آنالیزور خارج شده و به آشکارساز می‌رسند (شکل الف ۴۱ـ۳ را ملاحظه کنید). با تغییر میدان الکتریکی می‌توان یون‌های متفاوت از لحاظ m/z را یک به یک آزمایش نمود. نتیجه این آزمایش تولید طیف جرمی است که حاصل آن نمودار فراوانی نسبی (محور y) علیه m/z (محور x) است (شکل b ۴۱ـ۳ نمودار بالا).

در دستگاه تاندوم (یا MS/MS)، هر کدام از یون‌های والدی در طیف جرمی اولیه (شکل b ۴۱ـ۳، نمودار بالا) را می‌توان انتخاب نمود و آن را به وسیله برخورد با یک گاز بی‌اثر به یون‌های کوچک‌تر شکسته و سپس m/z و فراوانی نسبی قطعات یونی حاصل را اندازه‌گیری نمود (شکل ب ۴۱ـ۳، نمودار پایین). همه این مراحل در یک دستگاه انجام می‌گیرد و زمان لازم برای آنالیز هر یون والدی ۰/۱ ثانیه می‌باشد. دور دوم قطعه قطعه شدن و آنالیز یون‌ها، امکان تعیین توالی قطعات کوتاه پپتیدی (<۲۵ اسید آمینه) را می‌دهد. چون قطعه قطعه شدن در اثر برخورد با گاز بی‌اثر اول در پیوندهای پپتیدی اتفاق می‌افتد، بنابراین اختلاف جرم بین یون‌ها به اختلاف جرم اسیدهای آمینه موجود در زنجیره مربوط بوده و امکان تعیین توالی را با استفاده از اطلاعات توالی‌های موجود در منابع اطلاعاتی می‌دهد (شکل b ۴۱ـ۳، نمودار پایین).

طیف‌سنجی جرمی خیلی حساس بوده و قادر به شناسایی ۱×۱۰^{-۱۶} مول (۱۰۰ آتومول) پپتید یا ۱۰×۱۰^{-۱۵} مول (۱۰ فمتومول) از پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰۰۰۰۰ [دالتون] است. خطا در دقت اندازه‌گیری جرم وابسته به نوع آنالیزور جرمی است، معمولاً مقدار خطا در مورد پپتیدها تقریباً ۰/۰۱ درصد و در مورد پروتئین‌ها ۰/۱ـ۰/۵ درصد است. همان‌طوری که در قسمت پروتئومیکس توضیح داده می‌شود، می‌توان با استفاده از MS مخلوطی از پروتئین‌ها و همچنین پروتئین‌های خالص شده را مورد بررسی قرار داد. به‌طور معمول، نمونه‌های پروتئینی با پروتئازها هضم شده و پپتیدهای حاصل از هضم مورد بررسی قرار می‌گیرند. کاربرد قدرتمند و اختصاصی MS برداشتن مخلوط پروتئینی از نمونه‌های زیستی، هضم آن با تریپسین یا پروتئازهای دیگر، جداسازی نسبی ترکیبات با استفاده از کروماتوگرافی مایع (LC)، و سپس انتقال محلول خارج شده از ستون کروماتوگرافی (مستقیماً) به طیف‌سنج جرمی تاندوم ES است. این تکنیک LC-MS/MS نامیده شده و امکان بررسی پیوسته اغلب مخلوط‌های پروتئینی را می‌دهد.

فراوانی نسبی یون‌ها که به وسیله طیف‌سنجی در نمونه تعیین می‌شود، مقادیر نسبی هستند (مقادیر مطلق نیستند). بنابراین اگر بخواهیم از MS برای مقایسه مقادیر یک پروتئین خاص در دو نمونه مختلف (مثلاً نمونه‌ای از یک موجود طبیعی و یک موجود جهش یافته) استفاده نماییم، لازم است از یک استاندارد داخلی در نمونه‌ها استفاده کنیم. مقدار این استاندارد نبایستی بین دو نمونه متفاوت باشد. سپس می‌توان مقدار پروتئین مورد نظر را نسبت به استاندارد موجود در نمونه تعیین نمود. این عمل امکان می‌دهد تا مقدار پروتئین مورد نظر به درستی در دو نمونه مقایسه شود.

ساختار اول پروتئین را می‌توان با روش‌های شیمیایی و همچنین از روی توالی‌های ژنی تعیین نمود

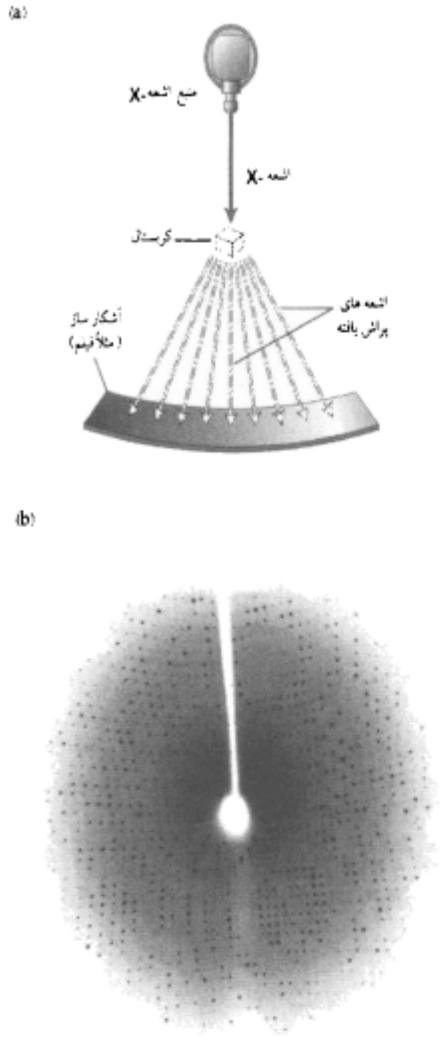
روش کلاسیک برای تعیین توالی اسیدآمینه‌ای یک پروتئین، تجزیه ادمن است. در این روش، گروه آمین اسیدآمینه انتهای N در پلی‌پپتید نشاندار شده و سپس اسیدآمینه نشاندار شده، از پلی‌پپتید بریده شده و با کروماتوگرافی مایع با فشار بالا[3] شناسایی می‌گردد.

1- Time-of-flight 2- Ion trap
3- High-pressure liquid chromatogaply

بدین ترتیب پلی‌پپتید از سمت چپ یک اسید آمینه کوتاه‌تر شده و اسیدآمینه جدید [بعدی در توالی پلی‌پپتید]، در انتهای N ظاهر می‌شود. این چرخه به قدری تکرار می‌شود تا همه رزیدوهای پلی‌پپتید، شناسایی شوند.

قبل از ۱۹۸۵، زیست‌شناسان به‌طور معمول از روش شیمیایی ادمن برای تعیین توالی پروتئین استفاده می‌کردند. اما امروزه توالی پروتئین کامل به‌طور اولیه معمولاً با بررسی توالی‌های ژنومی تعیین می‌شود. ژنوم کامل موجودات زنده زیادی تعیین توالی شده است و اطلاعات توالی ژنوم انسان و موجودات دیگر به سرعت در حال گسترش است. همان‌طوری که در فصل ۵ توضیح داده می‌شود، توالی پروتئین‌ها را می‌توان از روی توالی‌های DNA رمزدهی‌کننده آنها، پیش‌بینی نمود.

روش قدرتمند برای تعیین توالی ساختار اولیه یک پروتئین، استفاده ترکیبی از MS و توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی می‌باشد. در اول انگشت‌نگاری جرمی پپتیدی[1] از یک پروتئین با استفاده از MS حاصل می‌شود. **انگشت‌نگاری جرمی پپتیدی** فهرستی از وزن‌های مولکولی پپتیدها می‌باشد که به وسیله هضم پروتئین با پروتئاز اختصاصی همچون تریپسین ایجاد شده‌اند. از وزن مولکولی پروتئین و قطعات حاصل از هضم آنزیمی آن برای جست‌وجوی پروتئین مشابه از نظر اندازه و با نقشه‌های جرمی پپتیدی مشابه و یا یکسان در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم، استفاده می‌شود. طیف‌سنجی جرمی همچنین برای تعیین توالی مستقیم پپتیدها با استفاده از MS/MS می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.



▲ **شکل تجربی ۴۲-۳ کریستالوگرافی اشعه x اطلاعات حاصل از پراش را فراهم می‌نماید که می‌توان با استفاده از آن اطلاعات ساختار سه‌بعدی یک پروتئین را تعیین کرد.** a) قسمت‌های اساسی کریستالوگرافی با اشعه x وقتی اشعه x به کریستال برخورد می‌کند، قسمتی از آن عبور می‌کند و قسمتی دیگر در جهات مختلفی پراکنده (پراش) می‌شود. شدت امواج پراش یافته روی یک فیلم اشعه x با آشکارساز الکترونیکی حالت جامد ثبت می‌شود. امواج پراش یافته، لکه‌های پراکنده با آرایش متناوب ایجاد می‌کند. b) الگوی پراش اشعه x یک کریستال پروتئین روی آشکارساز حالت جامد، جمع‌آوری می‌شود. با تجزیه و تحلیل‌ها الگوی لکه‌هایی همچون این نمونه، موقعیت اتم‌ها در پروتئین را می‌توان تعیین نمود.

ساختمان فضایی پروتئین با روش‌های فیزیکی پیشرفته‌ای تعیین می‌شود

در این فصل، تأکید کردیم که عملکرد پروتئین به ساختار پروتئین وابسته است. بنابراین برای به تصویر کشاندن عملکرد پروتئین، ساختار سه‌بعدی آن را بایستی شناخت. تعیین ساختمان فضایی پروتئین به روش‌های پیشرفته فیزیکی و آنالیز پیچیده اطلاعات آزمایشگاهی نیاز دارد. ما به‌طور مختصر سه روش که برای ساخت مدل‌های سه‌بعدی از پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند را توضیح می‌دهیم.

کریستالوگرافی اشعه X : استفاده از **کریستالوگرافی اشعه x**[2] برای تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین توسط ماکس پروتز[3] و جان کندرو[4] در دهه ۱۹۵۰ آغاز شد. در این تکنیک اشعه x از یک کریستال پروتئین عبور داده می‌شود. این کریستال حاوی میلیون‌ها

1- peptide mass fingerprint
2- X-ray crystallography
3- Max perutz 4- John kendrew

مولکول‌های پروتئین است که به دقت با همدیگر در آرایش کریستالی سخت کنار هم قرار گرفته‌اند. طول موج اشعه x در حدود ۰/۱ـ۰/۲ نانومتر بوده و به اندازه کافی کوتاه است تا موقعیت اتم‌ها را در مولکول تعیین نماید. الکترون‌ها در اتم‌های کریستال، اشعه x را پراکنده نموده و الگوی پراش را ایجاد می‌کنند. الگوی پراش از لکه‌های جداگانه‌ای تشکیل می‌شود. این لکه‌ها به وسیله برخورد اشعه پراش یافته به فیلم عکسبرداری و یا با یک آشکارساز الکترونیکی ایجاد می‌شوند (شکل ۳ـ۴۲). الگوی پراش ایجاد شده فوق‌العاده پیچیده بوده (معمولاً تا ۲۵۰۰۰ لکه می‌تواند داشته باشد) و شدت لکه‌ها با توجه به پراکندگی الکترون‌ها تغییر می‌کند. پراکندگی الکترون‌ها نیز به وسیله ساختار اتمی و کونفورماسیون سه‌بعدی پروتئین تعیین می‌شود. برای تفسیر الگوی پراش و محاسبه پراکندگی الکترون‌ها (که **نقشه چگالی الکترونی** نامیده می‌شود)، بایستی محاسبات پیچیده انجام گیرد و همچنین پروتئین تغییر یابد (مثلاً با اتصال به فلزات سنگین). با داشتن نقشه چگالی الکترونی، می‌توان مدل مولکولی پروتئین را با چگالی الکترونی مطابقت داد. این مدل‌های مولکولی را در سراسر این کتاب می‌توان دید (مثلاً شکل ۳ـ۸). این فرآیند شبیه به بازسازی شکل یک سنگ از روی موج‌های ایجاد شده در اثر افتادن آن در آب می‌باشد. با اینکه بعضی مواقع، ساختار قسمت‌هایی از پروتئین به وضوح مشخص نمی‌شود، محققان با استفاده از کریستالوگرافی اشعه x به‌طور علمی ساختارهای اغلب پروتئین‌ها را تعیین نموده‌اند، به نحوی که این ساختارها را می‌توان دید. تا به امروز ساختار سه‌بعدی بیش از ۱۰۰۰۰ پروتئین تعیین شده است.

میکروسکوپی کرایوالکترون: با این‌که بلوری کردن بعضی پروتئین‌ها راحت است اما تهیه کریستال از بعضی دیگر (مخصوصاً پروتئین‌های چند زیر واحدی و پروتئین‌های همراه با غشاء) نیاز به صرف وقت و آزمون و خطاهای زیادی دارد تا فقط شرایط مناسب برای بلوری کردن پروتئین را پیدا کنند، آن هم اگر آن شرایط را بتوان در همه پیدا کرد (رشد دادن کریستال مناسب برای مطالعات ساختاری، بیشتر از یک کار علمی، کار هنری است). روش‌های متعددی برای تعیین ساختار چنین پروتئین‌هایی که سخت بلوری می‌شوند وجود دارد. یکی از این روش‌ها، میکروسکوپی کرایوالکترون[1] می‌باشد. در این تکنیک نمونه پروتئین به سرعت در هلیوم مایع منجمد می‌شود تا ساختارش حفظ شود، سپس پروتئین در حالت منجمد و آبپوشی شده در میکروسکوپ کرایوالکترون مورد بررسی قرار می‌گیرد. عکس‌ها از پروتئین با استفاده از مقدار دوز کمی الکترون، از زوایای مختلف گرفته می‌شود تا الکترون‌های تابیده شده به ساختار پروتئین صدمه نزنند. عکس‌ها روی فیلم ثابت می‌شوند. برنامه‌های قدرتمند کامپیوتری تصاویر را آنالیز نموده و ساختار سه‌بعدی پروتئین را بازسازی می‌کنند. پیشرفت‌های اخیر در میکروسکوپی کرایوالکترون این امکان را به محققین داده تا مدل‌های مولکولی را بسازند که می‌تواند به درک ما از چگونگی عملکرد پروتئین کمک کند. استفاده از میکروسکوپی کرایوالکترون و انواع دیگری از میکروسکوپ‌های الکترونی جهت مشاهده ساختارهای سلولی در فصل ۹ توضیح داده شده است.

طیف‌سنجی NMR : ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های کوچک که حداکثر ۲۰۰ اسیدآمینه دارند را می‌توان با طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته[2] مطالعه نمود. در این تکنیک، محلول غلیظ پروتئینی در میدان الکتریکی قرار گرفته و تأثیرات فرکانس‌های رادیویی مختلف بر روی حالت‌های اسپین هسته در اتم‌های مختلف ارزیابی می‌شود. حالت اسپینی هر اتم به وسیله اتم‌های مجاور در اسیدهای آمینه کناری، تحت تأثیر قرار می‌گیرد. اسیدهای آمینه نزدیکتر هم تأثیر زیادی روی حالت اسپین نسبت به رزیدوهای دورتر دارند. از روی تشدید اثر، فاصله بین اسیدهای آمینه را می‌توان با فرآیندهایی شبیه به مثلثات، محاسبه نمود. سپس این فواصل برای ساخت مدلی از ساختار سه‌بعدی پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با اینکه در NMR احتیاجی به بلوری کردن پروتئین نیست (مزیت NMR)، این تکنیک محدود به پروتئین‌های کوچک‌تر از ۲۰ کیلودالتون می‌باشد. با وجود این، از NMR می‌توان برای جداسازی دُمین‌های پروتئین استفاده نمود. دُمین‌ها، ساختارهای پایداری بوده و به قدر کافی کوچک هستند تا با این تکنیک بررسی شوند.

نکات کلیدی بخش ۳.۶

تخلیص، شناسایی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها

- پروتئین‌ها را می‌توان از سایر اجزای سلولی و از همدیگر بر اساس تفاوت در خصوصیات شیمیایی و فیزیکی جدا کرد.
- سنجش‌های مختلفی برای شناسایی و اندازه‌گیری مقدار پروتئین استفاده می‌شود، بعضی سنجش‌ها، از واکنش‌های تولیدکننده نور برای سیگنالی که به راحتی شناسایی می‌شود بهره می‌گیرند. سنجش‌های دیگر، سیگنال رنگی را با استفاده از سوبستراهای رنگ زا و آنزیم‌ها تولید می‌کنند.

1- Cryoelectron microscopy

2- Nuclear Magnetic Resonance

■ سانتریفوژ پروتئین‌ها را بر اساس سرعت ته‌نشینی جدا می‌کند. سرعت ته‌نشینی بوسیله شکل و جرم پروتئین تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

■ الکتروفورز پروتئین‌ها را بر اساس سرعت حرکت‌شان در یک میدان الکتریکی جدا می‌کند. الکتروفورز ژن پلی‌آکریل آمید-SDS(PAGE) می‌تواند زنجیره‌های پلی‌پپتیدی را که وزن ملکولی‌شان ۱۰٪ یا کمتر یا هم تفاوت دارد، از هم جدا کند. (شکل ۳۵-۳ را ملاحظه کنید). الکتروفورز ژل دوبعدی قدرت تفکیک بیشتری را در الکتروفورز فراهم می‌نماید. در الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها اول بر اساس بار (بعد اول) و سپس بر اساس جرم از همدیگر جدا می‌شوند. (بعد دوم).

■ کروماتوگرافی مایع پروتئین‌ها را بر اساس حرکتشان از یک ستون پر شده از دانه‌های کروی جدا می‌کند. پروتئین‌هایی متفاوت از لحاظ جرم با ستون‌های فیلتراسیون ژلی، متفاوت از لحاظ بار با ستون‌های تعویض یون و متفاوت از لحاظ خصوصیات اتصال به یک لیگاند با کروماتوگرافی تمایلی جدا می‌شوند (شکل ۳۷-۳ را ملاحظه کنید).

■ آنتی‌بادی‌ها موادی قدرتمند برای شناسایی تعیین مقدار و جدانمودن پروتئین‌ها هستند.

■ لکه‌گذاری با ایمونوگلوبین‌ها، لکه‌گذاری وسترن نیز نامیده شده و روشی است که مکرراً جهت مطالعه و پروتئین‌های خاص استفاده می‌شود. این روش با بهره‌گیری از آنتی بادی‌ها و جداسازی با تفکیک بالای پروتئین توسط SDS-PAGE روشی بسیار اختصاصی و حساس در شناسایی پروتئین محسوب می‌شود.

■ رادیوایزوتوپ‌ها نقش کلیدی در مطالعه پروتئین‌ها و مولکول‌های زیستی دیگر دارد. آنها را می‌توان بدون تغییر شیمیایی مولکول به آن اضافه و یا بصورت دنباله‌ای به مولکول‌ها متصل نمود. از آنها می‌توان برای کمک به تشخیص سنتز پروتئین جایگیری، پردازش و پایداری پروتئین‌ها استفاده کرد.

■ اتورادیوگرافی تکنیک نیمه‌کمّی برای تشخیص مولکول‌های نشاندار با مواد رادیواکتیو در سلول‌ها، بافت‌ها یا ژل‌های الکتروفورز است.

■ نشاندارکردن ضربه - تعقیب می‌تواندسرنوشت درون سلولی پروتئین‌ها و متابولیت‌های دیگر را تعیین کند.

■ طیف‌سنجی جرمی روشی بسیار حساس و دقیق برای شناسایی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها و پپتیدها است.

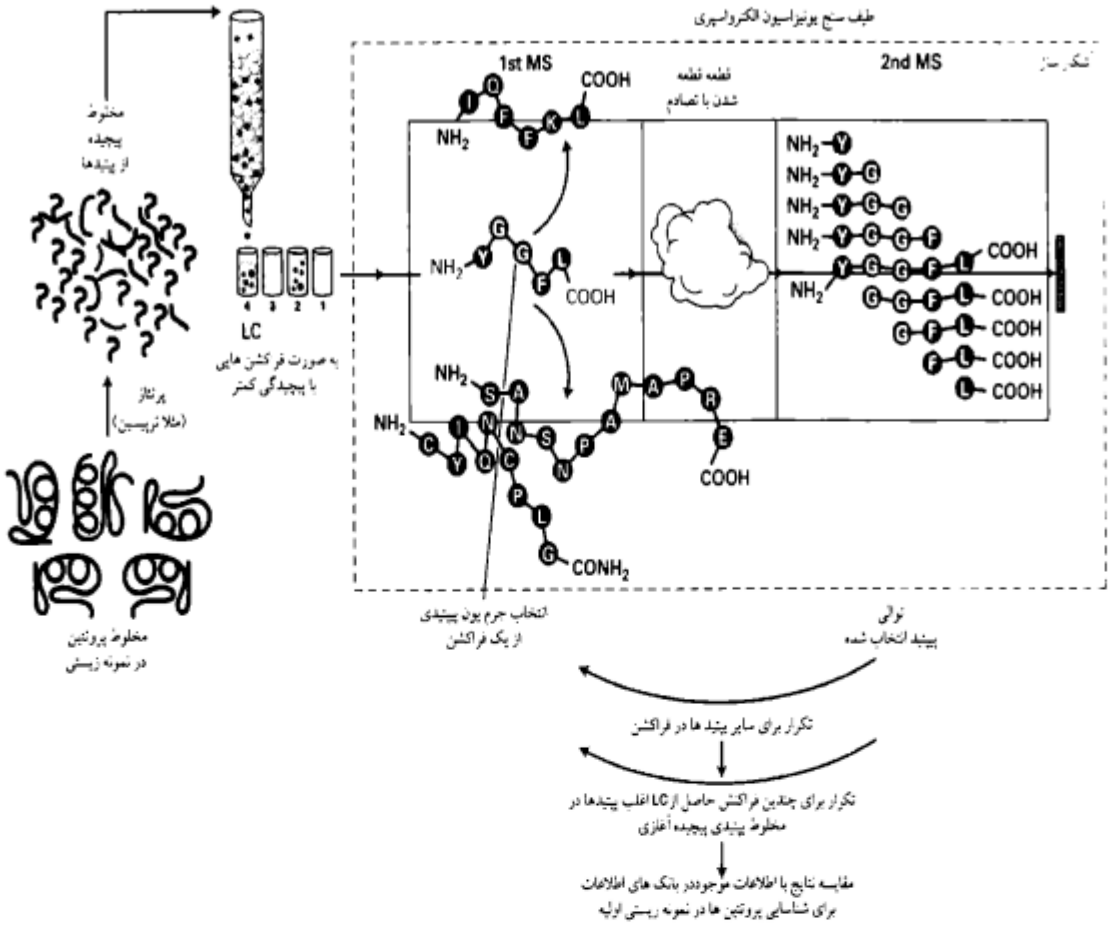
■ ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌ها با کریستالوگرافی اشعه x، میکروسکوپ کرایوالکترون و NMR تعیین می‌شود. کریستالوگرافی اشعه x اطلاعات زیادی درباره ساختار پروتئین‌ها می‌دهد اما این روش احتیاج به کریستال کردن پروتئین‌ها دارد. میکروسکوپ کرایوالکترون کاربرد زیادی در کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ که بلوری کردنشان مشکل است دارد. فقط پروتئین‌های کوچک برای بررسی با NMR مناسب می‌باشند.

۳-۷ پروتئومیکس

در قرن بیستم اغلب مطالعه پروتئین‌ها به تجزیه و تحلیل پروتئین‌ها به‌طور انفرادی محدود می‌شد. به عنوان مثال، یک محقق آنزیمی را با تعیین فعالیت آنزیمی (سوبسترا، محصولات، سرعت واکنش، نیاز به کوفاکتور، pH و غیره)، ساختار و مکانیسم عمل آن، مطالعه می‌کرد. در بعضی موارد ارتباطات بین چند آنزیم محدود که در مسیر متابولیسمی شرکت می‌کردند نیز مورد مطالعه قرار می‌گرفت. در مقیاس وسیع‌تر موقعیت و فعالیت آنزیم در سلول یا بافت مورد بررسی قرار می‌گرفت. تأثیر جهش‌ها، بیماری‌ها یا داروها بر روی بیان و فعالیت آنزیم موضوعاتی بودند که مطالعه می‌شدند. این مطالعات اطلاعات زیادی را درباره عملکرد و مکانیسم عمل پروتئین‌ها به‌طور انفرادی و همچنین تعداد نسبتاً کمی از پروتئین‌های میانکش‌دهنده فراهم نمود. با این حال، این روش یک به یک جهت، مطالعه پروتئین‌ها برای فراهم نمودن تصویری کلی از رخدادهای موجود در پروتئوم یک سلول، بافت یا کل موجود زنده، کارآمد نبود.

پروتئومیکس مطالعه همه پروتئین‌ها و یا مجموعه زیادی از آنها در یک سیستم زیستی است

ظهور ژنومیکس (تعیین توالی DNA ژنومی و تکنولوژی‌های همراه آن، مثل آنالیز همزمان سطح همه mRNAها در سلول‌ها و بافت‌ها) به وضوح نشان داد، روش کل یا سیستمی در زیست‌شناسی می‌تواند اطلاعات خیلی ارزشمند و بی‌نظیری را فراهم نماید. اغلب دانشمندان فهمیدند که آنالیز کلی پروتئین‌ها در سیستم‌های زیستی، سهم زیادی در دانسته‌های ما دارد. بنابراین زمینه‌ای جدید به نام



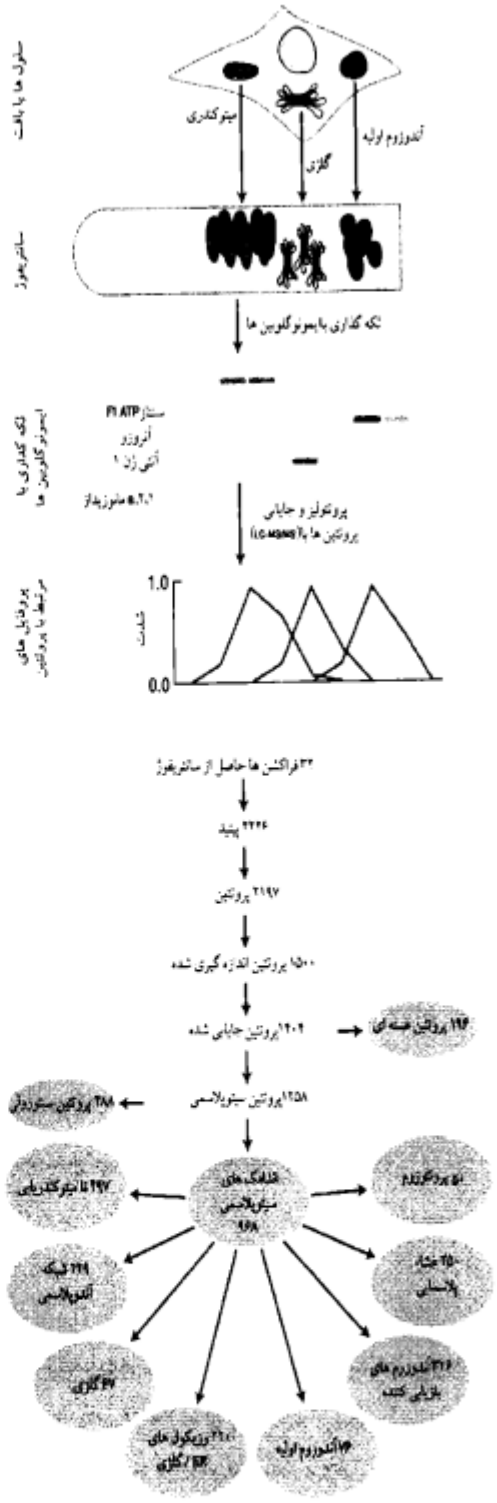
▲ **شکل تجربی ۳-۴۳ LC-MS/MS برای شناسایی پروتئین‌ها در یک نمونه زیستی پیچیده استفاده می‌شود.** مخلوطی پیچیده از پروتئین‌ها در یک نمونه زیستی (مثلاً، اندامک‌های گلژی) با پروتئاز هضم می‌شوند، مخلوطی از پپتیدهای حاصل به وسیله کروماتوگرافی مایع (LC) به چندین فراکشن با تعداد پپتید کم‌تر تقسیم شده و به صورت آرام و پیوسته با یونیزاسیون الکترواسپری به داخل طیف‌سنج تاندوم تزریق می‌شوند. فراکشن‌ها پشت سر هم به چرخه‌های چندگانه MS/MS وارد می‌گردند تا جرم‌ها و توالی‌های اغلب پپتیدها تعیین شوند. سپس با استفاده از این اطلاعات و مقایسه آنها با اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی، پروتئین‌های موجود در نمونه زیستی اولیه شناسایی می‌شوند.

پروتئومیکس[1] متولد شد. پروتئومیکس، مطالعه علمی مقدار تغییرات، میانکنش‌ها، جایابی و عملکرد همه پروتئین‌ها یا مجموعه‌ای از آنها در موجود زنده، و یا در سطوح بافتی، سلولی و زیر سلولی است.

شماری از سؤالات مهم در مطالعات پروتئومیکس به صورت زیر است:

- در یک نمونه (موجود زنده، بافت، سلول، ترکیبات زیر سلولی) چه نسبتی از کل پروتئوم بیان می‌شود (یا کدام پروتئین‌ها وجود دارند)؟
- از بین پروتئین‌های موجود در نمونه، فراوانی نسبی آنها چقدر است؟
- فراوانی نسبی اشکال مختلف پیرایش و تغییر شیمیایی یافته (همچون فسفریله شده، متیله شده یا استیله شده با اسید چرب) از پروتئین‌ها چقدر است؟
- کدام پروتئین‌ها در کمپلکس‌های چند پروتئینی بزرگ وجود داشته و کدام پروتئین‌ها در هر کمپلکسی وجود دارند؟ عملکرد این کمپلکس‌ها چیست و چگونه آنها میانکنش می‌دهند؟
- هنگامی که حالت (مثلاً سرعت رشد، مرحله چرخه سلولی، تمایز، سطح استرس) سلول تغییر می‌یابد، آیا پروتئین‌ها در سلول و پروتئین‌های ترشح شده از سلول در جهت مشخصی تغییر می‌یابند

1- proteomics



(شبیه به انگشت‌نگاری)؟ کدام پروتئین‌ها تغییر می‌یابند و چگونه (مقادیر نسبی، تغییرات، شکل‌های پیرایش یافته و غیره)؟ (این شکلی ژاز نمای بیان پروتئین بوده و نمای رونویسی (mRNA) را که در فصل ۷ توضیح داده شده تکمیل می‌کند).

■ آیا می‌توان از چنین تغییر شبیه به انگشت‌نگاری برای اهداف تشخیصی بهره برد؟ به عنوان مثال، آیا سرطان‌های خاص یا بیماری قلبی باعث تغییرات خاصی در پروتئین‌های خون می‌شوند؟ آیا انگشت‌نگاری پروتئومیک می‌تواند تعیین کند، یک سرطان، به کدام داروی شیمی‌درمانی حساس و به کدام یک مقاوم است؟ انگشت‌نگاری‌های پروتئومیک می‌توانند نقطه شروع در مطالعه مکانیسم‌های مؤثر در تغییر حالت [سلولی] باشند. پروتئین‌ها (و مولکول‌های زیستی دیگر) تغییراتی را نشان می‌دهند که برای یک مرحله خاص، ارزش تشخیصی داشته و **مارکرهای زیستی**[1] نامیده می‌شوند.

■ آیا تغییرات در پروتئوم می‌تواند در تعیین هدف‌های داروها کمک کند و یا می‌تواند مکانیسم‌هایی را ارائه نماید که به وسیله آنها داروها احتمالاً اثرات جانبی سمی را ایجاد می‌کنند؟ اگر این‌چنین باشد، مهندسی نسخه‌های تغییر یافته داروها امکان‌پذیر خواهد بود تا اثرات جانبی کم‌تری داشته باشند.

این‌ها تنها سؤالات محدودی بود که می‌توان با استفاده از پروتئومیکس به آنها پاسخ داد. روش‌های مورد استفاده در پاسخ دادن به این سؤالات، مثل خود سؤالات متنوع بوده و شمار این روش‌ها به سرعت در حال رشد است.

◀ شکل تجربی ۴۴-۳ سانتریفوژ شیب چگالی و LC-MS/MS برای شناسایی اغلب پروتئین‌ها در اندامک‌ها استفاده می‌شوند. a) سلول‌های بافت کبد به‌طور مکانیکی شکسته شده، اندامک‌های آن آزاد می‌شود. اندامک‌های آزاد شده به‌طور نسبی با سانتریفوژ شیب چگالی جدا می‌گردند. موقعیت اندامک‌ها (که به موازات شیب چگالی جدا می‌شوند و بعضی مواقع با هم همپوشانی دارند) به وسیله نقطه‌گذاری با آنتی‌بادی‌هایی که پروتئین‌های ویژه هر اندامک را می‌شناسند، تعیین می‌شوند. فراکشن‌های حاصل از شیب چگالی، پروتئولیز شده و برای شناسایی پپتیدها (در اینجا پروتئین‌ها) در هر فراکشن، در دستگاه LC-MS/MS قرار می‌گیرند. مقایسه موقعیت اندامک‌ها در شیب چگالی (پروفایل نمودن پروتئین مرتبط نیز نامیده می‌شوند) امکان می‌دهد تا اغلب پروتئین‌ها را به یک یا چند اندامک (شناسایی پروتئوم اندامک) نسبت دهیم. b) به تجزیه و تحلیل سلسله مراتبی اطلاعات حاصل از روش ذکر شده در قسمت (a) توجه نمایید، نه تنها همه پروتئین‌های شناخته شده در این روش را می‌توان به اندامک‌ها نسبت داد، بلکه بعضی از پروتئین‌ها نیز هستند که به بیش از یک اندامک نسبت داده می‌شوند.

1- Bio Markers

تکنیک‌های پیشرفته در طیف‌سنجی جرمی برای آنالیز پروتئومیک ضروری هستند

پیشرفت در تکنولوژی‌های پروتئومیکس (همچون طیف‌سنجی جرمی) تأثیر عمیقی بر نوع سؤالاتی داشت که می‌توانستند به‌طور عملی مورد آزمایش قرار گیرند. برای سالیان‌متمادی، الکترفورز دوبعدی به محققان این امکان را می‌داد تا مخلوطی از پروتئین‌ها را جدا نموده، نشان داده و تعیین خصوصیت نمایند (شکل ۳ـ۳۶). لکه‌ها را از ژل دوبعدی می‌توان جدا و با استفاده از پروتئولیز (مثلاً به وسیله هضم با تریپسین) قطعه قطعه نمود و سپس قطعات را با استفاده از MS شناسایی نمود. روش جایگزین برای ژل دوبعدی، LC-MS/MS با *کارایی بالا* است. شکل ۳-۴۳ روش کلی LC-MS/MS را نشان می‌دهد که در آن مخلوط پیچیده پروتئینی با پروتئاز هضم شده و قطعات پپتیدی زیادی ایجاد می‌کند، این قطعات به وسیله LC به چندین جزء تقسیم می‌شوند. این اجزاء پیچیدگی کم‌تری داشته و به‌طور آرام و پیوسته با استفاده از یونیزاسیون الکترواسپری به داخل طیف‌سنج جرمی تاندوم تزریق می‌شوند. سپس فراکشن‌های پشت سر هم در چرخه‌های چندگانه MS/MS قرار می‌گیرند تا توالی اغلب پپتیدها تعیین و با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی، پروتئین‌های موجود در نمونه زیستی اولیه شناسایی شوند.

در شکل ۳ـ۴۴ مثالی از استفاده LC-MS/MS برای شناسایی پروتئین‌ها در هر اندامک، دیده می‌شود. سلول‌های بافت کبد موش به صورت مکانیکی شکسته می‌شود تا اندامک‌های آن آزاد شوند، اندامک‌ها به‌طور نسبی با سانتریفوژ شیب چگالی جدا می‌شوند. موقعیت اندامک‌ها در شیب چگالی با

استفاده از نقطه‌گذاری با آنتی‌بادی‌هایی که پروتئین‌های ویژه اندامک را می‌شناسند، تعیین می‌شود. اجزاء از شیب چگالی وارد LC-MS می‌شوند تا پروتئین‌های موجود در هر اجزاء شناسایی و پراکندگی آنها در شیب چگالی پروتئین‌ها با پراکندگی اندامک‌ها مقایسه شود. این عمل امکان می‌دهد تا بیشتر پروتئین‌ها را به یک یا چند اندامک نسبت دهیم.

پروتئومیکس با روش‌های ژنتیک مولکولی ترکیب شده و به طور متداول برای شناسایی همه کمپلکس‌های پروتئینی در سلول یوکاریوتی مخمر **ساکارومایسیس سرویزیه** مورد استفاده قرار می‌گیرد. تقریباً ۵۰۰ کمپلکس مورد شناسایی قرار گرفته است که در هر کدام به‌طور متوسط ۴/۹ پروتئین متفاوت وجود دارد. این پروتئین‌ها حداقل در ۴۰۰ میانکنش کمپلکس به کمپلکس نقش دارند. چنین مطالعات علمی در پروتئومیک، نگرش جدیدی را به سازمان‌یابی پروتئین‌ها در داخل سلول‌ها و چگونگی عملکرد پروتئین‌ها با همدیگر برای زنده ماندن و عملکرد سلول‌ها فراهم می‌آورد.

نکات کلیدی بخش ۳.۷

پروتئومیکس

- پروتئومیکس مطالعه علمی مقادیر (و تغییر مقادیر)، تغییرات، میانکنش‌ها، جایگیری‌ها و عملکرد همه یا مجموعه‌ای از پروتئین‌ها در سیستم‌های زیست شناختی در کل موجود زنده، بافت، سطوح سلولی و زیرسلولی می‌باشد.
- پروتئومیکس نگرشی پایه‌ای برای سازمان‌یابی پروتئین‌ها در دورن سلول‌ها فراهم می‌نماید. چگونگی این سازمان‌یابی تحت تأثیر حالت سلولی (همچون تمایز به انواع سلول‌ها، پاسخ به استرس، بیماری و داروها) است.
- روش‌های متنوعی همچون الکتروفورز دوبعدی، سانتریفوژ شیب چگالی و طیف‌سنجی جرمی (LC-ms/ms , MALDI-Tof) استفاده می‌شود.
- پروتئومیکس به شروع شناسایی پروتئوم اندامک‌ها (پروفایل پروتئوم اندامک) و سازمان‌یابی پروتئین‌ها به صورت کمپلکس‌های چندپروتئینی کمک کرده است. کمپلکس‌های چندپروتئینی بصورت شبکه‌ای کمپلکس میانکنش داده و از حیات و عملکرد سلولی پشتیبانی می‌کند.

چشم‌اندازی به آینده

گسترش شگفت‌انگیز قدرت محاسباتی کامپیوتری، عامل اصلی پیشرفت تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها است. به عنوان مثال، از کامپیوتری با لامپ خلاء برای تعیین ساختار اولین پروتئینی با استفاده از کریستالوگرافی اشعه X استفاده می‌شد. در آینده محققین می‌خواهند ساختار پروتئین را فقط از روی توالی اسیدآمینه‌ای حاصل از توالی ژنتیکی، پیش‌بینی کنند. این مسأله محاسباتی به ابرکامپیوترها و یا گروهی از کامپیوترها که به‌طور همزمان کار می‌کنند، نیاز دارند. در حال حاضر، فقط ساختار دمین‌های خیلی کوچک با ۱۰۰ اسید آمینه و یاکم‌تر را می‌توان با قدرت تفکیک پایین پیش‌بینی نمود. با این حال، پیشرفت‌های پیوسته در محاسبه و مدل‌های تا خوردن پروتئین به همراه تعیین موتیف‌های ساختاری همه پروتئین‌ها، امکان پیش‌بینی ساختار پروتئین‌های بزرگ‌تر را

خواهد داد. با افزایش اطلاعات به‌طور نمایی درباره ساختار موتیف‌ها، دُمین‌ها و پروتئین‌ها، دانشمندان قادر خواهند بود تا موتیف‌ها را در یک پروتئین ناشناخته با تطبیق موتیف با توالی شناسایی نموده و با استفاده از این، ساختار سه‌بعدی پروتئین کامل را پیش‌بینی کنند.

روش‌های ترکیبی جدید کمک خواهند کرد تا ساختار ماشین‌های مولکولی را با قدرت تفکیک بالا تعیین نمود. گرچه اجتماعات ماکرومولکولی خیلی بزرگ، بلوری شدن و بنابراین تعیین ساختارشان با کریستالوگرافی اشعه x مشکل است، با این حال می‌توان با استفاده از میکروسکوپ کرایوالکترون از آنها در دمای هلیم مایع و انرژی بالای الکترون، تصویر تهیه نمود. بوسیله این تصاویر از میلیون‌ها ذره جداگانه که هر کدام نمای تصادفی از کمپلکس پروتئین را نشان می‌دهد، می‌توان ساختار سه‌بعدی پروتئین را ساخت. چون زیر واحدهای کمپلکس پروتئینی ممکن است به راحتی با کریستالوگرافی تعیین ساختار شود این ساختارهای به دست آمده از کریستالوگرافی اشعه x با مدل‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی تطابق یافته و بدین ترتیب ساختار کمپلکس‌های پیچیده، تعیین می‌شود. مثالی از این روش درباره ابرکمپلکس انتقال الکترون در فصل ۱۲ توضیح داده می‌شود.

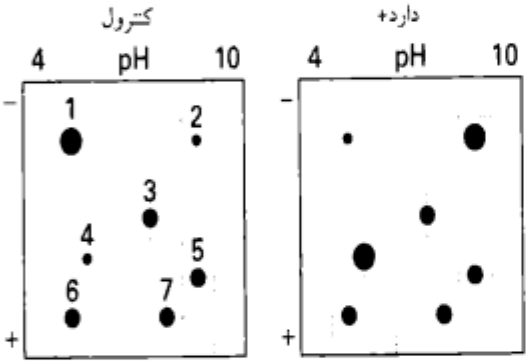
روش‌های تعیین ساختار سریع به همراه شناسایی سوبستراها و مهارکننده‌های جدید کمک خواهند کرد تا ساختارهای کمپلکس آنزیم ـ سوبسترا و حالت‌های گذار تعیین شده و بنابراین اطلاعات زیادی با توجه به مکانیسم‌های کاتالیزی آنزیم فراهم گردد.

با گسترش سریع تکنولوژی‌های نوین، انتظار می‌رود مسائل حل نشده در پروتئومیکس حل گردند. به نظر می‌رسد شناسایی و تعیین توالی پروتئین‌ها از مخلوط‌های پیچیده با استفاده از تکنولوژی‌های MS و بدون شکستن پروتئین‌ها به صورت پپتید، امکان‌پذیر باشد. مسئله موجود در آنالیز پروتئومیک مخلوط‌های پیچیده، مشکل بودن شناسایی قطعات پروتئینی می‌باشد که تفاوت غلظت آنها در نمونه بیش از ۱۰۰۰ برابر است. در چنین نمونه‌هایی از جمله پلاسمای خون، پروتئین‌های وجود دارند که غلظت‌شان در محدوده 10^{11} برابر متغیر است. آنالیز نمونه‌هایی با چنین غلظت‌های گسترده‌ای ارزش تشخیصی پروتئومیکس پلاسمای خون را به‌طور چشم‌گیری افزایش خواهد داد.

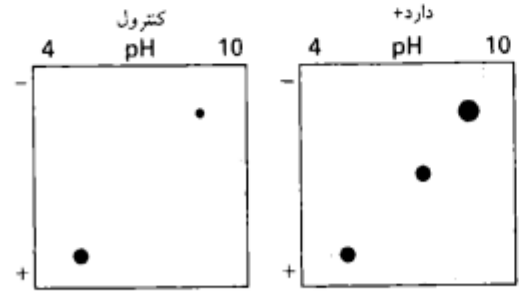
تجزیه و تحلیل داده‌ها

پروتئومیک شامل آنالیز کلی بیان پروتئین می‌باشد. همه پروتئین‌ها در سلول‌های کنترل و تیمار شده، استخراج و سپس با الکتروفورز ژل دوبعدی جدا می‌شوند. معمولاً صدها یا هزاران لکه پروتئینی در این روش جدا شده و سطوح پایای [تعادلی] هر پروتئین بین سلول‌های کنترل و تیمار شده مقایسه می‌شود. در مثال زیر، برای سادگی لکه‌های پروتئینی کمی نشان داده شده است. پروتئین‌ها در بعد اول براساس بار و به وسیله ایزوالکتریک فوکوسینگ (pH ۴ـ۱۰) و در بعد دوم براساس اندازه و به وسیله الکتروفورز ژل SDS ـ پلی‌آکریل‌آمید از هم جدا می‌شوند. پروتئین‌ها برای اینکه دیده شوند با رنگی هم‌چون کوماسی آبی رنگ‌آمیزی شده و شناسایی می‌گردند.

a) سلول‌ها با دارو تیمار داده می‌شوند (دارو +) و سلول‌های تیمار داده نشده به عنوان کنترل قرار می‌گیرند، سپس پروتئین استخراج شده و با الکتروفورز ژل دوبعدی جدا می‌شوند. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر نشان داده شده‌اند. شما چه نتیجه‌ای از تأثیر دارو بر سطوح پایای پروتئین‌های ۱ تا ۷ می‌گیرید؟

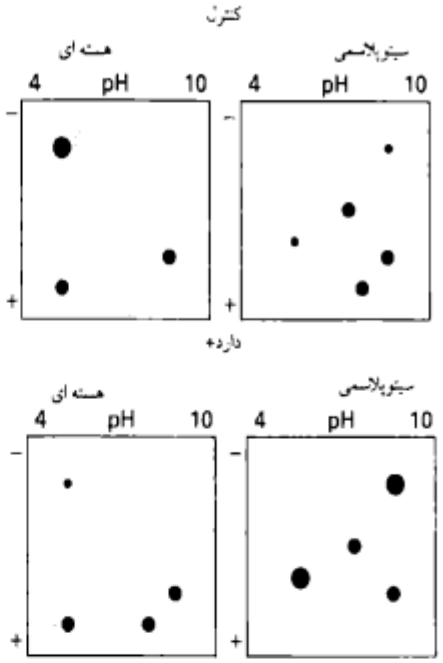


b) فرض کنید دارو بتواند پروتئین کینازی را القاء نماید. بنابراین آزمایش انجام شده در قسمت a را یک بار دیگر در حضور فسفات معدنی نشاندار ^{32}P تکرار نمایید. در این آزمایش ژل‌های دوبعدی در معرض فیلم اشعه x قرار می‌گیرند تا حضور پروتئین‌های نشاندار شده با ^{32}P مشخص شود. شما از این آزمایش درباره تأثیر دارو بر روی پروتئین‌های ۱ تا ۷ چه نتیجه‌ای می‌گیرید؟



c) برای تعیین موقعیت سلولی پروتئین‌های ۱ تا ۷، سلول‌ها در قسمت a با سانتریفوژ به صورت اجزاء هسته‌ای و سیتوپلاسمی جدا می‌گردند. الکتروفورز دوبعدی انجام می‌شود. ژل‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر نشان داده شده‌اند. شما چه برداشتی درباره جایگاه سلولی

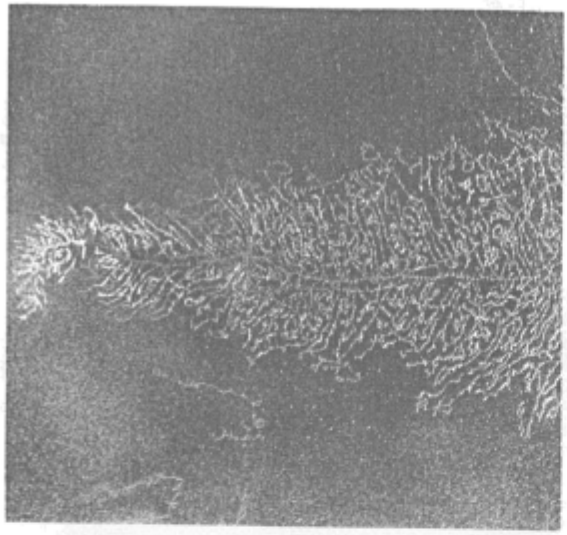
پروتئین‌های ۱ تا ۷ دارید؟



d) مشخصات کلی پروتئین‌های ۱ تا ۷ را با استفاده از اطلاعات قسمت‌های (a)، (b) و (c) به‌طور خلاصه بنویسید. توضیح دهید، چگونه می‌توانید مشابهت هر کدام از این پروتئین‌ها را نشان دهید؟

فصل ۴

مکانیسم‌های پایه‌ای ژنتیک مولکولی



میکروگراف الکترونی رنگی از یک واحد رونویسی RNA ریبوزومی در اووسیت زنوپوس. فرآیند رونویسی از سمت چپ به راست پیشروی کرده است. مجموعه‌های ریبونوکلئوپروتئینی ریبوزومی (rRNPs) ایجاد شده که طولشان رفته رفته بیشتر می‌شود قابل مشاهده هستند. مولکول‌های RNA پلیمراز I به صورت پشت سرهم در مرکز شکل روی DNA الگو در حال حرکت هستند.در این شکل همانطور که مشاهده می‌شود رشته‌های rRNP به طرف بالا و پائین DNA در حال الگوبرداری آرایش یافته‌اند و لذا شمای کلی شبیه به یک چتر می‌باشد. در هستک یک سلول زنده، rRNPهای تازه ایجاد شده در تمام جهات گسترش می‌یابند.

رئوس مطالب

۴.۱ ساختار اسیدهای نوکلئیک

۴.۲ رونویسی از ژن‌های رمزکننده پروتئین و تشکیل mRNA عملکردی

۴.۳ رمزگشایی mRNA توسط tRNAها

۴.۴ ساخت مرحله به مرحله پروتئین‌ها روی ریبوزوم‌ها

۴.۵ همانندسازی DNA

۴.۶ تعمیر و نوترکیبی DNA

۴.۷ ویروس‌ها: انگل‌های سیستم ژنتیکی سلول

اعمال متنوع پروتئین‌ها به عنوان ماشین‌های مولکولی، کاتالیزورهای سلولی و اجزا تشکیل دهنده ساختارهای سلولی در فصل سوم توضیح داده شد. در این فصل به نحوه ساخته شدن پروتئین‌ها و سایر فرآیندهای سلولی ضروری برای زنده ماندن یک موجود زنده و نسل‌های بعدی آن، می‌پردازیم. توجه ما روی مولکول‌های حیاتی اسیدهای نوکلئیک و اینکه اینها چگونه تمام اعمال سلولی را تحت کنترل دارند خواهد بود. همانطور که در فصل ۲ اشاره شد اسیدهای نوکلئیک پلیمرهای خطی متشکل از ۴ نوع نوکلئوتید می‌باشند (شکل‌های ۱۳-۲، ۱۶-۲ و ۱۷-۲). این ماکرومولکول‌ها: (۱) به خاطر توالی‌های دقیق نوکلئوتیدی که دارند حاوی اطلاعات برای توالی اسیدهای آمینه و بنابراین برای ساختار و عمل تمام پروتئین‌های یک سلول می‌باشند. (۲) اجزای تشکیل دهنده عملکردی مهم ماکرومولکولی سلولی هستند که اسیدهای آمینه را در ترتیب‌های صحیحی به عنوان زنجیره‌های پلی‌پپتیدی، انتخاب و ردیف می‌کنند. (۳) تعدادی از واکنش‌های شیمیایی اساسی مثل تشکیل پیوند پپتیدی بین اسیدهای‌آمینه را در طول فرآیند سنتز پروتئین در سلول کاتالیز می‌کنند.

داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) یک مولکول اطلاعاتی است که در توالی نوکلئوتیدی خود حاوی اطلاعات لازم برای ساخت تمام پروتئین‌ها و لذا سلول‌ها و بافت‌های یک موجود زنده می‌باشد. حالت ایده‌آل اینست که این مولکول این عمل را در سطح مولکولی انجام دهد. این مولکول از لحاظ شیمیایی تحت شرایط مختلف بسیار پایدار است. قابلیت بازیافت توالی‌های DNA از فسیل‌هایی با سن ده‌ها هزار سال شاهدی بر این ادعاست. به دلیل این پایداری و نیز به دلیل مکانیسم‌های تعمیر که در سلول‌های زنده صورت می‌گیرد، پلیمر بلند یک مولکول DNA می‌تواند طولی در حدود 10^9 نوکلئوتید داشته باشند. در واقع تمام اطلاعات لازم برای رشد یک سلول تخم لقاح یافته انسانی به یک فرد بالغ که از تریلیون‌ها سلول با اعمال اختصاصی تشکیل شده است می‌تواند در یک توالی ۴ نوکلئوتیدی ممکن که حدودا 3×10^9 جفت باز را در ژنوم انسان تشکیل می‌دهند ذخیره شود. به خاطر اصول جفت شدن بازها که در این فصل اشاره خواهد شد در هر تولیدمثلی، اطلاعات با نرخ خطای کمتر از ۱ خطا در 10^9 نوکلئوتید نسخه‌برداری می‌شوند (10^9 در ۱>). همانندسازی دقیق این اطلاعات در هر گونه، پیوستگی ژنتیکی آن را از نسلی به

نسل دیگر تضمین کرده و برای رشد عادی یک فرد ضروری می‌باشد. DNA به عنوان ژن یا ستون اطلاعات ژنتیکی در تمام اشکال حیاتی شناخته شده و این اعمال را بخوبی انجام می‌دهد ویروس‌های RNAی استثنا می‌باشند. با وجود این ژنوم این ویروس‌ها به اندازه‌ی بسیار کوتاه محدود شده است که این به خاطر ناپایداری نسبی RNA در مقایسه با DNA است که به آن خواهیم پرداخت). پس پی بردن به این مسئله که در واقع تمام اشکال حیات، DNA را برای آوردن اطلاعات ژنتیکی خود به کار می‌برند و از توالی‌های اسید نوکلئیک نسبتاً شایعی برای تشکیل توالی اسید آمینه‌ای به کار می‌برند. دلالت دارد بر اینکه تمام اشکال حیات از یک جد مشترک براساس ذخیره اطلاعات در توالی اسید نوکلئیک منشا می‌گیرند. این اطلاعات از طریق جفت شدن اختصاصی بین بازها قابل دسترسی و همانندسازی می‌شوند. اطلاعات ذخیره شده در DNA در واحدهای وراثتی دسته بندی شده‌اند که امروزه به عنوان **ژن** شناخته می‌شوند و صفات شناخته شده یک ارگانیسم را کنترل می‌کنند. در فرآیند نسخه‌برداری، اطلاعات ذخیره شده در DNA درون ریبونوکلئیک اسید (RNA) کپی می‌شود که این RNA دارای سه نقش شناخته شده در سنتز پروتئین می‌باشد:

بخش‌هایی از توالی نوکلئوتیدی DNA به **RNA پیک (mRNA)** که سنتز یک پروتئین خاص را القا می‌کند کپی می‌شوند. توالی نوکلئوتیدی یک مولکول mRNA حاوی اطلاعاتی هست که ترتیب صحیح اسیدهای آمینه را در طول فرآیند سنتز یک پروتئین تعیین می‌کند. مرحله قابل توجه تجمع متوالی اسیدهای آمینه در یک پروتئین هست که طی فرآیند **ترجمه**[1] mRNA رخ می‌دهد. در این فرآیند توالی نوکلئوتیدی یک mRNA توسط نوع دومی از RNA به نام **RNA ناقل (tRNA)** و نیز به کمک نوع سوم RNA یعنی **RNA ریبوزومی (rRNA)** و نیز پروتئین‌های همراه آن، «خوانده» می‌شود. tRNA اسیدهای آمینه صحیح را به توالی در حال رشد پروتئین اضافه می‌کند و این اسیدهای آمینه با پیوند پپتیدی به هم وصل شده تا پروتئین‌ها ساخته شوند. فرآیند سنتز RNA، **نسخه‌برداری**[2] نامیده می‌شود. چون «زبان» توالی نوکلئوتیدی DNA به دقت به توالی نوکلئوتیدی یک مولکول RNA الگوبرداری می‌شود. فرآیند سنتز پروتئین‌ها ترجمه نامیده می‌شود زیرا زبان توالی نوکلئوتیدی DNA و RNA به زبان توالی اسید آمینه‌ای پروتئین ترجمه می‌شود.

کشف ساختمان DNA در ۱۹۵۳ و به دنبال آن روشن شدن چگونگی هدایت DNA به ساخته شدن RNA که به دنبال آن تجمع پروتئین‌ها هم صورت می‌گیرد (فرآیندی که قرارداد اصلی[3] نامیده می‌شود) پیشرفت‌های عظیم و بزرگی بود که نشاندهنده روزهای اولیه زیست‌شناسی مولکولی می‌باشد. ولی این گونه بیان قرارداد اصلی به صورت: DNA→RNA→Protein به خوبی نقش پروتئین‌ها را در سنتز اسیدهای نوکلئیک نشان نمی‌دهد. علاوه بر این همانطور که در فصل ۷ اشاره شده است پروتئین‌ها مسئول عمده فرآیند **تنظیم بیان ژن** هستند. تنظیم بیان ژن یعنی کنترل این موضوع که آیا اطلاعات رمزگذاری شده در DNA سلول‌ها در زمان مناسبی از رشد و در قالب پروتئین‌های صحیحی رمزگشائی می‌شوند یا نه؟ برای مثال تنظیم بیان ژن اجازه می‌دهد که هموگلوبین تنها در سلول‌های قرمز مغز استخوان (رتیکولوسیت‌ها) که قرار است به چرخه سلول‌های قرمز خون (اریتروسیت‌ها) وارد شوند، بیان شود. بیان ژن نیز هدایت‌کننده نورون‌های در حال رشد برای ساخت سیناپس‌های صحیح (اتصالات) با 10^{11} نورون دیگر در حال رشد در مغز انسان نیز می‌باشد. فرآیندهای اساسی ژنتیک مولکولی یعنی همانندسازی DNA، نسخه‌برداری و ترجمه باید در نهایت وظیفه‌شناسی، سرعت و درستی تنظیم فرآیندها انجام شوند تا اینکه ارگانیسم‌های پیچیده پروکاریوتی و یوکاریوتی به صورت عادی و طبیعی رشد پیدا کنند. چنین منظور یا هدفی توسط فرآیندهای شیمیایی‌ای که با صحت فوق‌العاده‌ای انجام شده و با سطوح چندلایه نقاط کنترل یا نظارت، حاصل می‌گردد. باید اضافه کرد نقاط کنترلی مکانیزم‌هایی هستند که قبل از شروع یک مرحله بعدی، صحت انجام مراحل کلیدی و مهم را در مرحله قبلی بررسی می‌کنند. بیان فوق العاده تنظیم شده ژن‌ها که برای رشد یک موجود پرسلولی ضروری است نیازمند ادغام اطلاعات حاصل از پیام‌های ارسالی از طرف سلول‌های دور و سلول‌های همسایه (مجاور) و نیز یک برنامه مدون رشد هست که در مراحل اولیه رشد رویانی اجرا می‌شود و از سلول‌های نیایی (اجدادی) اقتباس شده است. تمام این تنظیم‌ها به توالی‌های کنترلی در DNA که با پروتئین‌هایی بنام عوامل رونویسی همکاری می‌کنند تا بیان هر ژنی را هماهنگ سازند وابسته هستند. توالی‌های RNAای که در فصل ۸ بحث می‌شوند و فرآیندهای پردازش RNA و ترجمه را تنظیم می‌کنند نیز در DNA رمزگذاری شده‌اند. لذا اعمال اسیدهای

1- Translation
2- Transcription
3- Central dogma

نوکلئیک همچون سیستم‌های مغزی و عصبی، مرکز یک سلول هستند در حالیکه پروتئین‌ها در محدودهٔ عملکرد خاصی که تخصص یافته‌اند فعالیت می‌کنند.

در این فصل ابتدا ساختار و ویژگی‌های DNA، RNA و اینکه چگونه ویژگی‌های متفاوت هر نوع از اسیدهای نوکلئیک، آنها را برای انجام نقش هایشان در سلول مناسب می‌کنند مورد توجه قرار می‌دهیم. در بخش‌های بعدی به بررسی فرآیندهای خلاصه شده در شکل ۱-۴، نسخه‌برداری DNA به صورت RNA اولیه، پردازش این مولکول‌های اولیه برای ایجاد مولکول‌های RNA واجد عملکرد، ترجمه mRNAها به پروتئین‌ها، و همانندسازی DNA خواهیم پرداخت. پس از ارائه طرح کلی نقش‌های مستقل mRNA، tRNA و rRNA در سنتز پروتئین به توضیح دقیقتر و جزئی‌تر اجزا تشکیل دهنده و مراحل بیوشیمیایی دخیل در فرآیند ترجمه خواهیم پرداخت. همچنین مسائل مولکولی دخیل در همانندسازی DNA و نیز ماشین پیچیده سلولی برای تضمین صحت کپی برداری از ماده ژنتیکی مورد توجه قرار خواهد گرفت. در ادامه به مقایسه این پدیده‌ها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها خواهیم پرداخت. در بخش بعدی اینکه چگونه آسیب‌های وارده به DNA ترمیم می‌شود و چگونه مناطق مربوط به بخش‌های مختلف DNA طی فرآیند نوترکیبی[1] معاوضه می‌شوند، مورد بررسی قرار می‌گیرد. بخش پایانی فصل بیانگر اطلاعات پایه‌ای درباره ویروس‌هاست که علاوه بر اینکه پاتوژن‌های شناخته شده‌ای هستند مدل‌های ارگانیسمی مهمی برای مطالعه سنتز ماکرومولکول‌ها و سایر فرآیندهای سلولی به شمار می‌آیند. ویروس‌ها در مقایسه با سلول‌ها، دارای ساختار نسبتاً ساده و ژنوم کوچکتری هستند که آنها را به ابزار مناسبی برای مطالعات ابتدایی در مورد اساس فرآیندهای همانندسازی DNA، نسخه‌برداری، ترجمه، نوترکیبی و بیان ژن تبدیل کرده است. ویروس‌ها امروزه هم برای آموختن مسائل مهم زیست‌شناسی سلولی مولکولی و هم به عنوان ابزارهای آزمایشگاهی برای ارسال هر ژن مورد نظر به درون سلول‌ها (ابزاری که امروزه برای تعیین اثر آنها در ژن درمانی انسانی آزموده می‌شوند) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۱-۴ ساختار اسیدهای نوکلئیک

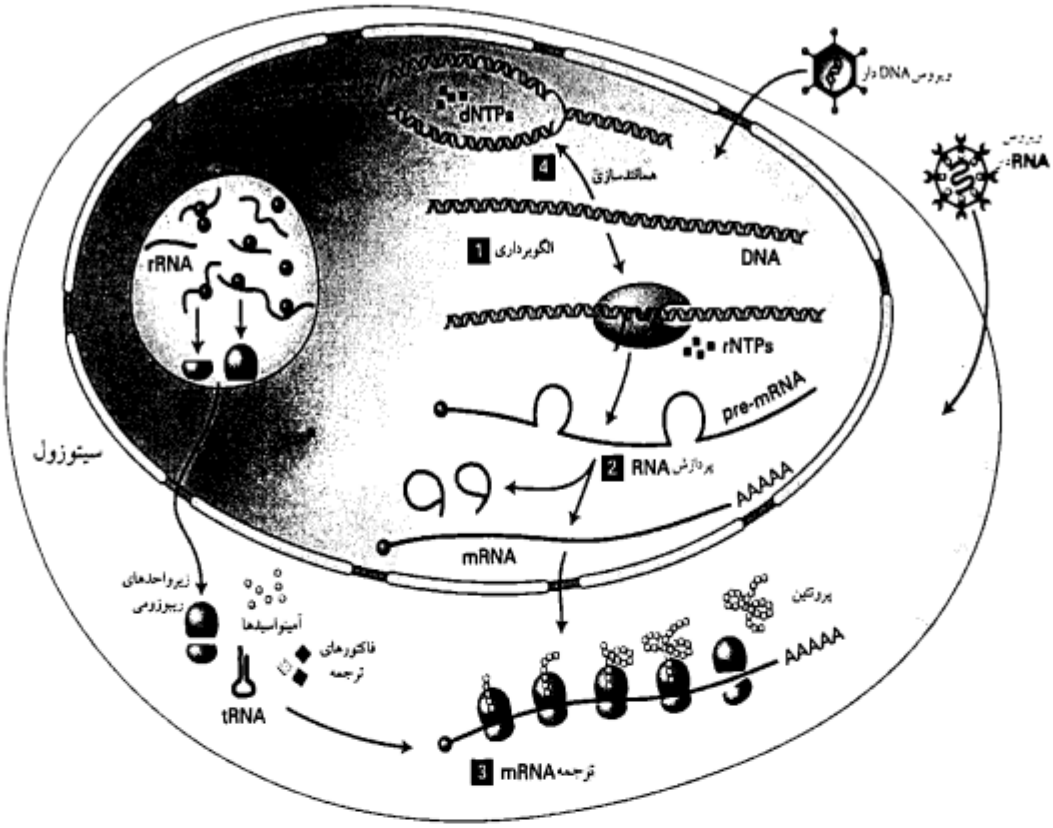
DNA و RNA از لحاظ شیمیایی خیلی شبیه هستند. ساختار اولیه هر دو **پلیمر** خطی تشکیل شده از **مونومرهایی** هست که **نوکلئوتید** نامیده می‌شود. عملکرد ابتدایی هر دو به عنوان مولکول‌های اطلاعاتی به توالی دقیق نوکلئوتیدی آنها برمی‌گردد. RNAهای سلولی از لحاظ طول از یک صد تا چند هزار نوکلئوتید تنوع دارند. مولکول‌های DNA سلولی می‌توانند تا چند صد میلیون نوکلئوتید طول داشته باشند. این واحدهای بزرگ DNAای تجمع یافته با پروتئین‌ها را می‌توان رنگ‌آمیزی کرده و با میکروسکوب نوری به عنوان کروموزوم‌ها مشاهده کرد. اسم کروموزوم بخاطر رنگ پذیری آن می‌باشد. RNA و DNA در عین شباهت شیمیایی، تفاوت‌های بسیار زیادی را نشان می‌دهند. به عنوان مثال، RNA می‌تواند به عنوان یک مولکول کاتالیزی عمل کند، که بعداً به آن اشاره خواهیم کرد. این تفاوت‌ها و ویژگی‌های منحصر بفرد DNA و RNA هست که هر کدام از آنها را برای نقش‌های اختصاصی‌شان در سلول مناسب کرده است.

یک رشته اسید نوکلئیک یک پلیمر خطی با جهت‌گیری انتها به انتها می‌باشد

در تمام موجودات زنده، DNA و RNA هر کدام تنها از چهار نوکلئوتید متفاوت تشکیل یافته‌اند. از فصل ۲ به یاد دارید که تمام نوکلئوتیدها دارای یک باز آلی متصل به قند پنج کربنه هستند که این قند پنج کربنه حاوی یک گروه فسفات متصل به کربن شماره ۵ می‌باشد. در RNA، قند ریبوز و در DNA، داکسی ریبوز می‌باشد (شکل ۱۶-۲). نوکلئوتیدهای به کار رفته در سنتز DNA و RNA حاوی یکی از پنج نوع باز مختلف هستند. باز آدنین (A) و گوانین (G)، **پورین‌ها** هستند که شامل یک جفت حلقه متصل به هم می‌باشند. و بازهای سیتوزین (C)، تیمین (T) و اوراسیل (U)، **پیریمیدین‌ها** هستند که یک حلقه منفرد دارند (شکل ۱۷-۲). سه تا از این بازها، A، G و C، هم در DNA و هم در RNA یافت می‌شوند. با وجود این T تنها در DNA و U تنها در RNA یافت می‌شود. (شایان ذکر است که نشانه‌های تک حرفی این بازها اغلب برای نشان دادن نوکلئوتیدها در پلیمرهای اسید نوکلئیک هم، به کار می‌رود.

یک رشته منفرد اسید نوکلئیک دارای یک ستون فقرات شامل واحدهای تکرارشونده پنتوز ـ فسفات هست که بازهای پورین و پیریمیدین زنجیره‌های جانبی آن را تشکیل می‌دهند. همانند یک پلی‌پپتید، یک اسید نوکلئیک نیز دارای جهت‌گیری شیمیایی انتها به انتها می‌باشد. انتهای ′۵ دارای یک گروه فسفات بر

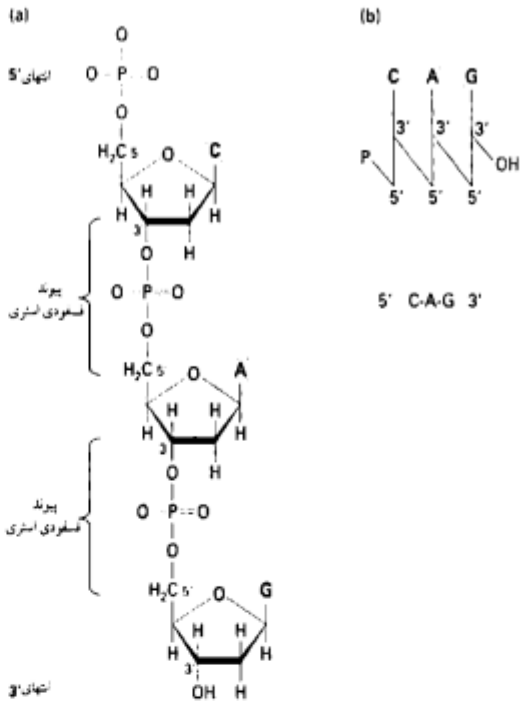
1- Recombination



▲ **شکل ۱ـ۴: مروری بر چهار پدیده اساسی ژنتیک مولکولی.** در این فصل به توضیح سه پدیده‌ای که منجر به تولید پروتئین‌ها می‌شوند:(❸ـ❶) و فرایند همانندسازی DNA (❹)خواهیم پرداخت. به علت این‌که ویروس‌ها از ماشین عملکردی سلول میزبان استفاده می‌کنند تبدیل به مدل‌های مهمی برای مطالعه این پدیده‌ها گردیده‌اند. در طول نسخه‌برداری یک ژن رمزدهی‌کننده پروتئین، رمز چهار بازی DNA که مخصوص توالی اسید آمینه‌ای یک پروتئین هست، توسط RNA پلیمراز(❶)به صورت mRNA پیک اولیه (pre-mRNA) رونویسی می‌شود که این کار از طریق پلیمریزاسیون مونومرهای ریبونوکلئوزید تری‌فسفات (rNTPs) انجام می‌گیرد. حذف توالی‌های غیررمزکننده و سایر تغییرات اعمال شده بر روی (❷) pre-mRNA، مجموعاً پردازش RNA نامیده می‌شود که باعث تولید mRNA دارای عملکرد می‌شود که به سیتوپلاسم فرستاده می‌شود. در طول ترجمه(❸)، رمز چهار بازی mRNA به صورت زبان بیست اسید آمینه‌ای پروتئین رمزگشایی می‌شود. ریبوزوم‌ها، ماشین‌های ماکرومولکولی که رمز mRNA را ترجمه می‌کند، از دو زیر واحد تشکیل شده‌اند که در هستک از RNAهای ریبوزومی (rRNAs) و چندین پروتئین ساخته می‌شوند (چپ). بعد از انتقال به سیتوپلاسم، زیر واحدهای ریبوزومی با یک RNA تجمع یافته و سنتز پروتئین را با کمک RNAهای ناقل (tRNAs) و عوامل ترجمه متنوع انجام می‌دهند. در طول همانندسازی(❹) DNA که تنها در سلول‌های آمادهٔ تقسیم رخ می‌دهد مونومرهای داکسی ریبو نوکلئوزید تری‌فسفات (dNTPs) برای ایجاد دو نسخه یکسان از هر مولکول DNA کروموزومی، پلیمریزه می‌شوند و هر سلول دختر یکی از نسخه‌های کاملاً یکسان را دریافت می‌نماید.

روی کربن ′۵ قند انتهایی و انتهای ′۳ معمولاً دارای یک گروه هیدروکسیل روی کربن ′۳ قند انتهایی است (شکل ۲ـ۴). این جهت‌گیری و این امر که سنتز در جهت ′۳←′۵ پیشروی می‌کند باعث شده است که توالی‌های پلی‌نوکلئوتیدی در جهت ′۳←′۵ (از چپ به راست) نوشته و خوانده شوند. به عنوان مثال، توالی AUG به صورت (′۳)AUG(′۵) در نظر گرفته می‌شود. همان‌طور که خواهیم دید جهت‌گیری ′۳←′۵ یک رشته اسید نوکلئیک، ویژگی مهمی برای مولکول می‌باشد. پیوند شیمیایی بین نوکلئوتیدهای مجاور، اغلب پیوند فسفودی استری نامیده می‌شود که در واقع شامل دو پیوند فسفواستر، یکی در سمت ′۵ فسفات و دیگری در سمت ′۳ می‌باشد.

توالی خطی نوکلئوتیدهای اتصال یافته با پیوندهای فسفودی



▲ **شکل ۲ـ۴: جهت‌گیری شیمیایی یک رشته اسید نوکلئیک:** تصویر تناوبی نشان داده شده در اینجا مربوط به یک تک رشته DNA هست که تنها حاوی سه باز سیتوزین (C)، آدنین (A) و گوانین (G) می‌باشد. (a) ساختار شیمیایی، نشان‌دهنده یک گروه هیدروکسیل در انتهای ′۳ و یک گروه فسفات در انتهای ′۵ می‌باشد. همچنین دو پیوند فسفواستری، نوکلئوتیدهای مجاور را به هم وصل می‌کند این ارتباط دو پیوندی، اغلب پیوند فسفودی استری نامیده می‌شود. (b) در شکل شاخه‌دار (بالا) قندها به صورت خطهای عمودی و پیوندهای فسفودی استری به صورت خطوط اریب نشان داده شده‌اند. بازها با حروف نشانه تک حرفی نمایش داده شده‌اند. در ساده‌ترین حالت (پایین) تنها بازها نشان داده شده‌اند. طبق قرارداد همیشه یک توالی پلی‌نوکلئوتیدی در جهت ′۳←′۵ (چپ به راست) نوشته می‌شود مگر این‌که جور دیگری بیان شود.

استری، ساختار اولیه اسیدهای نوکلئیک را تشکیل می‌دهند. همچون پلی‌پپتیدها، پلی‌نوکلئوتیدها هم می‌توانند پیچ خورده و به صورت ساختمان فضایی‌های سه بعدی پایدار شده با پیوندهای غیرکوالان در می‌آیند. اگرچه ساختمان‌های اول DNA و RNA عموماً شبیه هم هستند ولی ساختمان فضایی سه‌بعدی آنها کاملاً متفاوت می‌باشد. این تفاوت‌های ساختاری برای اعمال متفاوت این دو نوع اسید نوکلئیک ضروری می‌باشد.

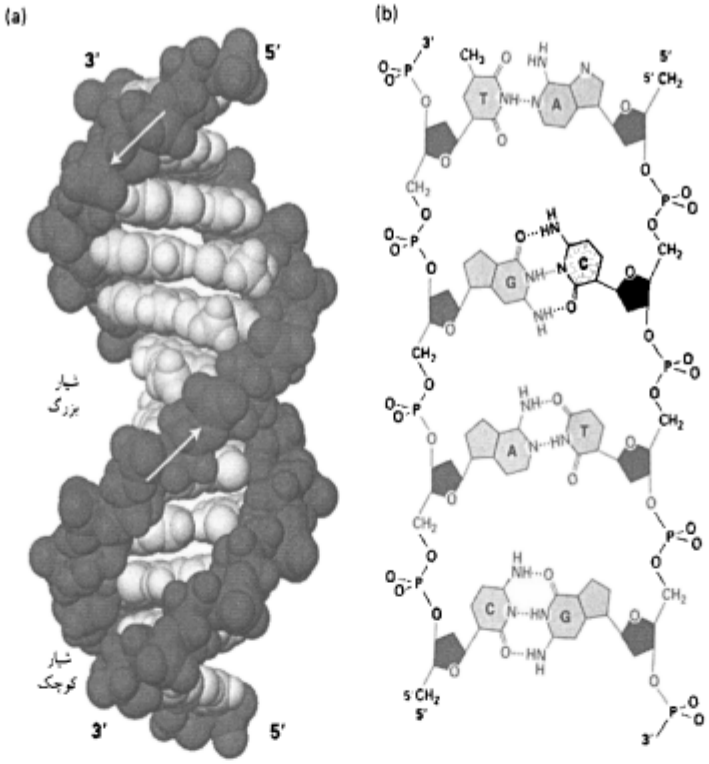
DNA طبیعی یک مارپیچ دوتایی از رشته‌های ناهمسوی مکمل می‌باشد

زمینه جدید زیست‌شناسی مولکولی در سال ۱۹۵۳ زمانی آغاز شد که جیمز واتسون و فرانسیس کریک پیشنهاد کردندکه DNA دارای ساختار مارپیچ دوتایی هست. پیشنهاد آنها که براساس بررسی الگوهای پراش اشعه x انجام گرفته توسط رزالین فرانکلین و لویس ویلکینز پایه‌گذاری شده بود که مسیر امروزی ما را در مورد درک چگونگی عملکرد DNA به عنوان ماده ژنتیکی تثبیت و هموار کرد.

DNA از دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی که دور هم پیچیده‌اند تشکیل شده تا یک مارپیچ دوگانه را ایجاد کند. دو ستون قند ـ فسفات در بیرون مارپیچ دوتایی و بازها در بخش داخلی آنها قرار دارند. بازهای مجاور هم در هر رشته به صورت صفحات موازی روی هم چیده شده‌اند (شکل ۳a ـ۴). جهت‌گیری دو رشته، ناهمسو می‌باشد یعنی جهت‌گیری ′۳←′۵ آنها مخالف هم می‌باشد. رشته‌ها با تشکیل جفت‌های بازی بین دو رشته در وضعیت منظم دقیقی نگه داشته می‌شوند: A با T توسط دو پیوند هیدروژنی و G با C توسط سه پیوند هیدروژنی جفت می‌شود (شکل ۳b ـ۴). این مکمل بودن باز به اندازه، شکل و ترکیب شیمیایی آنها برمی‌گردد. حضور هزاران عدد از این پیوندهای هیدروژنی باعث استحکام مارپیچ دوتایی در مولکول DNA می‌شود. میانکنش‌های هیدروفوب و واندروالسی بین جفت بازهای روی هم قرار گرفته، باعث استحکام بیشتر مارپیچ دوگانه می‌شود.

در DNA طبیعی، A همیشه با T و G با C پیوند هیدروژنی برقرار کرده و جفت بازهای A.T و G.C را همان‌طور که در شکل ۳b ـ۴ نشان داده شده، تشکیل می‌دهند. این تجمعات، همیشه بین یک پورین بزرگ‌تر و پیریمیدین کوچک‌تر، اغلب جفت بازهای واتسون کریکی نامیده می‌شوند. دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی و بنابراین مناطقی که تمام نوکلئوتیدها این‌گونه جفت بازها را ایجاد می‌کنند، مکمل نامیده می‌شوند. با وجود این در حالت تئوری و در DNAهای مصنوعی ، سایر جفت بازها نیز می‌توانند تشکیل شوند. به عنوان مثال: گوانین (یک پورین) به صورت تئوری می‌تواند با تیمین (یک پیریمیدین) پیوند هیدروژنی دهد که تنها باعث یک کجی جزئی در مارپیچ می‌شود. هم‌چنین فضای موجود در مارپیچ (مارپیچ) ممکن است باعث جفت شدن بین دو پیریمیدین سیتوزین و تیمین گردد.

اگرچه جفت بازهای غیراستاندارد G.T و C.T در حالت عادی در DNA یافت نمی‌شوند، ولی جفت‌های بازی G.U در مناطق مارپیچ دوتایی که در RNA تک رشته‌ای ایجاد می‌شوند اغلب

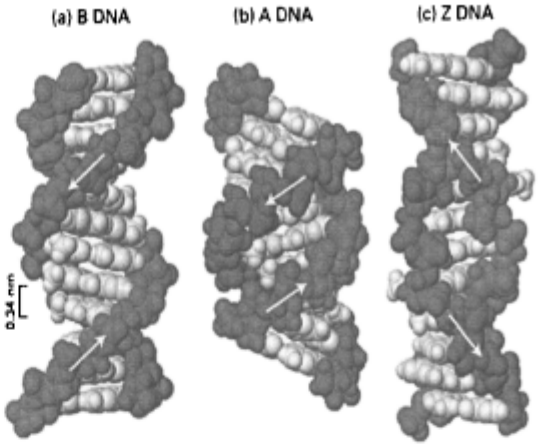


▲ **شکل ۳ـ۴: (شکل رنگی) مارپیچ دوگانه DNA.** (a) مدل فضا پرکنِ B DNA، شکل غالب DNA در سلول‌ها. بازها (سایه روشن‌ها)، از جانب ستون فقرات قند ـ فسفات (قرمز تیره و آبی) هر رشته به طرف داخل قرار دارند، ولی لبه‌های آنها از طریق شیار بزرگ و کوچک قابل دسترس می‌باشد. پیکان جهت‌گیری ۳'→۵' هر رشته را نشان می‌دهند. پیوندهای هیدروژنی بین بازها در مرکز ساختار واقع شده‌اند. شیارهای بزرگ و کوچک در اثر پیوندهای هیدروژنی بین دهنده‌ها و گیرنده‌ها ایجاد شده‌اند (زرد روشن). b) ساختار شیمیایی DNA دورشته‌ای. این طرح شماتیک دو ستون قند ـ فسفات و پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای واتسون ـ کریکی A.T و G.C را نشان می‌دهد.

حضور دارند. جفت‌های بازی غیراستاندارد در حالت طبیعی در DNA دورشته‌ای ایجاد نمی‌شوند که این به دلیل آنزیم کپی‌کننده DNA است که چنین اجازه‌ای به آنها نمی‌دهد و بعداً در این فصل به آن اشاره می‌شود.

بیشتر DNA سلولی از نوع مارپیچ راست گردان می‌باشد. الگوی پراش اشعه x مربوط به DNA نشان می‌دهد که فاصله بازهایی که به‌طور منظم در طول رشته روی هم قرار گرفته‌اند ۰/۳۴nm می‌باشد. مارپیچ در هر ۳/۴nm یک دور کامل می‌زند بنابراین در هر دور حدود ۱۰/۱ جفت باز وجود دارد. چنین حالتی شکل B از DNA است یعنی حالت طبیعی DNA که در بیشتر DNAها در سلول حضور دارد. در قسمت خارجی شکل B از DNA (B DNA) فضاهای بین رشته‌ای به هم تابیده شده، دو نوع شیار با عرض‌های متفاوت ایجاد می‌کنند که شیار بزرگ و شیار کوچک نامیده می‌شوند (شکل a ۳ـ۴). در نتیجه اتم‌های موجود در لبه‌های هر باز درون این شیارها از بیرون مارپیچ قابل دسترسی هستند و دو نوع سطح اتصالی را ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA می‌توانند از طریق تماس اتمی هم در شیار بزرگ و هم در شیار کوچک، توالی بازهای DNA را بخوانند.

علاوه بر ساختار B، ساختارهای دیگری هم از DNA توصیف شده است. دو تا از این ساختارها در شکل ۴ـ۴ با B DNA مقایسه شده است. در شرایط آزمایشگاهی که آب از DNA گرفته می‌شود، ساختار کریستالوگرافیک B DNA به شکل A تغییر می‌یابد که عریض‌تر و کوتاه‌تر از B DNA بوده و در آن جفت بازها نسبت به حالت عمود به محور مارپیچ قدری خم شده‌اند. مارپیچ‌های RNA-DNA و RNA-RNA در شرایط آزمایشگاهی در سلول‌ها به این شکل هستند. مولکول‌های کوتاه DNA متشکل از نوکلئوتیدهای متناوب پورین ـ پیریمیدین(خصوصاً Gها و Cها) به جای شکل مارپیچ راست‌گردان، به صورت مارپیچ متناوب چپ‌گرد در می‌آید. این ساختار به خاطر این‌که وقتی بازها از کنار مشاهده می‌شوند حالت زیگزالی دارد، شکل Z DNA نامیده می‌شود. برخی



▲ **شکل ۴ـ۴: (شکل رنگی) مدل‌های متنوع ساختارهای شناخته شده DNA:** ستون‌های قند ـ فسفات مربوط به دو رشته که در بخش بیرون تمام ساختارها قرار دارند به رنگ آبی و قرمز و بازها (سایه روشن) در بخش داخلی واقع شده‌اند. (a) حالت B در مورد DNA حدوداً دارای ۱۰/۱ جفت باز در هر دور مارپیچ می‌باشد. فاصله جفت بازهای روی هم قرار گرفته مجاور ۰/۳۴nm می‌باشد. (b) شکل فشرده‌تر A در هر دور دارای ۱۱ جفت باز و دارای خمیدگی بیشتر جفت‌های بازی نسبت به محور عمودی مرکز دو رشته می‌باشد. (c) Z DNA یک مارپیچ دورشته‌ای چپ‌گردان می‌باشد.

شواهد نشان می‌دهد که حالت Z DNA ممکن است در سلول‌ها حضور داشته باشد اگرچه عملکرد آن ناشناخته می‌باشد. در بیشتر مواقع تغییر خیلی مهمی در ساختار استاندارد B DNA در اثر اتصال پروتئین‌ها به توالی‌های خاص DNA بوجود می‌آید.

اگرچه پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب زیادی بین بازها باعث پایداری DNA می‌شود با وجود این مارپیچ دورشته‌ای حول محور طولی خود انعطاف‌پذیر می‌باشد. بر خلاف مارپیچ α در پروتئین‌ها (شکل ۴ـ۳)، هیچ پیوند هیدروژنی با محور مارپیچ DNA موازی نمی‌باشد. این قابلیت به DNA امکان می‌دهد تا هنگام اتصال پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA، دچار خمیدگی شود (شکل ۴ـ۵). خمیدگی DNA برای متراکم شدن آن در کروماتین ضروری می‌باشد. کروماتین، کمپلکسی از DNA ـ پروتئین هست و DNA هسته‌ای در سلول‌های یوکاریوتی به شکل کروماتین است (فصل ۶).

اما چرا بر خلاف RNA، این DNA است که به گونه‌ای تحول یافته تا حامل اطلاعات ژنتیکی سلول باشد؟ هیدروژن در موقعیت ′۲ در داکسی ریبوز DNA، آن را تبدیل به مولکول بسیار

▲ **شکل ۵ـ۴: میانکنش پروتئین می‌تواند DNA را خم کند.** دُمین حفظ شده مربوط به انتهای C پروتئین متصل‌شونده به جعبه TATA (TBP) به شیار کوچک توالی اختصاصی DNA غنی از A و T وصل می‌شود و پیچ مارپیچ دورشته‌ای را باز کرده و آن را به شدت خم می‌کند. رونویسی اغلب ژن‌های یوکاریوتی نیازمند دخالت TBP می‌باشد.

پایدارتر نسبت به RNA می‌گرداند که RNA به جای هیدروژن، دارای یک گروه هیدروکسیل در موقعیت ′۲ ریبوز می‌باشد (شکل ۱۶ـ۲). گروه ′۲ ـ هیدروکسیل در RNA در pH خنثی در فرایند هیدرولیز پیوند فسفودی استری کاتالیز شده توسط OH^- شرکت می‌کند (شکل ۶ـ۴). عدم حضور گروه ′۲ ـ هیدروکسیل در DNA از این فرایند جلوگیری می‌کند. بنابراین حضور داکسی‌ریبوز در DNA، آن را به یک مولکول بسیار پایدار تبدیل کرده که این پایداری یک ویژگی مهم برای عملکرد آن در ذخیره طولانی مدت اطلاعات ژنتیکی می‌باشد.

DNA می‌تواند دستخوش جدایی برگشت‌پذیر رشته‌ها شود

در طول همانندسازی و نسخه‌برداری DNA، رشته‌های مارپیچ دورشته‌ای باید از هم جدا شوند تا برای لبه‌های داخلی بازها این امکان فراهم شود که با بازهای نوکلئوتیدهای جدید که به صورت رشته جدیدی در حال پلیمریزه شدن هستند جفت شوند. در بخش‌های بعدی مکانیسم‌های سلولی که رشته‌های DNA را در طول همانندسازی و نسخه‌برداری از هم جدا کرده و پس از آن به هم وصل می‌کنند توصیف خواهیم کرد. در اینجا عوامل اساسی دخیل در جداسازی و بازآرایی رشته‌های DNA را بررسی می‌کنیم. این ویژگی‌های DNA از طریق بررسی در شرایط آزمایشگاهی روشن شده است.

جدا شدن رشته‌های DNA که تحت عنوان دناتوراسیون غیرطبیعی شدن) یا ذوب شدن بیان می‌شود می‌تواند به‌طور تجربی با افزایش دمای محلول حاوی DNA اعمال شود. با افزایش انرژی حرارتی، حرکات مولکولی افزایش یافته و نهایتاً باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی و سایر نیروهایی می‌شود که مارپیچ دورشته‌ای را پایدار می‌کنند، و سپس رشته‌ها جدا شده و در اثر دافعه الکترواستاتیک ستون‌های داکسی ریبوز ـ فسفات دارای بار منفی، هر کدام از رشته‌ها کنار زده می‌شوند. یک افزایش کوچک در دمای نزدیک دمای دناتوراسیون باعث از دست رفتن سریع و تقریباً همزمان چندین میانکنش ضعیف در طول DNA می‌شود که رشته‌ها را با هم نگه داشته‌اند. چون جفت بازهای روی هم قرار گرفته در دورشته DNA نسبت به بازهای روی هم چیده نشده یا ردیف نشده در DNA تک رشته‌ای، نور ماوراء بنفش (UV) کمتری را جذب می‌کنند، لذا باعث یک افزایش ناگهانی در جذب UV [در زمان دناتوراسیون DNA] می‌شود. این پدیده هیپرکرومیسیتی[1] نامیده می‌شود (شکل ۴ـ۷a).

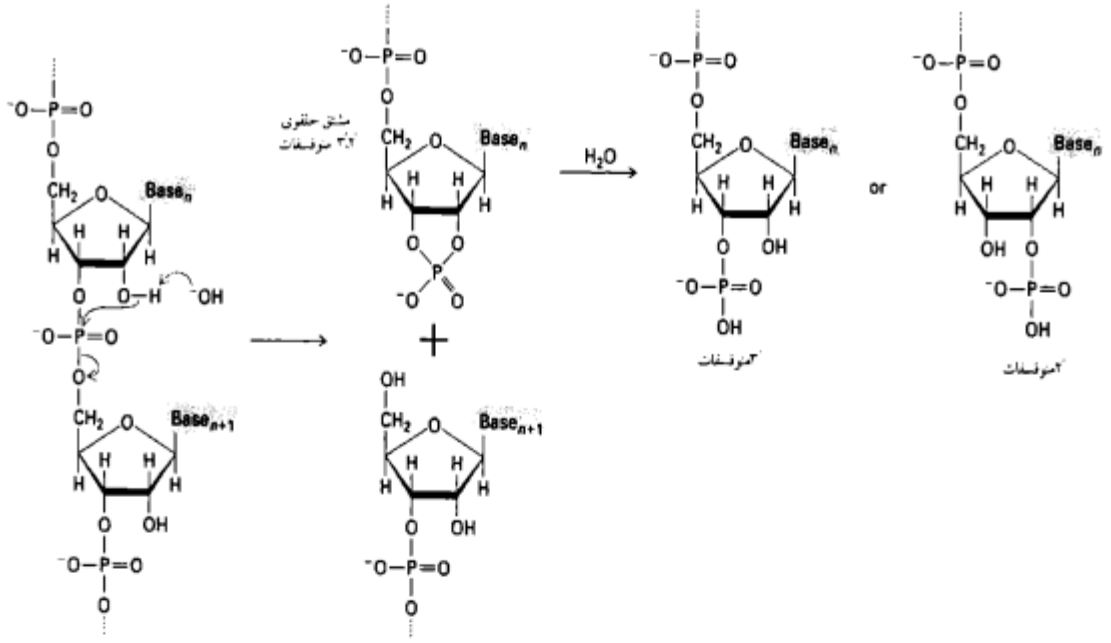
دمای ذوب (T_m) دمائی است که در آن، رشته‌های DNA به خاطر عوامل مختلفی از هم جدا می‌شوند. مولکول‌هایی که حاوی جفت‌های C.G بیشتری هستند چون بین G.C سه پیوند هیدروژنی وجود دارد استحکام پیوندی آنها بیشتر از جفت‌های T.A است که فقط دو پیوند هیدروژنی دارند، لذا این مولکول‌ها نیازمند دماهای بالاتری برای دناتوره شدن هستند. در واقع درصد جفت بازهای C.G در یک DNA نمونه را می‌توان از روی T_m آن تخمین زد (شکل ۴ـ۷b). غلظت یونی نیز روی T_m تأثیر می‌گذارد به خاطر این‌که بار منفی گروه‌های فسفات در دو رشته توسط یون‌های دارای بار مثبت پوشیده می‌شود. زمانی که غلظت یون پایین است میزان این پوشش کاهش می‌یابد و لذا نیروهای دافعه بین رشته‌ها افزایش یافته و در نتیجه T_m کاهش می‌یابد. عواملی که پیوندهای هیدروژنی را سست می‌کنند مانند فرمامید یا اوره، T_m را نیز کاهش می‌دهند. در نهایت، نوسانات pH [چه بازی، چه اسیدی] در دماهای پایین باعث دناتوره شدن DNA می‌شود. در pH پایین (اسیدی)، بازها پروتونه و لذا واجد بار مثبت شده و همدیگر را دفع می‌کنند. در pH بالا (قلیایی) بازها پروتون از دست داده و واجد بار منفی می‌شوند و باز هم به خاطر بار مشابه همدیگر را دفع می‌کنند. در سلول‌ها، دما و pH تا حد زیادی ثابت نگه داشته می‌شود. این ویژگیهای جدا شدن [DNA که در بالا اشاره شد] برای دستکاری آن در آزمایشگاه بسیار مفید می‌باشد.

مولکول‌های DNA تک رشته‌ای که در اثر دناتوراسیون ایجاد شده‌اند، حلقه‌های تصادفی[2] بدون هیچ ساختار منظمی ایجاد می‌کنند. کاهش دما و افزایش غلظت یون یا خنثی کردن pH باعث می‌شود که رشته‌های مکمل به صورت یک مارپیچ دورشته‌ای کامل درآیند. دامنه این رناتوراسیون (دوباره طبیعی شدن) به زمان، غلظت DNA و غلظت یونی بستگی دارد. دو رشته DNA که توالی‌هایشان رابطه مکملی ندارد به صورت حلقه تصادفی باقی مانده و رناتوره نمی‌شوند و از همه مهم‌تر این‌که دیگر مانع نمی‌گردند که جفت رشته‌های مکمل همدیگر را پیدا کرده و رناتوره شوند. دناتوراسیون و رناتوراسیون DNA اساس هیبریدیزاسیون اسیدهای نوکلئیک هستند. هیبریدیزاسیون تکنیک قدرتمندی است که برای مطالعه رابطه بین دو DNA نمونه و نیز تشخیص و جداسازی اختصاصی مولکول‌های DNA در یک مخلوط حاوی تعداد زیادی توالی‌های متفاوت DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱۶ـ۵).

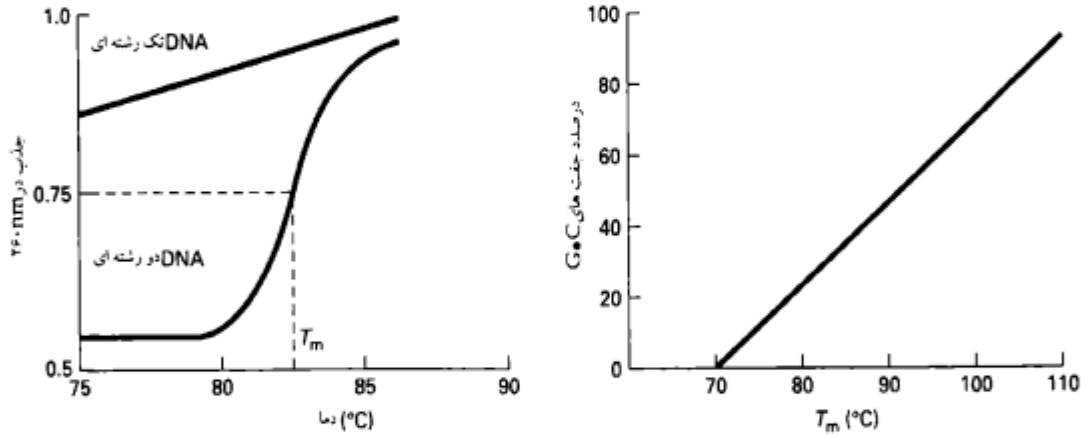
تنش پیچشی در DNA توسط آنزیم‌ها برطرف می‌شود

بسیاری از DNAهای ژنوم پروکاریوتی و بسیاری از DNAهای ویروسی، مولکول‌هایی حلقوی هستند. مولکول‌های DNA حلقوی در میتوکندری که در اغلب سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند و در کلروپلاست‌ها که در سلول‌های گیاهی و برخی از تک سلول‌های یوکاریوتی وجود دارند نیز دیده می‌شود. هر کدام از دو رشته در یک مولکول DNA حلقوی، یک ساختار بسته بدون انتهاهای آزاد را تشکیل می‌دهد. باز شدن موضعی یک مولکول DNA حلقوی در هنگام همانندسازی اتفاق می‌افتد، به خاطر این‌که انتهاهای رشته‌ها آزاد نبوده و نمی‌توانند بچرخند. لذا این باز شدن یک تنش پیچشی را به جاهای دیگر DNA اِعمال می‌کند و در نتیجه مولکول DNA مثل یک نوار پلاستیکی بر روی خودش پیچ خورده و سوپرکویل ایجاد می‌کند (شکل ۴ـ۸a). به بیان دیگر، زمانی که بخشی از مارپیچ DNA باز می‌شود بقیه بخش‌های مولکول بیشتر پیچ می‌خورند. با وجود این، سلول‌های یوکاریوتی و باکتریایی حاوی توپرایزومراز I هستند که می‌تواند هر گونه تنش پیچشی را که در طول همانندسازی و یا سایر پدیده‌ها در مولکول‌های DNA سلولی اِعمال می‌شود، برطرف کند. این آنزیم در جایگاه‌های تصادفی به DNA وصل شده و یک پیوند فسفودی استری را در یک رشته قطع می‌کند. این گونه شکست تک رشته‌ای در DNA یک

1- Hyperchromicity 2- Random coils



▲ **شکل ۶-۴: فرآیند هیدرولیزی کاتالیزشده توسط بازهای RNAای.** گروه هیدروکسیل در موقعیت ′۲ در RNA می‌تواند به عنوان یک نوکلئوفیل عمل کرده و به پیوند فسفودی استری حمله کند. مشتقات ′۲ و ′۳ مونوفسفات حلقوی بعداً به صورت مخلوطی از ′۲ و ′۳ منوفسفات‌ها هیدرولیز می‌شود. این مکانیسم هیدرولیز پیوند فسفودی استری در DNA امکان‌پذیر نیست چون فاقد گروه ′۲ ـ هیدروکسیل می‌باشد.



▲ **شکل تجربی ۷-۴: محتوای G.C، روی دمای ذوب DNA اثر می‌گذارد.** دمایی که در آن DNA دناتوره می‌شود به نسبت حضور جفت‌های G.C افزایش می‌یابد. (a) ذوب شدن DNA دو رشته‌ای با جذب نور ماوراء بنفش در ۲۶۰nm قابل مشاهده و ارزیابی می‌شود. بخش‌هایی از DNA دو رشته‌ای که به صورت جفت نشده باشند تقریباً باعث دو برابر شدن جذب نور می‌شوند. دمایی که در آن نصف بازهای یک DNA دو رشته‌ای نمونه دناتوره شده‌اند، T_m (دمایی ذوب شدن) نامیده می‌شود. جذب نوری توسط DNA تک رشته‌ای با افزایش دما خیلی کم تغییر می‌کند. (b) T_m تابعی از محتوای G.C در DNA است که هر چه درصد G+C بیشتر شود، Tm هم بیشتر می‌گردد.

شکاف[1] نامیده می‌شود. سپس پیچ رشته شکسته شده به دور رشته بریده نشده باز می‌شود و بدین ترتیب سوپرکویل حذف شده (شکل b ۴-۸) و در نهایت همان آنزیم انتهاهای قطع شده را به هم وصل می‌کند. آنزیم دیگر، توپرایزومراز II هست که در هر دو رشته یک مولکول DNA دو رشته‌ای، شکست ایجاد کرده و سپس آنها را به هم وصل می‌کند. در نتیجه توپرایزومراز II هم تنش پیچشی را

1- Nick

برطرف کرده و هم دو سر مولکول را به هم وصل می‌کند.

گرچه DNA هسته یوکاریوت‌ها خطی هست ولی حلقه‌های بزرگی در درون کروموزوم‌ها وجود دارد (فصل ۶). بنابراین تنش پیچشی و سوپرکویل حاصل از آن می‌تواند در طول همانندسازی DNA هسته‌ای هم همانند سلول‌های باکتریایی اتفاق بیفتد. مقدار زیاد توپوایزومراز I موجود در هسته یوکاریوت‌ها، هر نوع تنش پیچشی ی راکه در DNA هسته‌ای ایجاد می‌شود از بین می‌برد. در غیاب این آنزیم، این تنش گسترش می‌یابد.

انواع متفاوت RNAها بسته به عملکرد آنها ساختمان فضایی‌های متنوعی را نشان می‌دهند

ساختار اولیه RNA به جز دو مورد عموماً شبیه ساختمان اولیه DNA می‌باشد: این دو مورد شامل موقعیت ۲' (شکل b ۱۶-۲) و جایگزین شدن تیمین در DNA با اوراسیل در RNA می‌باشد. حضور تیمین به جای اوراسیل در DNA برای پایداری طولانی‌مدت DNA حائز اهمیت است که این به خاطر عملکرد آن در ترمیم DNA می‌باشد (بخش ۶-۴). همان‌طور که قبلاً اشاره شد گروه هیدروکسیل در موقعیت C_2 ریبوز باعث می‌شود که RNA نسبت به DNA از لحاظ شیمیایی، پایداری کم‌تری داشته باشد و به خاطر همین مسئله RNA در محلول‌های قلیایی به منونوکلئوتیدها شکسته می‌شود، در صورتی که DNA دچار این شکست نمی‌شود (شکل ۶-۴). گروه هیدروکسیل C_2 در RNA همچنین به عنوان یک گروه فعال شیمیایی عمل کرده و در واکنش‌های کاتالیزی که RNA دخالت دارد، شرکت می‌کند. همچون DNA، RNA هم یک پلی‌نوکلئوتید طویلی هست که می‌تواند دو رشته‌ای یا تک رشته‌ای، خطی و یا حلقوی باشد. این مولکول همچنین می‌تواند در یک مارپیچ دوتایی که یک رشته آن RNA و رشته دیگر DNA هست شرکت کند. همان‌طور که در بالا اشاره شد مارپیچ‌های دوتایی RNA-RNA و RNA-DNA دارای ساختمان فضایی فشرده‌ای شبیه شکل A از DNA هستند (شکل ۴b-۴).

علی‌رغم اینکه DNA در قالب ساختمانی اولیه خود به صورت یک مارپیچ دوگانه خیلی بلند می‌باشد، ولی بیشتر RNAهای سلولی به صورت تک رشته‌ای و دارای ساختمان فضایی‌های متنوع هستند (شکل ۹-۴). تفاوت‌های موجود در اندازه و ساختمان فضایی انواع مختلف RNA، این امکان را برای آنها فراهم می‌کند تا اعمال خاصی را در سلول انجام دهند. ساده‌ترین ساختار دوم RNAهای تک رشته‌ای در اثر جفت شدن بازهای مکمل در یک توالی خطی ایجاد می‌شوند.

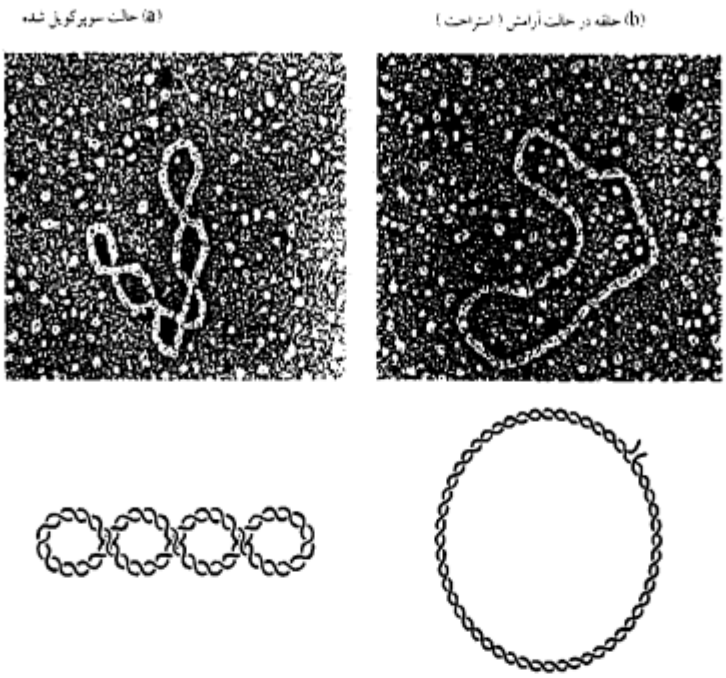
سنجاق سرها[1] در اثر جفت شدن بازی حدود ۵ تا ۱۰ نوکلئوتید با هم دیگر و ساختارهای ساقه ـ حلقه[2] با جفت شدن بازهایی که بیش از ۱۰ تا حدود چند صد نوکلئوتید از هم جدا هستند ایجاد می‌شود. این پیچ و تاب‌های ساده می‌توانند با هم همکاری کرده و ساختارهای نوع سوم پیچیده‌ای را ایجاد کنند که یکی از آنها «گرههای کاذب[3]» نامیده می‌شود.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد مولکول‌های tRNA درون سلولی، دارای یک ساختار سه‌بعدی شناخته شده‌ای هستند که برای فرایند سنتز پروتئین بسیار حیاتی می‌باشد. مولکول‌های rRNA بزرگ‌تر نیز دارای ساختارهای موضعی شناخته شده سه‌بعدی هستند که در میانشان توالی‌های بسیار انعطاف‌پذیر قرار دارد. ساختارهای دوم و سوم در mRNA هم دیده می‌شوند و به خصوص در انتهاهای این مولکول بیشتر یافت می‌شوند. واضح است که مولکول‌های RNA، همچون پروتئین‌ها دارای دمین‌های ساختاری هستند که توسط گستره‌های [توالی‌های] کم ساختار و منعطف به هم وصل شده‌اند.

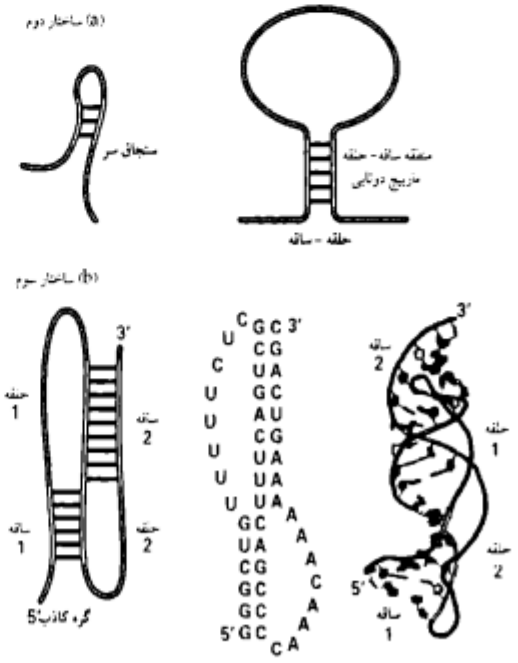
دُمین‌های پیچ و تاب خورده در مولکول RNA نه تنها از لحاظ ساختاری مشابه مارپیچ‌های "α" و زنجیره‌های β یافت شده در پروتئین‌ها هستند؛ بلکه در برخی موارد دارای ظرفیت کاتالیتیکی هم می‌باشند.

این RNAهای کاتالیتیک ریبوزیم[4] نامیده می‌شوند. اگرچه ریبوزیم‌ها معمولاً با پروتئین‌هایی همراه هستند که باعث پایداری آنها می‌شوند ولی این RNA هست که به عنوان یک کاتالیزور عمل می‌کند. برخی ریبوزیم‌ها می‌توانند فرایند ویرایش[5] را کاتالیز کنند. در فرایند ویرایش، یک توالی از بخش داخلی RNA بریده شده و برداشته می‌شود و دو رشتهٔ حاصل دوباره به هم وصل می‌شوند. این فرایند در طول تشکیل اکثر مولکول‌های عملکردی mRNA در یوکاریوت‌های چند سلولی و نیز تک سلول‌های یوکاریوتی همچون مخمر، باکتری و آرکئاها صورت می‌گیرد. برخی RNAها به طور قابل ملاحظه‌ای دچار فرآیند خود ـ ویرایشی می‌شوند که این کار توسط فعالیت کاتالیزی توالی برداشته شده، انجام می‌شود. مکانیسم‌های ویرایش و خود ـ ویرایش به طور کامل در فصل ۸ بررسی می‌شوند. همان‌طور که در این فصل بیان می‌شود rRNA، ایفاگر نقش کاتالیتیک در تشکیل پیوندهای پپتیدی در طول فرایند

1- Hairpins
2- Stem-loops
3- Pseudoknot
4- Ribozymes
5- Splicing



▲ **شکل ۸-۴: توپوایزومراز I تنش پیچشی در DNA را برطرف می‌کند.** (a) میکروگراف الکترونی از DNA ویروس "SV40". زمانی که DNA حلقوی مربوط به ویروس SV40 جداسازی شده و از پروتئین‌های همراهش تفکیک می‌شود DNA دورشته‌ای تحت پیچش قرار گرفته و حالت سوپرکویل را ایجاد می‌کند. (b) اگر یک سوپرکویل DNA شکسته شود (یعنی یکی از رشته‌ها، شکاف بردارد) رشته‌ها می‌توانند باز شده و DNA از حالت سوپرکویل رها شود. توپرایزومراز I این واکنش را کاتالیز می‌کند و علاوه بر این دو انتهای جدا شده را هم به هم وصل می‌کند. تمام سوپرکویل‌های DNA ویروس SV40 با واکنش متوالی این آنزیم قابل رفع هستند که نتیجه آن تولید ساختمان فضایی حلقوی در حالت استراحت (relaxed) می‌باشد. برای درک بهتر، شکل‌های مربوط به مولکول‌ها در پایین ساده‌تر ترسیم شده‌اند. [توجه: لطفاً توجه شود که در برخی ترجمه‌های فارسی متن‌های مختلف از واژه سوپرکویل تحت عنوان فنر فنری شده استفاده می‌شود، مترجم].



▶ **شکل ۹-۴: (شکل رنگی) ساختارهای دوم و سوم RNA.** (a) ساقه ـ حلقه‌ها، سنجاق سرها و سایر ساختارهای دوم می‌توانند از طریق جفت شدن قطعات مکمل فاصله‌دار در یک مولکول RNA ایجاد شوند. در ساقه ـ حلقه‌ها، حلقه تک رشته‌ای بین ساقه مارپیچی واجد جفت بازها ممکن است دارای صدها و یا حتی چند هزار نوکلئوتید طول داشته باشد. با این حال در ساختارهای سنجاق سرها، پیچ‌های کوتاه ممکن است که کم‌تر از ۴ نوکلئوتید طول داشته باشند.(b) pseudoknots (گره‌های کاذب!) نوعی از ساختار سوم RNA هستند که از طریق میانکنش بین حلقه ثانویه (واجد ساختار دوم) از طریق جفت شدن باز بین بازهای مکمل ایجاد می‌شوند. ساختار نشان داده شده مربوط به هسته دُمین RNA تلومراز انسانی است. سمت چپ: ساختار ثانویه با نوکلئوتیدهای جفت بازی به رنگ سبز و آبی و مناطق تک رشته‌ای به رنگ قرمز. وسط: توالی دُمین مرکزی RNA تلومراز براساس رنگ‌آمیزی ساختار دوم شکل سمت چپ رنگ‌آمیزی شده است. سمت راست: شکل مربوط به ساختار دمین مرکزی به دست آمده توسط NMR دوبعدی است که تنها بازهای جفت شده و یک شکل لوله مانند (ستون قند ـ فسفات) را نشان می‌دهد، که بر طبق شکل سمت چپ رنگ‌آمیزی شده است.

سنتز پروتئین می‌باشد. در این فصل توجه ما روی اعمال mRNA، tRNA و rRNA در فرایند بیان ژن خواهد بود. در فصل‌های بعدی با RNAهای دیگری مواجه خواهیم شد که اغلب با پروتئین‌ها مجتمع بوده و در سایر فعالیت‌های سلولی وارد می‌شوند.

نکات کلیدی بخش ۱-۴

ساختار اسیدهای نوکلئیک

- داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) به عنوان ماده ژنتیکی، اطلاعات را به توالی‌های اختصاصی اسید آمینه‌ای در پروتئین‌ها تبدیل می‌کند. DNA به چندین نوع ریبونوکلئیک اسید (RNA) که شامل RNA پیامبر (mRNA)، RNA ناقل (tRNA) و RNA ریبوزومی (rRNA) هستند و در سنتز پروتئین مشارکت دارند رونویسی می‌شود (شکل ۱-۴ را ملاحظه کنید).
- هم DNA و هم RNA پلیمرهای غیر شاخه‌ای نوکلئوتیدها هستند که شامل پنتوزهای فسفریله متصل به یک باز آلی مثل پورین یا پیریمیدین می‌باشند.
- پورین‌های آدنین (A) و گوانین (G) و پیریمیدین‌های سیتوزین (C) در هر دو DNA و RNA یافت می‌شوند. پیریمیدین تیمین (T) موجود در DNA توسط پیریمیدین یوراسیل (U) در RNA جایگزین می‌شود.
- نوکلئوتیدهای مجاور در یک پلی نوکلئوتید توسط پیوندهای فسفودی‌استری بهم متصل می‌شوند. کل رشته یک جهت‌گیری شیمیایی با انتهاهای ′۵ و ′۳ دارد (شکل ۲-۴ را ملاحظه کنید).
- DNA طبیعی (B DNA) حاوی دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی ناهمسو است که در یک، مارپیچ دوگانه راست‌گرد منظم قرار گرفته‌اند به طوریکه بازها در داخل رشته و دو اسکلت قند-فسفات در بیرون رشته قرار دارند (شکل ۳-۴ را ملاحظه کنید) جفت شدن بازی بین رشته‌ها و برهمکنش‌های آبگریز بین جفت بازهای مجاور فشردگی ساختار مارپیچی را پایدار کند.
- بازهای موجود در اسیدهای نوکلئیک می‌توانند با پیوندهای هیدروژنی با هم برهمکنش دهند. جفت بازهای استاندارد واتسون-کریکی G.C و A.T (در DNA) و G.C و A.U (در RNA) هستند. جفت بازها ساختار سه‌بعدی DNA و RNA را پایدار می‌کنند.
- اتصال پروتئین به DNA می‌تواند ساختار مارپیچی را بهم زند و یک خمیدگی یا فراپیچش موضعی درمولکول DNA ایجاد می‌کند.
- گرما باعث جدایی رشته‌های DNA (دناتوراسیون) می‌شود. نقطه ذوب Tm برای DNA با درصد جفت بازهای G.C افزایش می‌یابد. تحت شرایط مناسب دو رشتهٔ مکمل اسید نوکلئیک جداشده می‌توانند رناتوره شوند.
- مولکول‌های DNA حلقوی می‌توانند به دور خود پیچش کنند و سوپرکویل تشکیل دهند (شکل ۸-۴ را ملاحظه کنید) آنزیم‌هایی بنام توپوایزومرازها می‌توانند استرس ایجاد شده و سوپرکویل را از مولکول‌های DNA بردارند. DNA خطی بلند می‌تواند تحت شرایط استرس قرار گیرد زیرا حلقه‌های طویل درمحلهایی در کروموزوم ثابت شده‌اند.
- RNAهای سلولی پلی‌نوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای هستند که برخی از آن‌ها می‌توانند ساختارهای دوم و سوم خوبی تشکیل دهند (شکل ۹-۴ را ملاحظه کنید). برخی از RNAها موسوم به ریبوزیم، فعالیت کاتالیتیکی دارند.

۲-۴ نسخه‌برداری از ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین و تشکیل mRNA عملکردی

ساده‌ترین تعریف ژن عبارت است از «واحدی از DNA که حاوی اطلاعات لازم برای ساخت یک تک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی یا RNA عملکردی (همچون tRNA) می‌باشد». مولکول‌های DNA مربوط به ویروس‌های کوچک تنها حاوی تعداد کمی ژن هستند اگرچه تک مولکول DNA در هر کدام از کروموزوم‌های حیوانات عالی و گیاهان ممکن است حاوی چندین هزار ژن باشد. بخش اعظم ژن‌ها حاوی اطلاعات لازم برای تولید مولکول‌های پروتئین هستند و در واقع RNAهای کپی شده از این ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین هست که محتوای mRNA یک سلول را تشکیل می‌دهند.

در طول فرآیند سنتز RNA، زبان چهار بازی DNA شامل A، G، C و T به سادگی به صورت زبان چهار بازی RNA که شبیه DNA بوده و فقط U به جای T می‌نشیند کپی‌برداری و یا نسخه‌برداری می‌شود. بر خلاف این، در طول فرایند سنتز پروتئین زبان چهار بازی DNA و RNA به صورت زبان ۲۰ اسید آمینه‌ای پروتئین‌ها ترجمه می‌شود. در این بخش به تشکیل mRNAهای عملکردی ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین می‌پردازیم (شکل ۱-۴، ❶). فرآیند مشابهی منجر به تولید rRNAها و tRNAهای پیش‌ساز یا اولیه می‌شود که توسط ژن‌های tRNA و rRNAای

رمزدهی می‌شوند. سپس این پیش‌سازها دچار تغییرات بیشتری می‌شوند تا rRNA و tRNAهای واجد عملکرد حاصل شوند. به علاوه هزاران **میکرو RNA** (micro RNAs، miRNAها)، که اخیراً شناسایی شده‌اند و عملکرد آنها تنظیم ترجمه mRNAهای هدف خاص و الگوبرداری ژن‌های هدف خاص می‌باشد توسط RNA پلیمرازها به صورت RNAهای پیش‌ساز یا اولیه تولید شده و سپس به صورت miRNAهای واجد عملکرد دچار پردازش می‌شوند. نسخه‌برداری و پردازش این نوع از RNAها در فصل ۸ بررسی شده است. تنظیم نسخه‌برداری باعث می‌شود که ژن‌های یکسان بسته به نوع سلول‌هایی که در یک موجود پر سلولی یافت می‌شوند به صورت‌های متفاوتی بیان شوند. همچنین تنظیم رونویسی باعث می‌شود که مقادیر متفاوتی از mRNA از ژن‌های مختلف نسخه‌بردرای شوند که این باعث تفاوت در مقدار پروتئین‌های رمز شده موجود در یک سلول می‌شود. تنظیم نسخه‌برداری در فصل ۷ بررسی می‌شود.

یک رشته DNA الگو توسط RNA پلیمراز به صورت رشته RNA مکمل نسخه‌برداری می‌شود

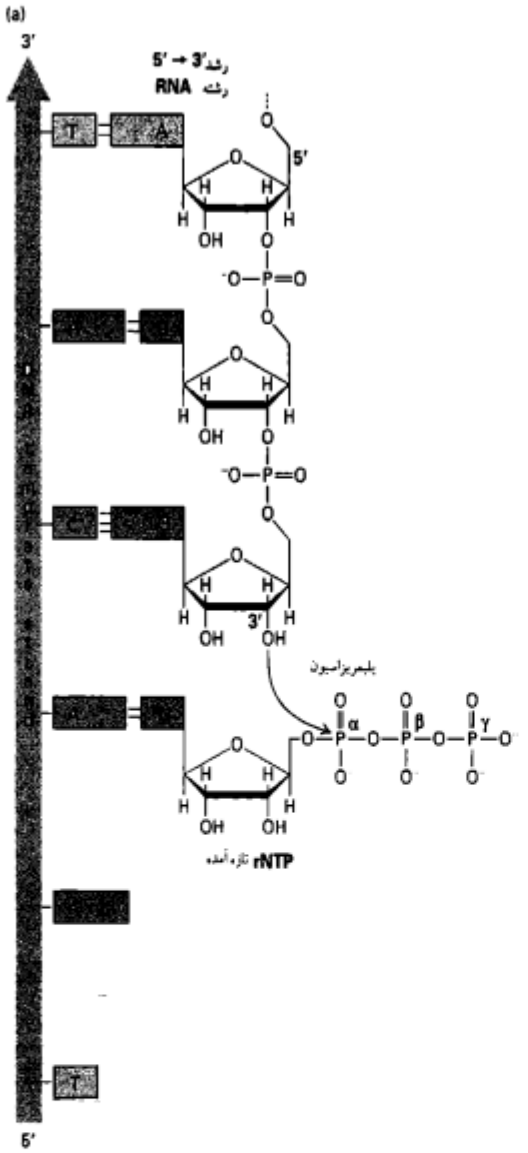
در طول نسخه‌برداری DNA، یکی از رشته‌های DNA به عنوان الگو[1] عمل می‌کند که تعیین‌کننده ترتیب پلیمریزاسیون منومرهای ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌ها (rNTP) برای تشکیل یک زنجیره مکمل RNA می‌باشند. بازهای موجود در رشته DNA الگو با NTPهایی که وارد می‌شوند جفت می‌شوند که بعداً این rNTPها در یک واکنش پلیمریزاسیون کاتالیز شده توسط RNA پلیمراز به هم متصل می‌شوند. پلیمریزاسیون شامل حمله نوکلئوفیلی اکسیژن موقعیت ′۳ در زنجیرهٔ RNA در حال رشد به فسفات α نوکلئوتید بعدی آماده اتصال به زنجیره می‌باشد که نتیجه این فرایند تشکیل یک پیوند فسفودی استری و رها شدن پیروفسفات (PPi) می‌باشد. در نتیجه این مکانیسم، مولکول‌های RNA همیشه در جهت ′۳→′۵ ساخته می‌شوند (شکل ۱۰a-۴).

واکنش پلیمریزاسیون اتصال ریبونوکلئوتید به RNA در حال رشد از لحاظ انرژتیک بسیار مساعد است که این به خاطر انرژی بالای پیوندی بین فسفات α و β مربوط به مونومرهای rNTP با انرژی پیوندی کم‌تر فسفودی استری بین نوکلئوتیدها می‌باشد. تعادل واکنش بیشتر در جهت طولانی شدن زنجیره پیش می‌رود که این توسط پیروفسفاتاز، آنزیمی که مولکول‌های PPi رها شده را به صورت دو مولکول فسفات معدنی می‌شکافد، انجام می‌گیرد. همانند دو رشته DNA، رشتهٔ DNA الگو و رشته RNA در حال رشد که بازهایشان به هم جفت شده است دارای جهت‌گیری مخالف ′۳→′۵ هستند.

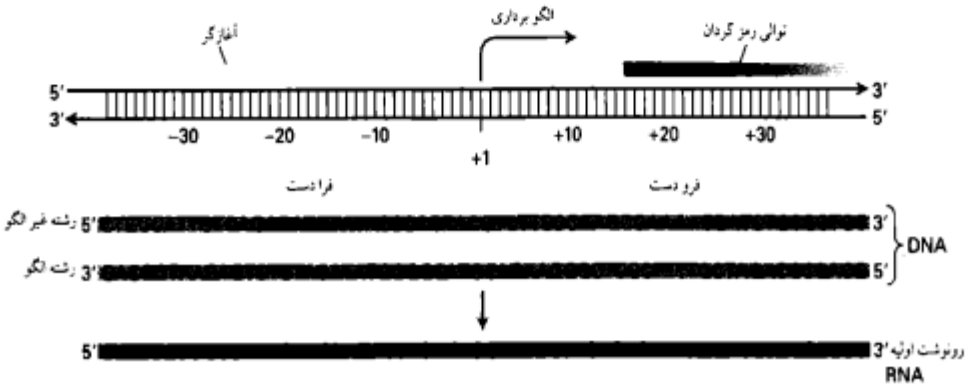
طبق قرارداد، محلی از DNA که RNA پلیمراز نسخه‌برداری را آغاز می‌کند ۱+ نامیده می‌شود. بخش فرودست[2] بیانگر جهتی است که DNA الگو، نسخه‌برداری می‌شود و فرادست[3] بیانگر جهت خلاف آن است. موقعیت نوکلئوتیدهای DNA که نسبت به یک محل آغاز الگوبرداری (رونویسی)، در فرودست هستند با علامت مثبت (+) و آنهایی که در بخش فرادست هستند با علامت منفی (-) نشان داده می‌شوند. به علت این که RNA در جهت ′۳→′۵ ساخته می‌شود آنزیم RNA پلیمراز بر روی DNA الگو در جهت ′۵→′۳ حرکت می‌کند. RNA تازه ساخته شده مکمل رشته DNA الگو می‌باشد. بنابراین، این رشته RNA شبیه رشته DNA غیرالگو می‌باشد با این تفاوت که اوراسیل به جای تیمین قرار گرفته است (شکل ۱۰b-۴).

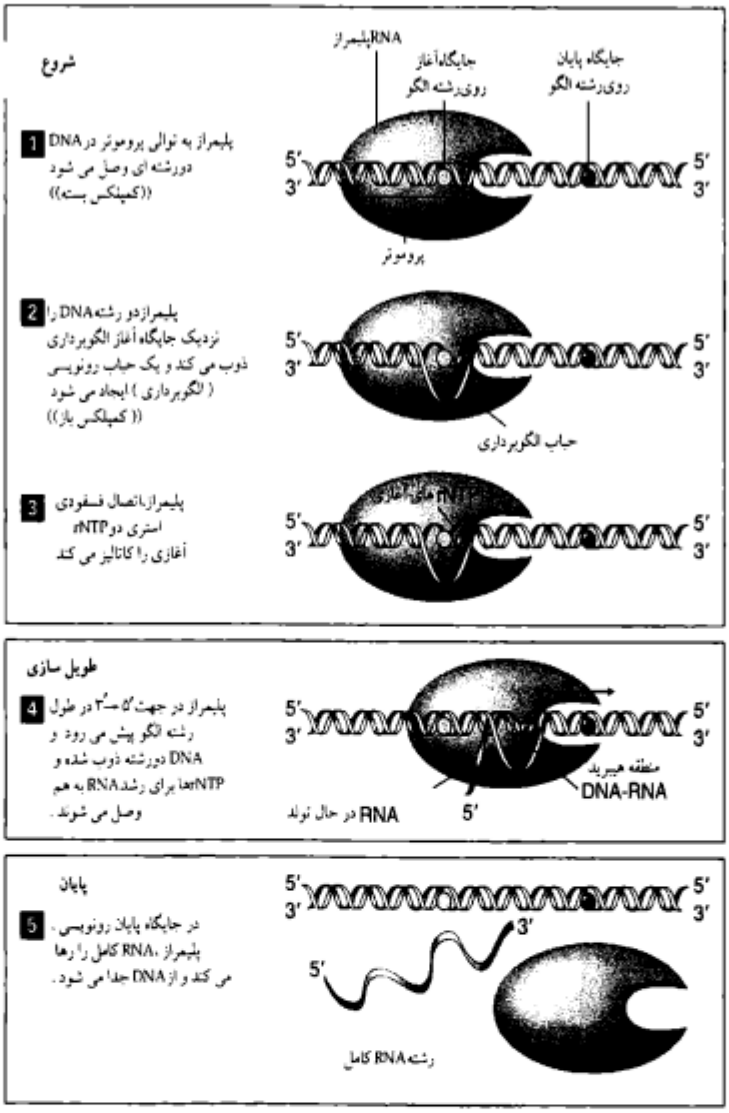
مراحل الگوبرداری (رونویسی): برای انجام رونویسی (الگوبرداری)، RNA پلیمرازها چندین عمل مجزا را انجام می‌دهند که در شکل ۱۱-۴ نشان داده شده است. در طول آغاز نسخه‌برداری، RNA پلیمراز محل خاصی را در DNA دو رشته‌ای که پروموتر[4] نامیده می‌شود شناسایی و به آن متصل می‌شود (مرحله ❶). RNA پلیمرازها نیازمند چندین عامل پروتئینی هستند که ***عامل عمومی نسخه‌برداری***[5] نامیده می‌شوند و به آنزیم‌ها کمک می‌کنند در پروموتر جایگیری کرده و نسخه‌برداری را شروع کنند. بعد از اتصال به یک پروموتر، آنزیم RNA پلیمراز به منظور این‌که بازهای رشته الگو برای جفت شدن با ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌هایی که با هم پلیمریزه خواهند شد قابل دسترسی باشند دو رشته DNA را از هم جدا می‌کند. آنزیم RNA پلیمراز در محدودهٔ محل آغاز نسخه‌برداری، ۱۴-۱۲ جفت باز از DNA را ذوب می‌کند (از هم جدا می‌کند) که این جفت بازها در منطقه پروموتر قرار دارند (مرحله ❷). این عمل به رشته الگو این امکان را می‌دهد تا وارد جایگاه فعال آنزیم شود. این آنزیم تشکیل پیوند فسفودی استری بین ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌هایی که مکمل رشته الگوی منطقه پروموتر در محل آغاز نسخه‌برداری هستند را کاتالیز می‌کند. محدودهٔ ۱۴-۱۲ جفت

1- Template
2- Downstream
3- Upstream
4- Promoter
5- Transcription factors



◀ **شکل ۱۰-۴: RNA در جهت ۳′→۵′ سنتز می‌شود.** (a) پلیمریزاسیون ریبونوکلئوتیدها توسط RNA پلیمراز در طول نسخه‌برداری. ریبونوکلئوتیدی که باید به انتهای ۳′ رشته RNA در حال رشد اضافه شود از طریق جفت شدن بازی بین باز بعدی در رشته DNA الگو و ریبونوکلئوزید تری‌فسفات (rNTP) مکمل، اختصاصی می‌شود. زمانی که RNA پلیمراز واکنشی را بین اکسیژن موقعیت ۳′ رشته در حال رشد و فسفات α یک rNTP صحیح جفت شده کاتالیز می‌کند، یک پیوند فسفودی استری تشکیل می‌گردد. رشته‌های RNA همیشه در جهت ۳′→۵′ ساخته می‌شوند و از لحاظ جهت‌گیری همواره با رشته DNA الگو که از روی آن ساخته می‌شوند ناهمسو هستند. (b) قراردادی که نسخه‌برداری RNA را نشان می‌دهد. بالا: نوکلئوتیدی از DNA که RNA پلیمراز نسخه برداری را از آن آغاز می‌کند ۱+ نامیده می‌شود. مسیر یا جهتی که آنزیم در سمت آن، روی DNA حرکت می‌کند، فرودست نامیده شده که بازهای آن با علامت مثبت (+) نشانه‌گذاری می‌شود و جهت مخالف، فرادست هست که بازهای آن با علامت (-) منفی نشانه‌گذاری می‌شود. برخی اشکال مهم ژنی در فرادست محل آغاز رونویسی قرار می‌گیرند که شامل توالی پروموتر هست که آنزیم RNA پلیمراز را برای ژن جایگیری می‌کند. پایین: رشته DNAی که مورد نسخه برداری قرار گرفته، رشته الگو و رشته مکمل آن رشته غیرالگو نامیده می‌شود. رشته RNAی که ساخته شده است مکمل رشته الگو بوده و لذا بیشتر شبیه توالی رشته غیرالگو می‌باشد با این تفاوت که به جای تیمین، اوراسیل دارد.





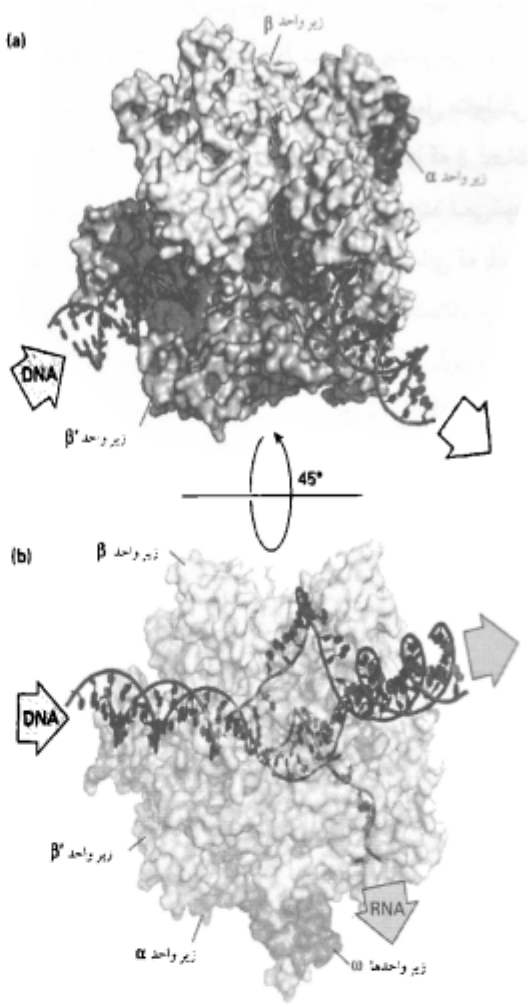
▲ **شکل ۱۱ـ۴: سه مرحله در نسخه برداری (رونویسی).** در طول شروع فرایند نسخه برداری، RNA پلیمراز یک حباب رونویسی ایجاد می‌کند و پلیمریزاسیون ریبونوکلئوتیدها (rNTPs) را در جایگاه آغاز شروع می‌کند که این جایگاه آغاز درون ناحیه پروموتر قرار گرفته است. همین که یک منطقه از DNA نسخه برداری شد رشته‌های از هم جدا شده، دوباره به شکل مارپیچ دوگانه به هم وصل می‌شوند. RNA در حال سنتز به جز انتهای ′۳ آن از رشته الگوی خود جدا می‌شود. انتهای ′۵ رشته RNA از طریق یک کانال در آنزیم پلیمراز خارج می‌شود. خاتمه، زمانی اتفاق می‌افتد که پلیمراز با یک توالی خاص خاتمه مواجه شود (جایگاه پایان). برای جزئیات بیشتر تصویر را ملاحظه کنید. برای سهولت، شکل نشان‌دهندهٔ چهار پیچش مارپیچ DNA رمزگردان (حدود ۴۰ نوکلئوتید RNAای) می‌باشد. بیشتر RNAها به‌طور قابل ملاحظه‌ای بلندتر هستند که به نسخه برداری از یک منطقه بلند DNA نیاز دارند.

بازی مربوط به DNA ذوب شده در درون پلیمراز، حباب نسخه‌برداری[1] نامیده می‌شود. آغاز نسخه‌برداری زمانی که دو ریبونوکلئوتید اول یک رشته RNA با پیوند فسفودی استری به هم وصل شدند پایان می‌پذیرد [یعنی مرحله طویل شدن شروع می‌شود]. (مرحله ❸).

بعد از این‌که چندین ریبونوکلئوتید پلیمریزه شدند، آنزیم RNA پلیمراز از ناحیه پروموتر DNA و عوامل عمومی الگوبرداری جدا می‌شود. در طول مرحله طویل شدن رشته[2]، RNA پلیمراز در طول رشته DNA الگو هر بار به اندازهٔ یک باز حرکت کرده و در سمت

1- Transcription bubble

2- Strand elongation



▲ **شکل ۱۲ـ۴: (شکل رنگی) RNA پلیمراز باکتریایی.** این ساختار مطابق با مولکول پلیمراز در فاز طویل‌سازی (elongation) (مرحله ❹ شکل ۱۱ـ۴) هست. در این طرح‌ها نسخه‌برداری در جهت چپ پیشروی می‌کنند. پیکان‌ها نشان‌دهندهٔ جایی است که DNA فرودست وارد پلیمراز شده و DNA فرادست تحت یک زاویه نسبت به DNA فرودست خارج می‌شود. رشته رمزگردان به رنگ قرمز، رشته غیررمزگردان آبی و RNA در حال سنتز سبز رنگ می‌باشد. زیر واحد β' در RNA پلیمراز، طلایی رنگ، β خاکستری روشن و زیر واحد α از این زاویه قهوه‌ای است. در (a) یک مدل فضا پرکن از کمپلکس طویل‌سازی از زاویه‌ای دیده می‌شود که روی خمیدگی DNA زمانی که پلیمراز عبور می‌کند تأکید می‌کند. کمپلکس طویل‌سازی همان‌طور که دیده می‌شود در (b) چرخیده و پروتئین‌ها تا حد زیادی شفاف شده‌اند تا اینکه ساختار حباب رونویسی درون پلیمراز دیده شود که در مدل فضا پرکن قابل مشاهده نیست. نوکلئوتیدهای مکمل با DNA الگو به انتهای ′۳ رشته RNA در حال رشد متصل می‌شوند (در سمت چپ). رشته RNA تازه ساخته شده از پایین از طریق یک کانال تشکیل شده بین زیر واحدهای β' و β از پلیمراز خارج می‌شود. زیر واحد w و سایر زیر واحدهای α از این زاویه قابل مشاهده هستند.

جلوی حرکت خود دو رشته DNA را از هم باز می‌کند و در سمت فرادست حباب نسخه‌برداری، دو رشته را به سمت هم هدایت می‌کند تا با هم هیبرید شوند (شکل ۱۱ـ۴، مرحله ❹). در هر بار یک ریبونوکلئوتید توسط پلیمراز در طول طویل شدن رشته، به انتهای ′۳ رشته RNA در حال رشد اضافه می‌شود. آنزیم همواره یک محدودهٔ تقریباً ۱۴ جفت بازی را به صورت ذوب شده نگه می‌دارد که حباب نسخه‌برداری نامیده می‌شود. حدوداً هشت نوکلئوتید در انتهای ′۳ رشته RNA در حال رشد در منطقه حباب الگوبرداری با رشته DNA الگو به صورت جفت شده باقی می‌ماند. کمپلکس طویل‌سازی شامل RNA پلیمراز، DNA الگو و رشته RNA در حال رشد به شدت پایدار می‌باشند. به عنوان مثال، آنزیم RNA پلیمراز بلندترین ژن شناخته شده پستانداران را که حاوی حدود ۲ میلیون جفت باز است، بدون جدا شدن از DNA الگو و یا رها شدن RNA ایجاد شده، نسخه‌برداری می‌کند. از آنجایی که ساخت RNA با آهنگ یا سرعت حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتید در دقیقه در دمای ۳۷°C صورت می‌گیرد کمپلکس طویل‌سازی باید بیش از ۲۴ ساعت به صورت متصل باقی بماند تا اینکه ساخت پیش mRNA (pre-mRNA) از روی این ژن طویل با موفقیت انجام شود.

در طول فرایند پایان[1] نسخه‌برداری یعنی مرحله پایانی ساخت RNA، مولکول کامل RNA و یا رونوشت اولیه RNA پلیمراز رها شده و آنزیم پلیمراز از DNA الگو جدا می‌شود (شکل ۱۱ـ۴، مرحله ❺). توالی‌های خاصی در DNA الگو به آنزیم RNA پلیمراز متصل و پیام پایان نسخه برداری را انجام می‌دهند. یک آنزیم پلیمراز رها شده، قادر به نسخه‌برداری دوباره از همان ژن یا ژن دیگری است.

ساختار RNA پلیمراز: RNA پلیمرازهای مربوط به باکتری‌ها، آرکئاها و سلول‌های یوکاریوت از لحاظ پایه‌ای دارای ساختار و عملکرد مشابه می‌باشند. RNA پلیمرازهای باکتریایی از دو زیر واحد متصل به هم بزرگ (β,β') و دو نسخه از یک نوع زیر واحد (ω) تشکیل شده که این (ω) برای نسخه برداری یا زنده ماندن سلول ضروری نیست ولی باعث پایداری آنزیم شده و به تجمع زیر واحدهای آن کمک می‌کند. علاوه بر این RNA پلیمراز آرکئاها و سلول‌های یوکاریوت، دارای چندین زیر واحد کوچک هستند که به این کمپلکس مرکزی متصل می‌شوند و در این فصل توضیح داده می‌شود. طرح شماتیک فرآیند نسخه‌برداری که نشان‌دهنده اتصال RNA

1- Termination

پلیمراز به یک DNA بدون خمیدگی می‌باشد در شکل ۱۱ـ۴ توصیف شده است. با وجود این، کریستالوگرافی اشعه X و سایر مطالعات انجام گرفته بر روی یک RNA پلیمراز با کتریایی نشان می‌دهد که DNA در حباب رونویسی دچار خمیدگی می‌شود (شکل ۱۲ـ۴).

سازمان‌یابی ژن‌ها در DNA پروکاریوتی و یوکاریوتی متفاوت است

حال با داشتن طرح کلی از فرآیند نسخه‌برداری، به‌طور خلاصه به آرایش اطلاعات در مولکول DNA و چگونگی اثر این ترتیب و آرایش بر القاء ساخت RNA برای انتقال آسان اطلاعات می‌پردازیم. در سال‌های اخیر توالی‌یابی کل ژنوم چندین ارگانیسم آشکار کرده است که نه تنها تنوع بسیار زیادی در ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین‌ها وجود دارد بلکه در سازمان‌یابی این ژن‌ها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها نیز تفاوت‌های زیادی وجود دارد.

آرایش ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین در تمام پروکاریوت‌ها دارای یک منطق قدرتمند و جالبی هست، ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین‌هایی که با هم کار می‌کنند برای مثال، آنزیم‌هایی که برای سنتز اسیدآمینه تریپتوفان لازم هستند، اغلب در DNA در یک ردیف پیوسته یافت می‌شوند.

چنین آرایش ژنی در یک گروه عملکردی، یک اپرون[1] نامیده می‌شود که این به خاطر عمل کردن آن به عنوان یک واحد، از یک آغازگر یا پروموتر واحد می‌باشد [یعنی تمام این ژن‌ها به عنوان یک اپرون دارای یک پروموتر هستند، مترجم]. نسخه برداری از یک اپرون باعث تولید یک رشته پیوسته mRNA می‌شود که حامل پیام برای یک سری پروتئین‌های به هم پیوسته است. (شکل ۱۳a ـ۴). هر بخش mRNA نشان‌دهنده واحد (یا ژنی) هست که رمزدهی کننده یکی از پروتئین‌هاست. این آرایش باعث بیان هماهنگ[2] تمام ژن‌های موجود در اپرون می‌شود. هر زمان که یک RNA پلیمراز، رونویسی را از یک پروموتر مربوط به یک اپرون آغاز کند، تمام ژن‌های اپرون رونویسی شده و ترجمه می‌شوند. در DNA پروکاریوت‌ها ژن‌ها به صورت نزدیک هم فشرده شده‌اند که این وضعیت با شکاف‌های غیررمزکنندهٔ بسیار کم همراه بوده و DNA مستقیماً به صورت mRNA نسخه برداری می‌شود. با توجه به این‌که در پروکاریوت‌ها DNA درون هسته قرار نگرفته است لذا به محض این‌که رشته‌های mRNA از سطح RNA پلیمراز خارج می‌شوند، ریبوزوم‌ها به جایگاه‌های آغاز ترجمه در mRNA متصل می‌شوند. نتیجه این فرایند این است که ترجمه mRNA پروکاریوتی در حالی آغاز می‌شود که انتهای ′۳ آن هنوز در حال ساخته شدن در جایگاه فعال RNA پلیمراز می‌باشد.

چنین دسته‌بندی اقتصادی ژن‌ها به خاطر یک عمل متابولیکی در یوکاریوت‌ها، حتی در انواع ساده‌ای مثل مخمرها که از لحاظ متابولیکی می‌توانند خیلی شبیه باکتری‌ها باشند، دیده نمی‌شود. ترجیحاً ژن‌های یوکاریوتی رمزدهی کننده پروتئین‌هایی که با هم عمل می‌کنند اغلب در DNA از لحاظ فیزیکی جدا هستند. در واقع این گونه ژن‌ها معمولاً روی کروموزوم‌های متفاوتی قرار دارند. هر ژن از پروموتر اختصاصی خود رونویسی شده و یک mRNA به وجود می‌آورد که عموماً به صورت یک تک رشته پلی‌پپتیدی ترجمه می‌شود (شکل ۱۳b ـ۴).

زمانی که در ابتدا محققان توالی نوکلئوتیدی mRNAهای یوکاریوتی از ارگانیسم‌های چند سلولی را با توالی‌های DNAای رمزدهی کننده آنها مقایسه کردند از این مسئله دچار شگفتی شدند که توالی ناگسسته رمزدهی کننده پروتئین مربوط به یک mRNA در بخش معادل آن در DNA، به صورت غیرپیوسته بود. آنها چنین قرارداد کردند که بخش‌هایی از ژن‌های یوکاریوتی که حاوی توالی رمزگردان هستند اگزون‌ها[3] می‌باشند که با قطعات غیررمزکننده پروتئین یعنی اینترون‌ها[4] از هم جدا شده‌اند. از این یافته‌های حیرت‌انگیز چنین بر می‌آید که رونوشت بلند اولیه، نسخه RNAای از توالی DNAای نسخه‌برداری شده، باید برای برداشت اینترون‌ها شکافته شوند و سپس به دقت به هم وصل شوند تا اینکه mRNAهای یوکاریوتی تولید شود.

اگرچه اینترون‌ها اغلب در یوکاریوت‌های چند سلولی حضور دارند با وجود این در باکتری‌ها و آرکئی‌ها بسیار نادر بوده و در بسیاری از یوکاریوت‌های تک سلولی همچون مخمر نان کمیاب هستند. با وجود این، اینترون‌ها در DNA ویروس‌هایی که سلول‌های یوکاریوتی را آلوده می‌کنند، حضور دارند. در واقع وجود اینترون‌ها اولین بار در این ویروس‌ها کشف شد که DNA این ویروس‌ها توسط آنزیم‌های سلول‌های میزبان رونویسی می‌شود.

mRNAهای پیش‌ساز یوکاریوتی برای ایجاد mRNAهای عملکردی پردازش می‌شوند

در سلول‌های پروکاریوتی که فاقد هسته هستند، ترجمه یک

1- Operon
2- Coordinate expression
3- Exons
4- Introns

mRNA به پروتئین می‌تواند از انتهای ′۵ mRNA حتی در حالی که انتهای ′۳ هنوز در حال سنتز با RNA پلیمراز می‌باشد شروع شود. یعنی نسخه‌برداری و ترجمه در پروکاریوت‌ها به صورت همزمان انجام می‌گیرد. با وجود این در سلول‌های یوکاریوتی نه تنها محل ساخت RNA (هسته) از محل ترجمه (سیتوپلاسم) جدا هست بلکه رونوشت‌های اولیه ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین mRNAهای پیش‌ساز یا اولیه (pre-mRNAs) نیز وجود دارند که باید تحت تغییرات متفاوتی قرار گیرند تا mRNA عملکردی تولید شود. این تغییرات مجموعاً پردازش RNA[1] نامیده می‌شود (شکل ۱ـ۴. ❷). سپس این mRNA باید قبل از ترجمه شدن به پروتئین، به سیتوپلاسم فرستاده شود. بنابراین نسخه برداری و ترجمه نمی‌توانند در سلول‌های یوکاریوتی همزمان صورت پذیرند.

تمامی mRNAهای اولیه یوکاریوتی در ابتدا در دو انتها دچار تغییر می‌شوند و این تغییرات در mRNAها باقی می‌ماند. همین که انتهای ′۵ یک زنجیره در حال تولد از سطح RNA پلیمراز جدا می‌گردد، فوراً با چندین آنزیم درگیر می‌شود که با هم کلاهک ′۵ را می‌سازند، یعنی یک ۷ ـ متیل‌گوانیلات را با یک پیوند غیرعادی ′۵ـ′۵ تری‌فسفات به نوکلئوتید انتهایی RNA وصل می‌کنند. همچنین کلاهک توسط یک فاکتور پروتئینی که برای شروع ترجمه در سیتوپلاسم لازم هست نیز ایجاد می‌شود.

پردازش در انتهای ′۳ یک mRNA-اولیه شامل برش با یک اندونوکلئاز برای ایجاد یک گروه ′۳ ـ هیدروکسیل می‌باشد تا اینکه رشته‌ای از ریشه‌های آدنیلیک اسید، یک به یک توسط آنزیم پلی A پلیمراز به آن اتصال یابند. دم پلی A در مخمرها و بی‌مهرگان ۱۰۰ الی ۲۵۰ باز کوتاه‌تر از مهره‌داران است. پلی A پلیمراز بخشی از مجموعه‌ای از پروتئین‌هاست که می‌توانند بر روی یک رونوشت جایگیری کرده و آن را در یک جایگاه خاصی برش داده و سپس تعداد صحیحی از ریشه‌های A را طی فرآیندی که نیازمند الگو نیست اضافه کنند.

مرحله نهایی در پردازش بسیاری از مولکول‌های RNA متفاوت، ویراش RNA[2] می‌باشد که عبارت است از شکاف درونی در یک رونوشت برای خارج کردن اینترون‌ها که با اتصال دوباره اگزون‌های رمزگردان ادامه پیدا می‌کند. شکل ۱۵-۴ مراحل اساسی فرایند پردازش mRNA یوکاریوتی را با استفاده از ژن βـ گلوبین نشان می‌دهد. ما ماشین سلولی را برای انجام پردازش mRNA، tRNA و rRNA در فصل ۸ مورد بررسی قرار داده‌ایم.

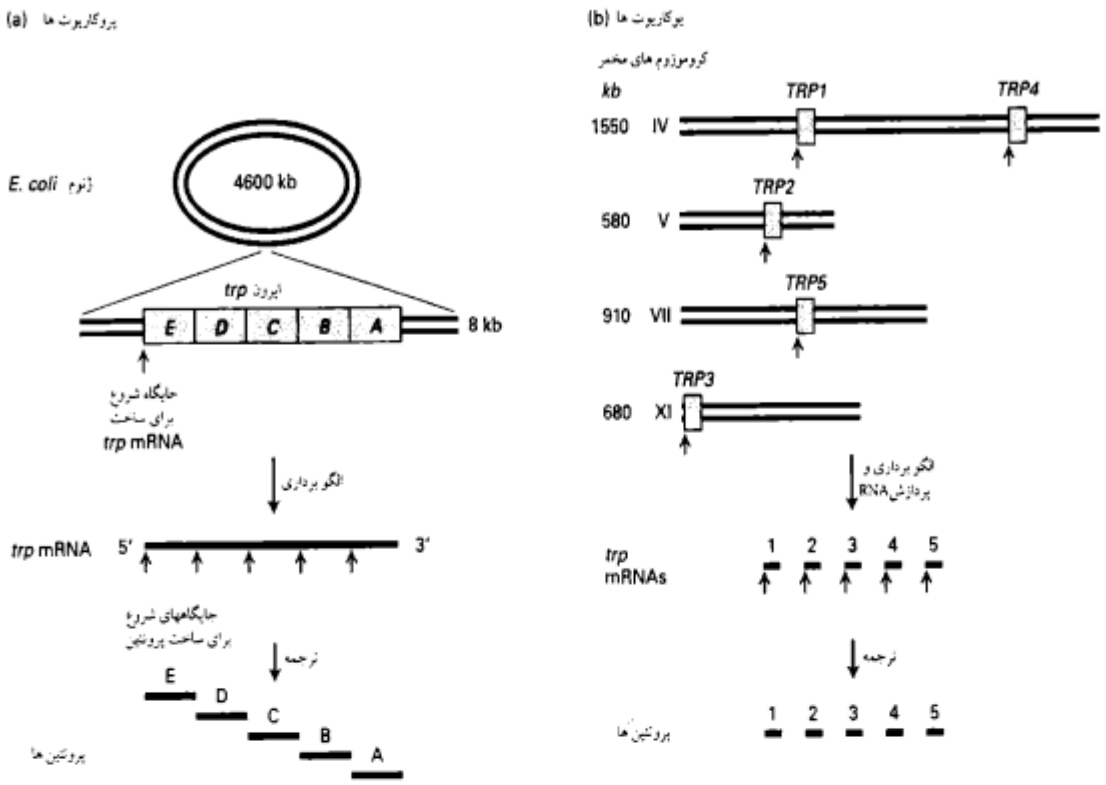
mRNAهای یوکاریوتی عملکردی تولید شده توسط پردازش RNA، مناطق غیررمزکننده‌ای را نگه می‌دارند که به مناطق غیرترجمه‌ای (UTRs) ′۳ و ′۵ در هر انتها بر می‌گردد. در mRNA پستانداران، UTRـ′۵ ممکن است طولی به اندازه صد نوکلئوتید یا بیشتر و UTRـ′۳ ممکن است تا چند کیلوباز طول داشته باشد. mRNAهای پروکاریوتی هم واجد ′۳ و ′۵ UTR می‌باشند، ولی طول این‌ها کوتاه‌تر از انواع یوکاریوتی بوده و معمولاً کم‌تر از ۱۰ نوکلئوتید دارند.

پردازش متناوب RNA باعث افزایش تعداد پروتئین‌های بیان شده از یک ژن منفرد یوکاریوتی می‌شود

بر خلاف ژن‌های باکتریایی و آرکئاها، اکثر ژن‌ها در یوکاریوت‌های پر سلولی عالی حاوی چندین اینترون هستند. همان‌طور که در فصل ۳ اشاره شده است بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوت‌های عالی‌تر دارای یک ساختار سوم چند دُمینی هستند (شکل ۱۱ـ۳). دُمین‌های منفرد پروتئینی تکرار شده معمولاً توسط یک و یا تعداد کمی اگزون که برای توالی‌های اسیدآمینه‌ای یکسان و یا تقریباً یکسان رمزدهی می‌شوند به وجود می‌آیند. گفته می‌شود این اگزون‌های تکرارشونده از طریق چندین دفعه مضاعف شدن تصادفی طولی از DNA که این دو جایگاه در اینترون‌های مجاور قرار دارند تشکیل می‌گردند. که این واقع شدن بین جایگاه اینترونی، در اثر وارد شدن رشته‌ای از اگزون‌های تکرار شده و جدا شده توسط اینترون‌ها بین دو اینترون اصلی ایجاد می‌شوند. حضور اینترون‌های چندتایی در بسیاری از ژن‌های یوکاریوتی اجازه بیان پروتئین‌های چندتایی مرتبط به هم را از یک ژن منفرد از طریق پیرایش متناوب[3] فراهم می‌کند. در یوکاریوت‌های عالی، پیرایش متناوب مکانیسم مهمی برای تولید اشکال متفاوت یک پروتئین در انواع سلول‌ها است که به این پروتئین‌ها ایزوشکل (هم شکل) می‌گویند.

فیبرونکتین یک پروتئین چند دمینی هست که در پستانداران یافت شده و یک مثال خوب برای بیان پیرایش متناوب می‌باشد (شکل ۱۷ـ۱۴). فیبرونکتین پروتئینی چسبناک و بلندی است که به ناحیه بین سلولی ترشح شده و می‌تواند سایر پروتئین‌ها را به هم وصل کند. این که فیبرونکتین کجا و چه چیزی را متصل کند بستگی به این دارد که کدام دُمین‌ها با هم پیرایش شده باشند. ژن فیبرونکتین

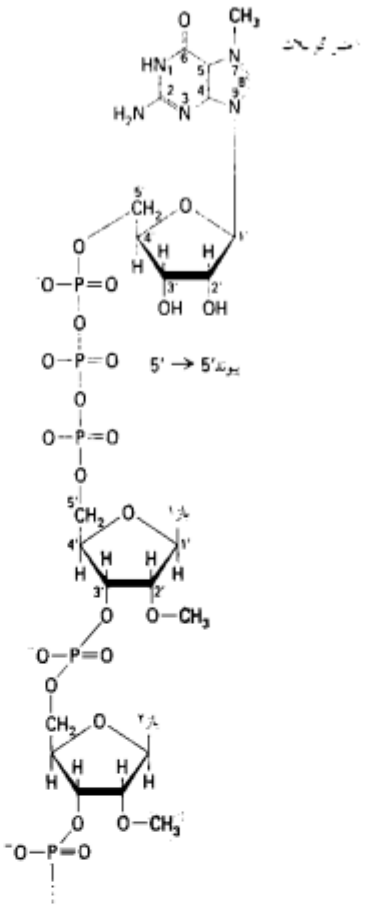
1- RNA processing 2- RNA splicing
3- Alternatie Splicing



▲ **شکل ۱۳-۴: (شکل رنگی) سازمان‌یابی ژن‌ها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها.** (a) اپرون تریپتوفان (trp) قطعه‌ای پیوسته از کروموزم E.coli می‌باشد که حاوی پنج ژن (آبی رنگ) است که آنزیم‌های ضروری برای سنتز قدم به قدم تریپتوفان را رمز می‌کنند. کل اپرون از یک پروموتر به صورت یک trp mRNA (قرمز رنگ) بلند و پیوسته رونویسی می‌شود. ترجمه این mRNA از ۵ جایگاه آغازین متفاوت شروع شده و باعث تولید پنج پروتئین (سبز رنگ) می‌شود. ترتیب ژن‌ها در ژنوم باکتریایی با اعمال متوالی پروتئین‌های رمزدهی شده در مسیر تریپتوفان همسو می‌باشد. (b) پنج ژن رمزدهی کنندهٔ آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز تریپتوفان در مخمر روی چهار کروموزوم مختلف حمل می‌شوند. هر ژن از پروموتر خودش الگوبرداری می‌شود تا اینکه یک رونوشت اولیه تولید کند که به صورت یک mRNA عملکردی رمزدهی کننده یک پروتئین پردازش می‌شود. طول کروموزوم‌های متنوع بر حسب کیلوباز (10^3 باز) نشان داده شده است.

حاوی چندین اگزون هست که در قالب چندین منطقه گروه‌بندی شده و مطابق با دُمین‌های خاصی در پروتئین هستند. فیبروبلاست‌ها، mRNA فیبرونکتین را تولید می‌کنند که حاوی اگزون‌های EIIIA و EIIIB می‌باشد. این اگزون‌ها توالی‌های اسیدآمینه‌ای را رمزدهی می‌کنند که در غشاء پلاسمایی فیبروبلاست محکم به پروتئین‌ها وصل می‌شوند. در نتیجه، این ایزوشکل فیبرونکتین باعث چسبیدن فیبروبلاست‌ها به ماتریکس خارج سلولی می‌شود. پیرایش متناوب رونوشت اولیه فیبرونکتین در هپاتوسیت‌ها، (عمده‌ترین نوع سلول‌های کبد)، باعث تولید mRNAهایی می‌شود که فاقد اگزون EIIIA و EIIIB می‌باشند. در نتیجه فیبرونکتین ترشح شده توسط هپاتوسیت‌ها به درون خون به صورت محکم به فیبروبلاست‌ها یا بیشتر انواع سلول‌ها وصل نمی‌شود و اجازه می‌دهد تا خون حالت سیال و جاری خود را داشته باشد. با وجود این در طول تشکیل لخته خون، دُمین‌های متصل‌شونده به فیبرین مربوط به فیبرونکتین هپاتوسیت، به فیبرین، یکی از پایه‌های سازنده لخته، متصل می‌شود. سپس فیبرونکتین متصل، با اینتگرین موجود بر روی غشاء پلاکت‌ها میانکنش داده و لذا با اتصال پلاکت‌ها، لخته گسترش می‌یابد.

بیش از ۲۰ ایزوشکل متفاوت فیبرونکتینی شناسایی شده است که هر کدام توسط یک mRNA پیرایش شده متناوب رمزدهی می‌شوند. این mRNA متشکل از ترکیب منحصر به فرد اگزون‌های ژن فیبرونکتین می‌باشد. توالی‌یابی‌های اخیر تعداد زیادی از mRNAهای جدا شده از بافت‌های متنوع و مقایسه توالی آنها با DNA ژنومی نشان داده است که نزدیک ۶۰ درصد تمام ژن‌های



▲ **شکل ۴-۱۴: ساختار کلاهک (cap) ′۵ متیله شده.** ویژگی‌های بارز شیمیایی یک کلاهک ′۵ متیله شده در mRNAهای یوکاریوتی عبارتند از: (۱) پیوند ′۵←′۵ ۷ متیل گوانیلات به نوکلئوتید آغازی مولکول mRNA، (۲) گروه متیل روی هیدروکسیل ′۲ ریبوز نوکلئوتید اول (باز ۱). هر دو این ویژگی‌ها در تمام سلول‌های جانوری و گیاهان عالی دیده می‌شوند. مخمرها فاقد گروه متیل روی نوکلئوتید ۱ هستند. ریبوز مربوط به نوکلئوتید دوم (باز ۲) نیز در مهره‌داران متیله می‌شود

انسانی از طریق mRNAهای پیرایش شده متناوب بیان می‌شوند. واضح است که پیرایش متناوب RNA به مقدار زیادی تعداد پروتئین‌های رمزدهی شده توسط ارگانیسم‌های پر سلولی عالی را توسعه داده است.

نکات کلیدی بخش ۲-۴

رونویسی ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌ها و تشکیل mRNA عملکردی

■ رونویسی از DNA توسط RNA پلیمراز صورت می‌گیرد که تک‌تک نوکلئوتیدها را در یک زمان به انتهای ′۳ زنجیرهٔ RNA در حال رشد اضافه می‌کند (شکل ۱۱-۴ را ملاحظه کنید). توالی رشتهٔ DNA مکمل وضعیتی را که در آن ریبونوکلئوتیدها در قالب زنجیرهٔ RNA پلیمریزه می‌شوند را تعیین می‌کند.

■ به هنگام شروع رونویسی، RNA پلیمراز به یک محل اختصاصی در DNA (پروموتور) متصل شده و به طور موضعی DNA دورشته‌ای را ذوب کرده تا رشته غیرمکمل را آشکار ساخته و دو نوکلئوتید اولیه مکمل رشته الگو را پلیمریزه می‌کند. منطقه ذوب شدهٔ ۱۴-۱۲ جفت بازی به عنوان «حباب رونویسی» نامیده می‌شود.

■ به هنگام طویل‌شدن رشته، RNA پلیمراز در طول DNA حرکت کرده و سر DNA مربوط به پلیمراز را ذوب کرده و سپس رشته مکمل می‌تواند وارد محل جایگاه فعال آنزیم شده و اجازه می‌دهد که رشته‌های DNA مکمل مناطق پشت آن رونویسی شود. حباب رونویسی با پلیمراز همزمان با اضافه کردن ریبونوکلئوتیدهای مکمل به رشته الگو توسط آنزیم به انتهای ′۳ زنجیره RNA در حال رشد حرکت می‌کند.

■ هنگامی که RNA پلیمراز به توالی خاتمه در DNA می‌رسد، آنزیم، رونویسی را متوقف کرده، باعث آزادی RNA مکمل و جداشدن آنزیم از DNA الگو می‌شود.

■ در DNA پروکاریوتی چندین ژن کدکننده پروتئین در یک منطق عملکردی بنام اوپرون گرد هم می‌آیند که در آن ژن‌ها از یک پروموتور به چندین mRNA کدکننده پروتئین‌ها با اعمال مربوط رونویسی می‌شوند (شکل ۱۳a-۴ را ملاحظه کنید). ترجمه mRNA باکتریایی می‌تواند قبل از سنتز کامل mRNA شروع شود.

■ در DNA یوکاریوتی، هر ژن کدکننده پروتئین فقط از پروموتور مربوط به خودش رونویسی می‌شود. رونوشت اولیه معمولاً دارای نواحی غیرکدکننده (اینترون‌ها) است که توسط مناطق کدکننده (اگزونها) از هم جدا شده‌اند.

■ رونوشت‌های اولیه یوکاریوتی باید متحمل پردازش RNA شوند تا RNAهای عملکردی حاصل شود. به هنگام پردازش، انتهاهای تمام رونوشت‌های اولیه از ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها با اضافه‌شدن کلاهک ′۵ و دم پلی A به ′۳ دچار تغییر می‌شوند. رونوشت‌های حاصل از ژن‌های حاوی اینترون‌ها متحمل پیرایش می‌شوند که در آن اینترونها برداشته شده و اگزون‌ها به هم متصل می‌شوند (شامل ۱۵-۴ را ملاحظه کنید).

■ دُمین‌های انفرادی در پروتئین‌های چندُمینی یافت شده در یوکاریوت‌های عالی اغلب توسط اگزون‌های منفرد یا تعداد کمی از اگزون‌ها کد می‌شوند. ایزوفورم‌های مختلف هر کدام از پروتئین‌ها در سلول‌های ویژه‌ای بیان می‌شوند زیرا پردازش متناوب اگزون‌ها ایزوفورم‌های مختلف تولید می‌کند.

۴ـ۳ رمزگشایی mRNA توسط tRNAها

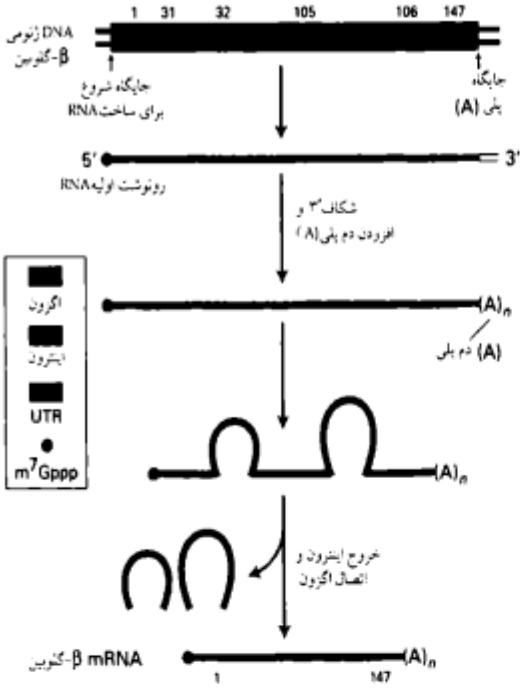
اگرچه DNA نگهدارنده اطلاعات برای سنتز پروتئین و mRNA حمل‌کننده ساختارهای رمزشده در DNA می‌باشد، ولی بیشتر فعایت‌های زیستی توسط پروتئین‌ها انجام می‌شوند. همان‌طور که در فصل ۳ دیدیم توالی خطی اسیدهای آمینه در هر پروتئین، تعیین‌کننده ساختار سه‌بعدی و فعالیت آن می‌باشد. به همین دلیل به‌هم پیوستن اسیدهای آمینه در ترتیب صحیح خودشان براساس آنچه که در DNA رمز شده است، برای تولید پروتئین‌های واجد عملکرد و لذا برای پیشبرد فعالیت‌های سلول‌ها و ارگانیسم‌ها ضروری و حیاتی می‌باشد.

ترجمه دربردارنده تمام فرآیندهایی است که توالی نوکلئوتیدی یک mRNA به عنوان یک الگو برای اتصال اسیدهای آمینه در قالب یک رشته پلی‌پپتیدی در یک ترتیب درست به کار می‌رود (شکل ۱ـ۴، ❸). در سلول‌های یوکاریوتی، سنتز پروتئین‌ها در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد یعنی جایی که سه نوع مولکول RNA گرد هم می‌آیند تا اعمال متفاوت ولی در عین حال، هماهنگی را انجام دهند (شکل ۱۷ـ۴).

۱ـ RNA پیک **(mRNA)** اطلاعات الگوبرداری شده از DNA را در یک شکل خطی حمل می‌کند. mRNA در قالب سری‌های توالی ۳ تایی نوکلئوتیدی بنام کدون خوانده می‌شود که هر کدام تعیین‌کننده یک اسیدآمینه خاصی می‌باشد.

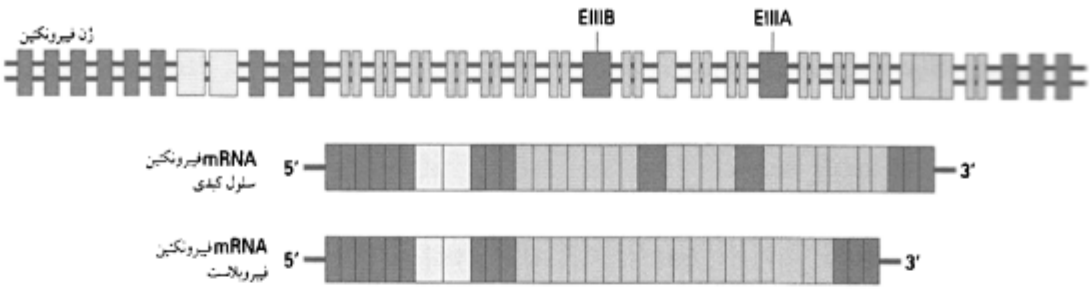
۲ـ RNA ناقل **(tRNA)** کلید رمزگشایی کدون‌های mRNA می‌باشد. هر نوع اسیدآمینه‌ای، tRNAهای مخصوص به خود دارد که به اسیدآمینه وصل شده و آن را به انتهای در حال رشد یک زنجیره پلی‌پپتیدی زمانی که کدون بعدی در mRNA آن را می‌خواند، حمل می‌کنند. tRNA صحیح با اسیدآمینه متصل به آن در هر مرحله‌ای، انتخاب می‌شود زیرا هر مولکول tRNA اختصاصی حاوی یک توالی سه نوکلئوتیدی به نام آنتی‌کدون هست که می‌تواند با کدون مکمل خود در mRNA، جفت باز تشکیل دهد.

۳ـ RNA ریبوزومی **(rRNA)** با دسته‌ای از پروتئین‌ها همراه می‌شود تا ریبوزوم‌ها را ایجاد می‌کند. این ساختارهای مجتمع که

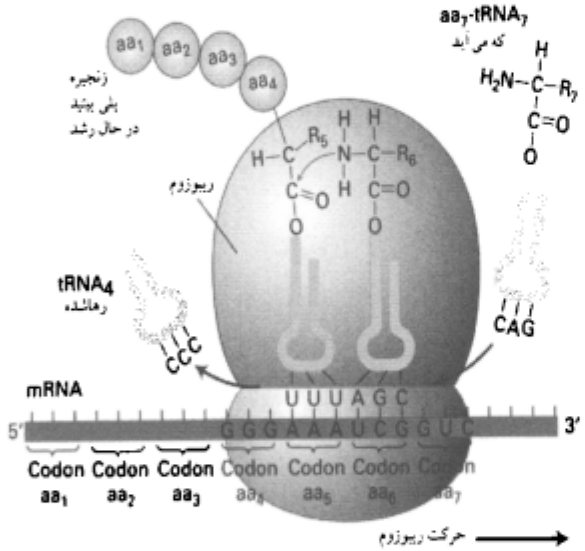


▲ **شکل ۱۵ـ۴: چرخه زندگی یک mRNA . مروری بر پردازش RNA.** پردازش RNA در یوکاریوت‌ها باعث تولید mRNA عملکردی می‌شود. ژن β گلوبین واجد ۳ اگزون رمزکننده پروتئین (ناحیه رمزکننده به رنگ قرمز) و دو اینترون فاصله انداز (آبی) می‌باشد. اینترون‌ها باعث گسسته‌شدن توالی رمزدهی کننده پروتئین در ناحیه کدون‌های اسیدهای آمینه ۳۱، ۳۲، ۱۰۵ و ۱۰۶ می‌شوند. الگوبرداری از ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین در یوکاریوت‌ها قبل از توالی رمزدهی کننده اولین اسیدآمینه شروع شده و تا بعد از توالی رمزکننده آخرین اسیدآمینه ادامه پیدا می‌کند و باعث تولید مناطق غیررمزگردان (خاکستری) در انتهای رونوشت اولیه می‌شود. این مناطق غیرقابل ترجمه (UTRs) در طول فرایند پردازش باقی می‌مانند. کلاهک ′۵ یا (m7Gppp) در طول فرایند تشکیل RNA رونوشت اولیه، متصل می‌شود که این RNA اولیه توسط ناحیه poly(A) گسترش می‌یابد. بعد از شکاف در ناحیه پلی (A) و افزوده شدن چندین ریشه A به انتهای ′۳، پیرایش باعث برداشته شدن اینترون‌ها و اتصال اگزون‌ها می‌شود. شماره‌های کوچک مربوط به موقعیت‌ها در توالی ۱۴۷ اسیدآمینه‌ای β گلوبین (β-globin) است.

به‌طور فیزیکی در طول یک مولکول mRNA حرکت می‌کنند به هم پیوستن اسیدهای آمینه در قالب رشته پلی‌پپتیدی را کاتالیز می‌کنند. این‌ها همچنین به tRNA و پروتئین‌های کمکی متنوعی که برای سنتز پروتئین ضروری هستند، وصل می‌شوند. ریبوزوم‌ها از دو زیر واحد بزرگ و کوچک تشکیل شده‌اند که هر کدام حاوی مولکول یا



▲ **شکل ۱۶-۴ (شکل رنگی): پیرایش متناوب.** ژن فیبرونکتین (حدود ۷۴kb) (بالا) حاوی چندین اگزون هست. ویرایش فیبرونکتین بسته به نوع سلول متنوع است. اگزون‌های EIIIA و EIIIB (سبز) دمین‌های متصل را برای پروتئین‌های خاصی روی سطح فیبروبلاست‌ها رمزدهی می‌کنند. mRNA فیبرونکتین تولید شده در فیبروبلاست‌ها شامل اگزون‌های EIIIB و EIIIA می‌باشد. با این حال این اگزون‌ها در mRNA هپاتوسیت‌ها خارج می‌شوند. در این طرح اینترون‌ها (خطوط سیاه) با مقیاس رسم نشده‌اند و بیشتر آنها بلندتر از هر کدام از اگزون‌ها هستند.



◀ **شکل ۱۷-۴ (شکل رنگی): سه نقش RNA در سنتز پروتئین.** RNA پیک (mRNA) از طریق عملکرد با هم RNA ناقل (tRNA) و ریبوزوم‌ها به پروتئین ترجمه می‌شود. که این ریبوزوم‌ها از چندین پروتئین و دو RNA ریبوزومی و rRNA تشکیل شده‌اند (نشان داده نشده). جفت شدن بازی بین آنتی کدون‌های tRNA و کدون‌های مکمل در mRNA قابل توجه است. تشکیل یک پیوند پپتیدی بین گروه آمینوی N روی اسیدآمینه ـ tRNA (aa-tRNA) تازه آمده و انتهای کربوکسیل C روی زنجیره پروتئین در حال رشد (سبز) از طریق یکی از rRNAها کاتالیز می‌شود. (اسیدآمینه = aa، زنجیره جانبی = R)

مولکول‌های rRNA مخصوص به خود هستند.

این سه نوع RNA در تمام موجودات زنده در سنتز پروتئین شرکت دارند. در واقع ایجاد RNAهای مجزای سه عملکردی احتمالاً کلید مولکولی برای منشأ حیات بوده است. در این بخش ما بر روی رمزگشایی mRNA توسط مبدل‌های tRNAای و اینکه چگونه ساختار هر کدام از این RNAها با عملکرد خاص آن ربط پیدا می‌کند، می‌پردازیم. اینکه چگونه با rRNA، ریبوزوم‌ها و سایر عوامل پروتئینی برای سنتز پروتئین‌ها همراه می‌شوند در بخش بعدی مورد بررسی قرار می‌گیرد. از آنجا که ترجمه برای سنتز پروتئین ضروری هست این دو پدیده [ترجمه و سنتز پروتئین] اغلب به جای هم بکار برده می‌شوند. با وجود این، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی به وجود آمده از طریق ترجمه، بعد از ترجمه تاخورده و اغلب متحمل سایر تغییراتی (مثل: تغییرات شیمیایی، تجمع با سایر زنجیره‌ها) می‌شوند که برای تولید پروتئین‌های واجد عملکرد و بالغ ضروری هستند (فصل ۳).

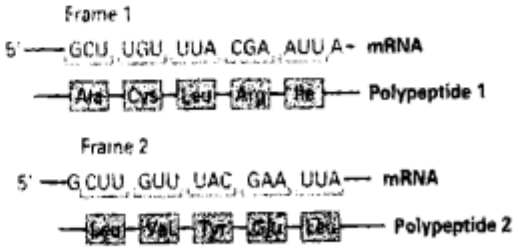
RNAها اطلاعات را از DNA در شکل یک رمز ژنتیکی سه حرفی انتقال می‌دهند.

همان‌طور که در بالا اشاره شد کد ژنتیکی مورد استفاده توسط سلول‌ها یک رمز یا کد سه تایی می‌باشد. هر توالی سه نوکلئوتیدی یا کدون از یک جایگاه شروع خاصی در mRNA خوانده می‌شود. از ۶۴ کدون ممکن در رمز ژنتیکی، ۶۱ تا مربوط به اسیدهای آمینه و ۳ تا مربوط به کدون پایان می‌باشد. جدول ۱-۴ نشان می‌دهد که بیشتر اسیدهای آمینه با بیش از یک کدون رمزدهی می‌شوند. تنها دو

جدول ۱ـ۴ کد ژنتیکی (رمزهای اسیدآمینه‌ها).

موقعیت اول (انتهای ۵')	موقعیت دوم: U	C	A	G	موقعیت سوم (انتهای ۳')
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu (Met)*	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (Start)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (Met)*	Ala	Glu	Gly	G

(AUG غالب‌ترین رمز آغاز، GUG معمولاً والین و CUG معمولاً لوسین را رمز می‌کند اما ندرتاً این کدون‌ها می‌توانند به متیونین هم رمز بدهند که به عنوان رمز آغاز زنجیره پروتئین عمل می‌کنند.



▲ **شکل ۱۸ـ۴: قالب خواندن چندتایی در توالی mRNA.** اگر ترجمه توالی mRNA نشان داده شده از دو جایگاه متفاوت در منطقه فرادست شروع شود (جایگاه‌های شروع نشان داده نشده)، بنابراین دو قالب خواندن همپوشان امکان‌پذیر خواهد بود. در این مثال، کدون‌ها در قالب تیره‌تر دچار یک تغییر به اندازه یک باز به طرف راست شده‌اند. در نتیجه همان توالی نوکلئوتیدی در طول ترجمه، اسیدهای‌آمینه متفاوتی را بیان می‌کند. با وجود این‌که دو قالب خواندن از مجموع سه قالب خواندن به ندرت رخ می‌دهد مثال‌هایی هم در پروکاریوت‌ها و هم در یوکاریوت‌ها و بخصوص در ویروس‌ها وجود دارد که در اینها یک توالی مشابه از mRNA در دو مسیر ترجمه می‌شود که خود این توالی mRNA از یک توالی DNA بیان می‌شود به این صورت که دو قالب خواندن در مورد یک توالی mRNA اِعمال می‌شود. حتی مثال‌هایی وجود دارد که یک توالی یکسان در هر سه قالب خواندن، خوانده می‌شود.

سید آمینه (متیونین و تریپتوفان) دارای کدون منفرد هستند و در مقابل لوسین، سرین و آرژینین هر کدام دارای شش کدون متفاوت هستند. کدون‌های متفاوت برای یک اسیدآمینه معین، مترادف[1] نامیده می‌شوند. این‌که گفته می‌شود رمز استحاله‌ای[2] است یعنی این‌که یک اسید آمینه خاص با چندین کدون تعیین می‌شود. سنتز همه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی با اسید آمینه متیونین آغاز می‌شوند. در باکتری‌ها یک شکل اختصاصی متیونین استفاده می‌شود که واجد یک گروه فرمیل متصل به گروه آمینوی آن می‌باشد. در بیشتر mRNAها، کدون آغاز تعیین‌کننده این متیونین انتهای آمینی، AUG می‌باشد. در برخی mRNAهای باکتریایی، GUG به عنوان رمز آغاز استفاده می‌شود و CUG گاهاً به عنوان رمز آغاز برای متیونین در یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود. سه کدون UAA، UGA و UAG به هیچ اسیدآمینه‌ای اختصاص ندارند و تقریباً تعیین‌کننده رمز پایان هستند که نشانگر انتهای کربوکسیل زنجیره پلی‌پپتیدی تقریباً در تمام سلول‌ها می‌باشند. توالی کدون‌هایی که از یک جایگاه شروع خاص تا یک کدون پایان ادامه دارند یک «قالب خواندن»[3] نامیده می‌شود. این ترتیب دقیق خطی ریبونوکلئوتیدها در گروه‌های سه تایی در mRNA، تعیین‌کننده توالی دقیق خطی اسیدهای آمینه در یک زنجیره پلی‌پپتیدی و نیز نشانگر محل شروع و اتمام سنتز زنجیره می‌باشد.

چون رمز ژنتیکی به صورت کدون یا رمز سه تایی فاقد همپوشانی و نیز بدون فاصله یا جدایی بین رمزها می‌باشد از لحاظ تئوری، یک mRNA خاص باید بتواند در سه قالب خواندن متفاوت ترجمه شود. در واقع نشان داده شده است که برخی mRNAها حاوی اطلاعات همپوشان هستند که می‌تواند در قالب‌های خواندن متفاوت ترجمه شده و پلی‌پپتیدهای متفاوتی حاصل شود (شکل ۴ـ۱۸). با وجود این تعداد زیادی از mRNAها تنها یک قالب دارند که این به دلیل آن هست که رمزهای پایانی مواجه شده در دو قالب خواندن ممکن دیگر، باعث پایان ترجمه قبل از تولید یک پروتئین دارای عملکرد می‌شوند. به ندرت یک آرایش رمز غیرمعمول به خاطر تغییر قالب[4] ایجاد می‌شود. در این مورد ماشین سنتز پروتئین ممکن هست چهار نوکلئوتید را به عنوان یک اسیدآمینه بخواند و سپس به خواندن سه تایی ادامه دهد و یا ممکن است از یک باز استفاده کرده و تمام سه تایی‌های بعدی را در یک قالب تازه بخواند تا اینکه به پایان زنجیره برسند. تنها مثال‌های کمی از این حالت شناخته شده است.

معنی هر کدون در بیشتر ارگانیسم‌های شناخته شده یکسان هست که یک دلیل قوی این است که زندگی در زمین یک بار تکامل یافته است. در واقع رمز ژنتیکی نشان داده شده در جدول ۱ـ۴ به عنوان رمز یاکد همگانی (جهانی)[5] می‌باشد. با وجود این مشخص است که رمز ژنتیکی برای تعداد کدون‌های کمی در بسیاری از میتوکندری‌ها، پروتوزوآهای پرزدار و استوبولاریا[6]، یک گیاه تک سلولی، متفاوت هست. همان‌طور که در جدول ۲ـ۴ نشان داده شده بیشتر این تغییرات دربردارندهٔ خواندن رمزهای پایان طبیعی به عنوان اسیدآمینه هستند تا اینکه اسیدآمینه‌ای با دیگری مبادله شود.

این استثناها در مورد رمزهای عمومی، به احتمال زیاد در گذشته وسیلهٔ تکاملی بودند به این معنی که با وجود این‌که در آن زمان که رمزهای عمومی در اوایل تکامل شروع به فعالیت کردند، تغییرات عظیم حفظ نمی‌شد، در هیچ زمانی رمزها حفظ شده نبودند.

ساختار تاشدهٔ tRNA، آغازگر فعالیت رمزگشایی آن می‌باشد

ترجمه یا رمزگشایی از زبان چهار نوکلئوتیدی DNA و mRNA به زبان ۲۰ اسیدآمینه‌ای پروتئین‌ها نیازمند tRNAها و آنزیم‌هایی هست که آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز نامیده می‌شوند. یک مولکول tRNA برای شرکت در سنتز پروتئین، باید از طریق یک پیوند با انرژی بالا به صورت شیمیایی به اسیدآمینه خاصی وصل شود. این فرایند باعث تشکیل یک آمینواسیل ـ tRNA (شکل ۱۹ـ۱۴) می‌شود. سپس آنتی کدون در tRNA با کدونی در mRNA جفت بازی تشکیل می‌دهد تا اینکه اسید آمینه فعال شده بتواند به زنجیره در حال رشد وصل شود (شکل‌های ۱۷ـ۴ و ۱۸ـ۴).

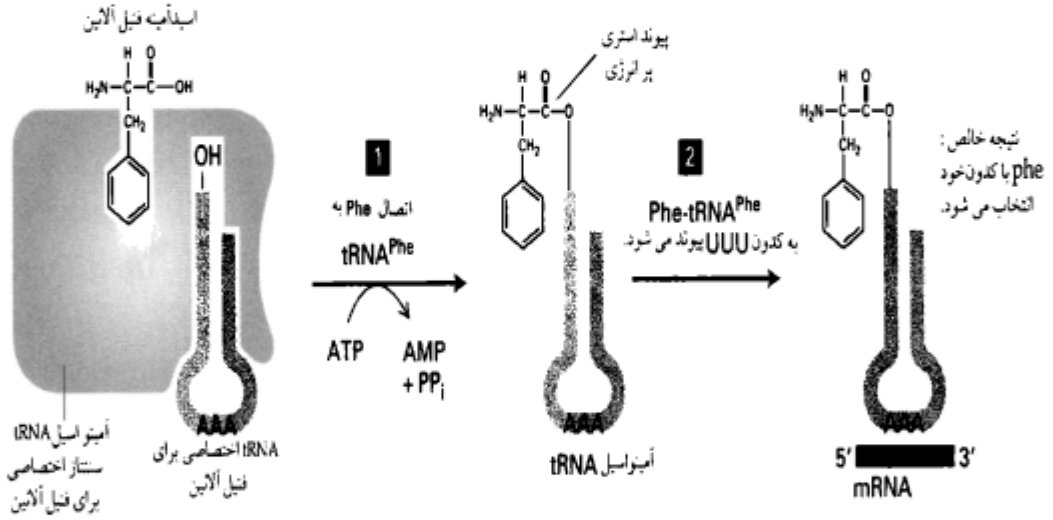
۳۰ـ۴۰ tRNA متفاوت در سلول‌های باکتریایی و بیش از ۵۰ الی ۱۰۰ tRNA متفاوت در سلول‌های گیاهی و جانوری شناسایی شده‌اند. لذا تعداد tRNAها در بیشتر سلول‌ها بیشتر از تعداد اسیدهای آمینه استفاده شده در سنتز پروتئین (۲۰ عدد) می‌باشد. و نیز این تعداد (تعداد tRNA) از تعداد کدون‌های اسیدهای آمینه در رمز ژنتیکی (۶۱ عدد) هم متفاوت است. بنابراین برای بسیاری از اسیدهای آمینه بیش از یک tRNA وجود دارند که می‌توانند به آن وصل شوند (این امر موید این مسئله هست که چطور tRNAها می‌توانند از اسیدهای آمینه بیشتر باشند). علاوه بر این بسیاری از tRNAها دارای این توانایی هستند که با بیش از یک کدون جفت شوند (این پدیده توصیف‌کننده این است که چگونه امکان

1- Synonymous
2- Degenerate
3- reading frame
4- Frame-Shifting
5- Universal Code
6- Acetabularia

جدول ۲ـ۴: انحراف‌های شناخته شده از کد ژنتیکی جهانی.

کدون	رمز جهانی	کد غیر طبیعی	محل حضور
UGA	ایست	Trp	مایکوپلاسما - اسپیروپلاسما - میتوکندری بسیاری از گونه ها
CUG	Leu	Thr	میتوکندری در مخمر
UAA, UAG	ایست	Gln	آستیلولاریا - تتراهیمنا پاراماسی و ...
UGA	Stop	Cys	*Euplotes*

یافته شده در ژن‌های هسته ای ارگانیسم های لیست شده و در ژن‌های میتوکندریایی



▲ **شکل ۱۹ـ۴: رمزگشایی توالی اسیدنوکلئیک به توالی آمینواسیدی.** فرآیند ترجمه توالی‌های اسیدهای نوکلئیک در mRNA به توالی‌های اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها شامل دو مرحله است: مرحله ❶: ابتدا یک آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز یک اسید آمینه اختصاصی را از طریق یک پیوند استری پر انرژی به هیدروکسیل ′۲ یا ′۳ آدنوزین انتهایی در tRNA وصل می‌کند. مرحله ❷: سپس یک توالی ۳ بازی در tRNA (آنتی کدون) با یک کدون در mRNA تعیین‌کننده اسید آمینه اتصالی جفت می‌شود. اگر در هر کدام از مراحل اشتباهی رخ دهد، اسیدآمینه اشتباه ممکن است وارد زنجیره پلی‌پپتیدی شود (Phe = فنیل آلانین)

دارد تعداد کدون‌ها بیش از tRNAها باشد).

عملکرد مولکول‌های tRNA که دارای طول حدود ۷۰ الی ۸۰ نوکلئوتید هستند به ساختار سه‌بعدی دقیق آنها بستگی دارد. تمام مولکول‌های tRNA درون سلول به صورت آرایش مشابه ساقه ـ حلقه در می‌آیند که وقتی به صورت دو بعدی رسم شود شبیه برگ شبدر می‌باشد (شکل a ۲۰ـ۴). در این ساختار چهار ساقه موجود، مارپیچ‌های دورشته‌ای کوتاهی هستند که از طریق جفت‌های بازی واتسون ـ کریک پایدار می‌شوند. سه تا از ساقه‌ها دارای حلقه‌هایی با هفت یا هشت باز در انتهای خود هستند در حالی که ساقه چهارم بدون حلقه بوده و دارای انتهاهای ′۳ و ′۵ زنجیره می‌باشد. سه نوکلئوتید تشکیل‌دهنده آنتی‌کدون در مرکز حلقه وسط قرار گرفته‌اند که در یک موقعیت قابل دسترس بوده و باعث سهولت جفت شدن کدون ـ آنتی

کدون می‌شود. در تمام tRNAها انتهای ′۳ غیرحلقه‌ای ساقهٔ گیرنده دارای توالی CCA می‌باشد که در بیشتر مواقع، این توالی بعد از ساخته شدن و پردازش tRNA به آن اضافه می‌شود. همچنین چندین باز در بیشتر tRNAها بعد از الگوبرداری، دچار تغییر شده که باعث تولید نوکلئوتیدهای غیراستاندارد همچون اینوزین، دی‌هیدروریدین و پسودوریدین می‌شود. همان‌طور که خواهیم دید برخی از این بازهای تغییر یافته در سنتز پروتئین نقش مهمی ایفا می‌کنند. از دیدگاه سه بعدی، مولکول tRNA تاخورده، دارای شکل L مانند با یک حلقه آنتی کدون و یک ساقه گیرنده است که انتهاهای دو بازوی این ساختار را تشکیل می‌دهد (شکل b ۲۰ـ۴).

جفت شدن بازی غیراستاندارد اغلب بین کدون و آنتی کدون اتفاق می‌افتد

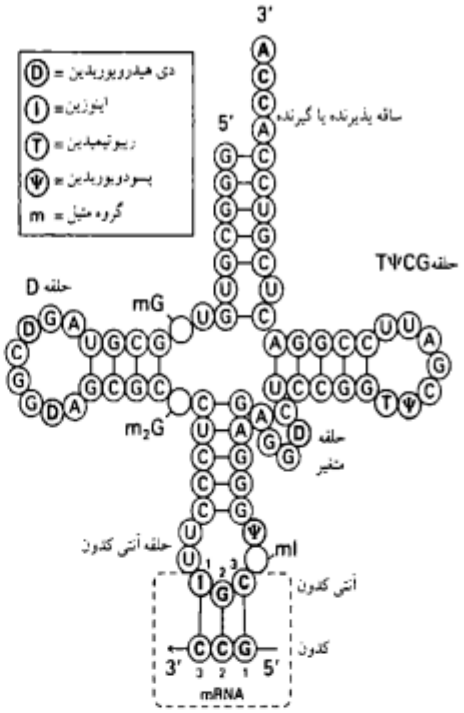
اگر جفت شدن بازی کامل واتسون کریکی بین کدون‌ها و آنتی کدون‌ها مدنظر باشد سلول‌ها مجبور هستند که حداقل ۶۱ نوع مختلف tRNA به صورت یکی برای هر کدون که تعیین‌کننده یک آسیدآمینه می‌باشد داشته باشند. با وجود این همان‌طور که در بالا اشاره شد بسیاری از سلول‌ها کم‌تر از ۶۱ نوع tRNA دارند. توصیف این پدیده یعنی کم‌تر بودن تعداد، به توانایی یک آنتی‌کدون tRNA که بیش از یک کدون را (البته ضرورتاً نه هر کدونی را) تشخیص می‌دهد بستگی دارد. این توانایی شناخت گسترده می‌تواند به دلیل جفت شدن غیراستانداردی باشد که بین بازها در ناحیه یا موقعیتی که موقعیت باز لرزان[1] نامیده می‌شود اتفاق می‌افتد که این موقعیت عبارتست از سومین باز (′۳) در یک کدون mRNA و باز مطابق آن در آنتی کدون tRNA یعنی باز (′۵). اولین و دومین باز یک کدون تقریباً همیشه به ترتیب با سومین و دومین باز آنتی کدون مطابق آن کدون جفت باز استاندارد واتسون ـ کریک را تشکیل می‌دهند ولی چهار میانکنش غیراستاندارد در موقعیت لرزان می‌تواند بین بازها اتفاق بیفتد. به خصوص در مورد جفت باز G.U که از لحاظ ساختاری تقریباً همانند G.C مناسب است این مسئله اهمیت دارد. بنابراین آنتی کدون معین در tRNA با باز G در موقعیت اول لرزان می‌تواند با کدون مطابق آن که دارای پیریمیدین (C یا U) در موقعیت سوم هست، جفت شود (شکل ۲۱ـ۴). مثلاً کدون‌های فنیل‌آلانین UUU و UUC (′۳→′۵) هر دو توسط tRNAی که واجد GAA (′۳→′۵) در آنتی کدون خود هست شناسایی می‌شوند.

در واقع هر کدام از دو نوع کدون‌های NNPyr (N = هر نوع باز، Pyr = پیریمیدین) یک اسیدآمینه منفرد را رمزدهی می‌کنند و توسط یک تک tRNA با G در موقعیت اول (لرزان) آنتی‌کدون رمزگشایی می‌شوند. گرچه به ندرت آدنین در موقعیت باز لرزان آنتی‌کدون یافت می‌شود، ولی بسیاری از tRNAها در گیاهان و جانوران در این موقعیت حاوی اینوزین (I)، یعنی یک محصول دآمینه شده از آدنین هستند. اینوزین می‌تواند با A، C و U جفت باز غیراستاندارد تشکیل دهد. لذا یک tRNA با اینوزین موجود در موقعیت باز لرزان می‌تواند کدون‌های mRNA مطابق با آنتی کدون را که واجد A، C و یا U در موقعیت سوم (لرزان) هستند شناسایی کند (شکل ۲۱ـ۴). به این دلیل، tRNAهای حاوی اینوزین به شدت در ترجمه کدون‌های مترادف که تعیین‌کننده یک اسیدآمینه منفرد هستند به کار گرفته می‌شوند. برای مثال: چهار تا از شش کدون مربوط به لوسین (UUA و CUU، CUC و CUA) همگی توسط یک tRNA یکسان با آنتی کدون ′۵ ـ GAI ـ ′۳ قابل شناسایی هستند. اینوزین در موقعیت باز لرزان با باز سوم در این چهار کدون جفت باز غیراستاندارد تشکیل می‌دهد. در مورد کدون UUA، یک جفت باز غیراستاندارد G.U هم بین موقعیت ۳ آنتی کدون و موقعیت ۱ کدون تشکیل می‌شود.

اسیدهای آمینه زمانی که به صورت کووالان به tRNAها متصل می‌شوند، فعال می‌گردند

شناسایی کدون و یا کدون‌های اختصاصی برای یک اسیدآمینه معین توسط یک tRNA مخصوص در واقع مرحله دوم در رمزگشایی پیام ژنتیکی می‌باشد. مرحله اول، اتصال اسیدآمینه مناسب به یک tRNA هست که توسط یک آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز اختصاصی کاتالیز می‌شود. هر کدام از ۲۰ سنتتاز متفاوت، یک اسیدآمینه و تمام tRNAهای سازگار یا خویشاوند را شناسایی می‌کنند. این آنزیم‌های اتصال‌دهنده، یک اسیدآمینه را به گروه هیدروکسیل آزاد ′۲ یا ′۳ آدنوزین در انتهای ′۳ مولکول tRNA در یک واکنش نیازمند به ATP وصل می‌کنند. در این واکنش اسیدآمینه با یک پیوند پر انرژی به tRNA متصل می‌شود و به این دلیل هست که گفته می‌شود فعال شده است. بعداً انرژی این پیوند باعث تشکیل پیوندهای پپتیدی متصل‌کننده اسیدهای آمینه مجاور به هم در یک زنجیره در حال رشد پلی‌پپتیدی می‌شود. تعادل واکنش آمینواسیلاسیون بیشتر در جهت فعال شدن اسیدهای آمینه و از طریق هیدرولیز پیوند پر انرژی فسفوانیدرید در پیروفسفات رها شده پیش می‌رود (شکل ۱۹ـ۴).

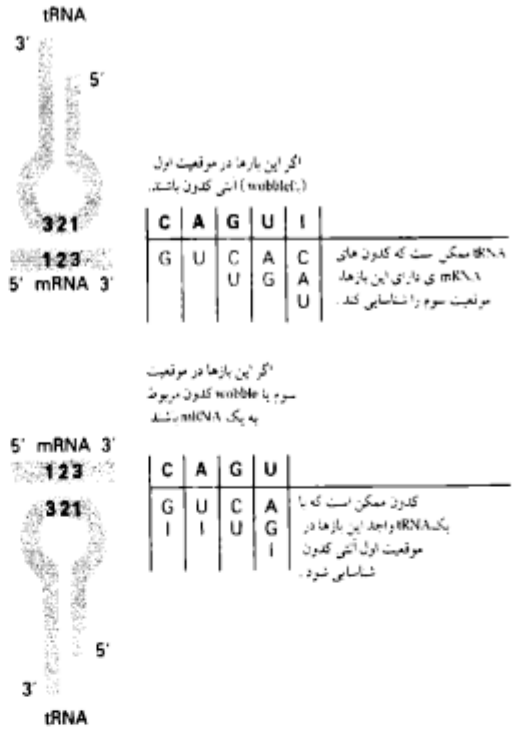
1- Wobble position



شکل ۲۰-۴: ساختار tRNAها. (a) اگرچه توالی دقیق نوکلئوتیدی بین tRNAها متغیر است با وجود این همه آنها به صورت چهار ساقه جفت بازی و سه حلقه تا می‌خورند. توالی در انتهای CCA در انتهای ′۳ تمامی tRNAها وجود دارد. اتصال یک اسیدآمینه به A در انتهای ′۳ موجب تشکیل یک آمینواسیل ـ tRNA می‌شود. در بیشتر tRNAها برخی از ریشه‌های A، C، G و U بعد از الگوبرداری دچار تغییر می‌شوند دی هیدروریبدین (D) تقریباً همیشه در حلقه D وجود دارد. همین‌طور ریبوتیمیدین (T) و پسودوریبدین (ψ) تقریباً همشه در حلقه TΨCG حضور دارند. tRNA آلانین مخمر نشان داده شده در اینجا نیز حاوی سایر بازهای تغییر یافته می‌باشد. سه باز موجود در نوک حلقه آنتی کدون با کدون مطابق در mRNA جفت می‌شود. (b) مدل سه‌بعدی برای تمام tRNAها نشان‌دهنده شکل L مانند مولکول می‌باشد.

آمینواسیل ـ tRNA سنتتازها، tRNAهای خویشاوندی خود را از طریق میانکنش اولیه با حلقه آنتی کدون و ساقه پذیرنده شناسایی می‌کنند. با این حال میانکنش با سایر مناطق یک tRNA هم در برخی موارد در تشخیص نقش دارند. همچنین بازهای خاصی در tRNAهای ناصحیح که از لحاظ ساختاری شبیه به یک خویشاوند tRNA هستند از بارگیری آن tRNA اشتباه جلوگیری خواهند کرد. بنابراین شناسایی tRNA صحیح هم به وجود میانکنش‌های مثبت و عدم وجود میانکنش‌های منفی بستگی دارد. چون برخی اسیدهای آمینه از لحاظ ساختار خیلی شبیه هم هستند، آمینواسیل ـ tRNA سنتتازها گاهی اوقات دچار اشتباه می‌شوند. با وجود این، این خطاها توسط خود آنزیم‌ها که دارای فعالیت غلط‌گیری[1] هستند برطرف می‌شود. این فعالیت یا ویژگی آنزیم‌هامناسب بودن جایگاه اتصال اسیدآمینه را کنترل می‌کند. اگر یک اسیدآمینه اشتباهاً به tRNA وصل شود، سنتتاز اتصال یافته، برداشت اسیدآمینه از tRNA را کاتالیز می‌کند. این عمل حیاتی تضمین‌کننده این پدیده است که یک tRNA، اسید آمینه صحیحی را به ماشین سنتز پروتئین تحویل دهد. نرخ کلی اشتباه برای ترجمه در E.coli بسیار پایین و حدود یک اشتباه به ازاء ۵۰۰۰۰ کدون می‌باشد که این مدرکی بر صحت شناسایی tRNA و نیز اهمیت غلط‌گیری توسط آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز می‌باشد.

1- Proofreading



▲ **شکل ۲۱-۴: جفت بازهای غیراستاندارد در موقعیت باز لرزان.**

باز موجود در موقعیت سوم (یا لرزان) مربوط به یک کدون mRNA اغلب با باز موجود در موقعیت اول (یا لرزان) یک آنتی کدون tRNA، جفت باز غیراستاندارد تشکیل می‌دهد. جفت شدن لرزان به یک tRNA این امکان را فراهم می‌کند تا بیش از یک کدون mRNA (بالا) و بالعکس، را شناسایی کند به یک کدون اجازه می‌دهد تا توسط بیش از یک نوع tRNA شناسایی شود (پایین) با اینکه هر tRNA اسیدآمینه یکسانی را خواهد آورد. گفته می‌شود که یک tRNA با اینوزین (I) در موقعیت لرزان می‌تواند سه کدون متفاوت را بخواند (یعنی با آنها جفت شود) و یک tRNA با G یا U در موقعیت لرزان می‌تواند دو کدون را بخواند. اگرچه وجود A در موقعیت لرزان آنتی‌کدون از لحاظ تئوری امکان‌پذیر است ولی تقریباً هرگز در طبیعت یافت نشده است.

نکات کلیدی بخش ۳-۴

کدشدن mRNA توسط tRNAها

- اطلاعات ژنتیکی از DNA به صورت mRNA و در شکل هم‌پوشانی و استحاله کدهای سه‌تایی رونویسی می‌شود.
- هر اسید آمینه توسط یک یا تعداد زیادی از توالی‌های سه نوکلئوتیدی (کدون‌ها) در mRNA کد می‌شود. هر کدون برای هر اسید آمینه اختصاصی است اما بسیاری از اسیدهای آمینه توسط چندین کدون کد می‌شوند (جدول ۱-۴ را ملاحظه کنید).
- کدون AUG برای متیونین بیشترین کدون شروع معمول است که به طور ویژه انتهای NH_2 زنجیرهٔ پروتئینی را بوجود آورد. سه کدون (UAA,UAG,UGA) به عنوان کدونهای خاتمه عمل کرده و برای هیچ اسید آمینه‌ای اختصاصی نیستند.
- قالب خواندنی یا همان توالی پشت سرهم و بدون فاصله کدونها در mRNA از کدون آغاز تا کدون پایانی، به توالی خطی از اسیدآمینه در زنجیره‌های پلی پپتیدی ترجمه می‌شود.
- کدشدن توالی‌های نوکلئوتیدی در mRNA به توالیهای اسید آمینه‌ای در پروتئین‌ها به tRNAها و آمینواسیل tRNA- سنتتازها وابسته است.
- تمام tRNAها ساختار سه‌بعدی مشابهی دارند که حاوی یک بازوی پذیرنده برای اتصال به یک اسید آمینه اختصاصی و یک ساقه - حلقه با توالی سه باز آنتی کدون در انتها است (شکل ۲۰-۴ را ملاحظه کنید). آنتی کدون می‌تواند با کدون مربوطه در mRNA جفت باز تشکیل دهد.
- tRNA ممکن است به علت برهمکنش‌های غیراستاندارد با بیش از یک کدون mRNA جفت باز تشکیل دهد؛ متقابلاً یک کدون مشخص ممکن است با چندین tRNA جفت باز تشکیل دهد. با این حال در هر کدام از این موارد، فقط اسید آمینه مناسب به زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی در حال رشد الحاق می‌شود.
- هر ۲۰ آمینواسیل - tRNA سنتتازها فقط یک اسید آمینه را شناسایی کرده و فقط به tRNA مربوط به آن به صورت کوالان متصل می‌شوند و آمینواسیل - tRNA را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۹-۴ را ملاحظه کنید). این واکنش، اسید آمینه را فعال کرده و بنابراین اسید آمینه در تشکیل پیوند پپتیدی مشارکت می‌کند.

۴-۴ ساخت مرحله به مرحله پروتئین‌ها روی ریبوزوم‌ها

بخش قبلی دو عنصر مهم در سنتز پروتئین (یعنی mRNA و tRNA آمینواسیله شده) را معرفی کرد. در ابتدا سومین عنصر ایفاگر نقش در سنتز پروتئین - یعنی ریبوزوم حاوی rRNA - را قبل از پرداختن جزئی‌تر به اینکه چگونه این سه عنصر با هم جمع می‌شوند تا وقایع بیوشیمیایی منتهی به تشکیل زنجیره‌های پلی‌پپتیدی روی ریبوزوم‌ها را هدایت کنند را معرفی می‌کنیم. مشابه الگوبرداری، کل فرایند ترجمه می‌تواند به سه مرحله تقسیم شود. آغاز، طویل شدن و خاتمه که به ترتیب بررسی می‌شوند. ما روی ترجمه در سلول‌های

یوکاریوتی دقیق می‌شویم ولی مکانیسم ترجمه اساساً در تمام سلول‌ها مشابه است.

ریبوزوم‌ها ماشین‌های سنتز پروتئین‌ها هستند

اگر اجزاء بسیاری از ترکیباتی که در ترجمه mRNA شرکت می‌کنند، وادار شوند که در یک محلول آزاد میانکنش دهند احتمال به هم خوردن همزمان این اجزاء و در نتیجه و نرخ پلیمریزاسیون اسیدهای آمینه نیز بسیار کم خواهد بود. راندمان ترجمه با اتصال mRNA و آمینواسیل ـ tRNAهای انفرادی به ریبوزوم به شدت افزایش می‌یابد. ریبوزوم به عنوان فراوان‌ترین کمپلکس RNA ـ پروتئین در سلول، طویل شدن یک پلی‌پپتید در نرخ اتصال سه تا پنج اسیدآمینه در هر ثانیه را هدایت می‌کند. لذا پروتئین‌های کوچک با ۱۰۰ الی ۲۰۰ اسیدآمینه در عرض یک دقیقه یا کم‌تر ساخته می‌شوند. از طرف دیگر برای ساخت بزرگ‌ترین پروتئین شناخته شده، یعنی تیتین[1] که در ماهیچه یافت می‌شود و حاوی حدود ۳۰۰۰۰ اسیدآمینه می‌باشد ۲ الی ۳ ساعت زمان لازم است. ماشین سلولی انجام دهندهٔ این کار باید دقیق و پایدار باشد.

با به کار بردن میکروسکوپ الکترونی، ریبوزوم‌ها در ابتدا به صورت ذرات ریز مجزای غنی از RNA در سلول شناسایی شدند که واجد مقدار زیادی پروتئین بودند. با وجود این نقش آنها در سنتز پروتئین تا زمانی که شرایط نسبتاً خالصی از ریبوزوم‌ها فراهم نشده بود شناخته نشده بود.

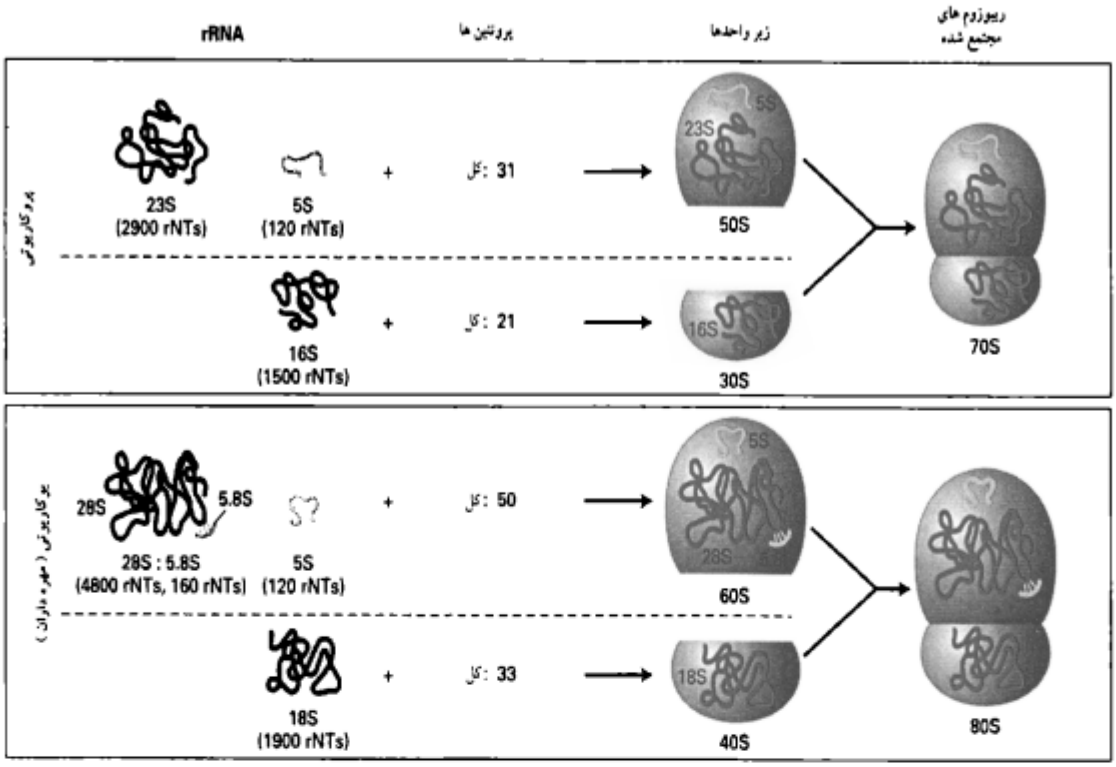
آزمایش‌های نشان‌دارکردن با مواد رادیواکتیو در شرایط آزمایشگاهی با مهیاسازی نسبتاً خالص ریبوزوم‌ها نشان داد که اسیدهای آمینه رادیواکتیو قبل از آن که در زنجیره‌های پایان یافته دیده شوند ابتدا وارد زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی در حال رشد که همراه ریبوزوم‌هاست می‌شود.

اگرچه تفاوت‌هایی بین ریبووزم‌های پروکاریوتی و یوکاریوت‌ها وجود دارد. ولی شباهت ساختاری عمده و عملکردی آنها بین ریبوزوم‌های تمام گونه‌ها نشان‌دهنده منشأ تکاملی مشترک بیشتر اجزاء اصلی سازنده سلول‌های زنده می‌باشد. یک ریبوزوم از سه (در باکتری‌ها) یا چهار بخش (در یوکاریوت‌ها) با مولکول‌های rRNA متفاوت و حدود ۸۳ پروتئین تشکیل شده است که در قالب یک زیر واحد بزرگ و یک زیر واحد کوچک سازمان یافته‌اند (شکل ۲۲ـ۴). زیر واحدهای ریبوزومی و مولکول‌های rRNA عمدتاً با واحد سودبرگ (S) بیان می‌شوند. واحدهای سودبرگ (S) عبارتند از اندازه‌گیری آهنگ (سرعت) رسوب ماکرومولکول‌های سانتریفیوژ شده تحت شرایط استاندارد که اساساً نوعی تخمین اندازه می‌باشد. زیر واحد کوچک ریبوزوم حاوی یک مولکول rRNA منفرد می‌باشد که rRNA کوچک نامیده می‌شود. زیر واحد بزرگ حاوی یک مولکول rRNA بزرگ و یک مولکول ۵rRNA S به علاوه یک ۵/۸SrRNA در مهره‌داران می‌باشد. طول مولکول‌های rRNA، مقدار پروتئین‌ها در هر زیر واحد و در نتیجه اندازه زیر واحدها بین سلول‌های یوکاریوتی و باکتریایی متفاوت می‌باشد. ریبوزوم‌های فراهم آمده [یعنی در حالت اتصال زیر واحد بزرگ و کوچک] در باکتری‌ها ۷۰S و در مهره‌داران ۸۰S می‌باشند.

در حال حاضر توالی‌های rRNAهای کوچک و بزرگ در مورد چندین هزار ارگانیسم شناخته شده است. اگرچه توالی نوکلئوتیدی اولیه این rRNAها بسیار قابل توجه هست، اما بخش‌های یکسان از هر نوع rRNAها به صورت تئوری می‌تواند ساقه حلقه‌های جفت بازی تشکیل دهد که ایجادکننده یک ساختار سه بعدی مشابه برای هر rRNA در تمام ارگانیسم‌ها خواهد بود. ساختار سه بعدی واقعی rRNAهای باکتری E.coli اخیراً از طریق کریستالوگرافی اشعه X ریبوزوم ۷۰S شناسایی شده است (شکل ۲۳ـ۴). چندین پروتئین بسیار کوچک ریبوزومی تا حد زیادی با سطح rRNAها اتصال برقرار می‌کنند. اگرچه تعداد مولکول‌های پروتئینی در ریبوزوم‌ها بسیار بیشتر از تعداد مولکول‌های RNA می‌باشند، با این حال RNA حدوداً ۶۰ درصد جرم یک ریبوزوم را به خود اختصاص می‌دهد. در سطح مشترک یا به اصطلاح سطح تماس زیر واحدهای بزرگ و کوچک ریبوزومی، سه دُمین موضعی ایجاد می‌شود که به نام‌های جایگاه A، جایگاه P و جایگاه E شناخته می‌شوند. همان‌طور که خواهیم دید این‌ها عمده‌ترین یا اصلی‌ترین جایگاه‌های میانکنش آمینواسیل ـ tRNA و mRNA در ریبوزوم در زمان انجام فرایند سنتز پروتئین می‌باشند.

در طول فرایند ترجمه، یک ریبوزوم در طول یک زنجیره mRNA حرکت کرده و با چندین فاکتور پروتئینی و tRNAها میانکنش داده و تحت تغییرات شدید کنفورماسیونی قرار می‌گیرد. علی‌رغم پیچیدگی ریبوزوم، پیشرفت‌های خوبی در مسیر شناسایی ساختار کلی ریبوزوم‌های باکتریایی و تعیین جایگاه‌های مختلف واکنش‌پذیر صورت گرفته است. مثلاً مطالعات کریستالوگرافی اشعه X بر روی ریبوزوم ۷۰S، ترموفیلوس، نه تنها ابعاد و شکل کلی زیر واحدهای ریبوزومی را بیان می‌کند بلکه موقعیت tRNAهای متصل

1- Titin

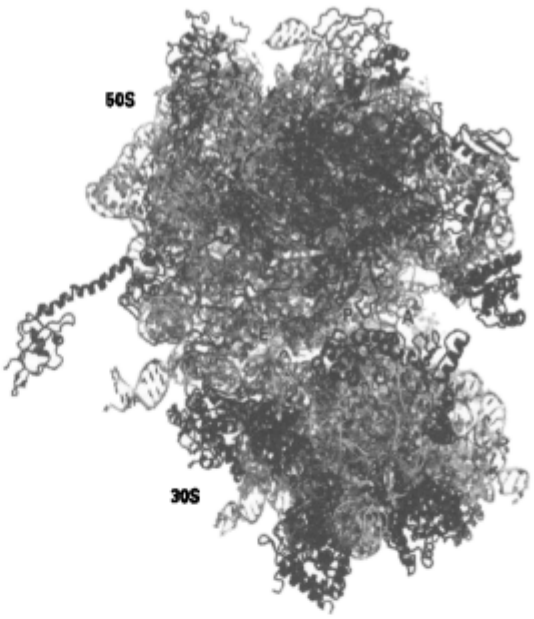


▲ **شکل ۲۲-۴: (شکل رنگی) اجزاء ریبوزوم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی.** در تمام سلول‌ها هر ریبوزوم حاوی یک زیر واحد بزرگ و یک زیر واحد کوچک می‌باشد. دو زیر واحد دارای rRNAها (قرمز رنگ) با طول‌های متفاوت و سری‌های متفاوت از پروتئین‌ها هستند. تمام ریبوزوم‌ها حاوی دو مولکول rRNA عمده هستند. (۱۶S rRNA و ۲۳S) در باکتری‌ها و ۱۸ S rRNA و ۲۳S و یک ۵S rRNA مهره‌داران می‌باشند. زیر واحد بزرگ ریبوزوم مهره‌داران همچنین حاوی یک ۵/۸ S rRNA می‌باشد که با ۲۸S rRNA جفت باز تشکیل می‌دهد. تعداد ریبونوکلئوتیدها (rNTs) در هر نوع rRNA نشان داده شده است.

به ریبوزوم در طول طویل شدن یک زنجیره پروتئینی در حال رشد را هم مشخص می‌کند. علاوه بر این تکنیک‌های شیمیایی قدرتمندی هم‌چون ردّ پایابی که در فصل ۷ توضیح داده شده است برای تعیین توالی‌های خاص نوکلئوتیدی در rRNAهایی که به پروتئین‌ها یا RNAهای دیگر وصل می‌شوند به کار می‌رود. ۴۰ سال بعد از کشف و شناسایی ریبوزوم‌ها، ساختار کلی آنها و عملکردشان در طول سنتز پروتئین در نهایت آشکار شد.

متیونیل ـ $tRNA_i^{Met}$ (Methionyl-$tRNA_i^{Met}$) کدون آغاز (AUG) را شناسایی می‌کند

همان‌طور که قبلاً بیان شد رمز AUG برای متیونین در رده گسترده‌ای از mRNAها به عنوان کدون آغاز عمل می‌کند. یک جنبه بسیار حیاتی آغاز ترجمه، شروع سنتز پروتئین در کدون آغازین می‌باشد که از طریق آن قالب خواندن صحیح، برای کل mRNA پایه‌گذاری می‌شود. هم پروکاریوت‌ها و هم یوکاریوت‌ها حاوی متیونین tRNAهای متفاوت هستند: $tRNA_i^{Met}$ می‌تواند سنتز پروتئین را شروع کند و $tRNA^{Met}$ تنها می‌تواند متیونین را به زنجیره پروتئینی در حال رشد اضافه کند. آمینواسیل ـ tRNA سنتتازهای یکسانی (MetRS)، tRNAها را با متیونین باردار می‌کنند (یعنی اتصال برقرار می‌کنند). با وجود این، تنها $Met\text{-}tRNA_i^{Met}$ (یعنی متیونین فعال شده متصل به $tRNA_i^{Met}$) می‌تواند به جایگاه مناسبی از زیر واحد کوچک ریبوزوم یعنی جایگاه P متصل شده و سنتز پروتئین را آغاز کند. $Met\text{-}tRNA^{Met}$ معمولی و سایر tRNAهای دارای اسید آمینه به جایگاه بعدی ریبوزوم یعنی جایگاه A که بعداً توضیح داده می‌شود وصل گردند. همان‌طور که قبلاً بیان شد در باکتری‌ها، متیونین آغازی دارای یک گروه فرمیل متصل شده به گروه آمینوی خود می‌باشد که باعث تشکیل N ـ فرمیل متیونین می‌شود.



▲ **شکل ۲۳ـ۴: (شکل رنگی) ساختار ریبوزوم ۷۰S مربوط به E.coli شناسایی شده توسط کریستالوگرافی اشعه X.** مدل ریبوزوم نشان داده شده از طرف سطح مشترک بین زیر واحدهای بزرگ (۵۰S) و کوچک (۳۰S. S rRNA)۱۶ و پروتئین‌ها در زیر واحد کوچک به ترتیب با رنگ سبز روشن و بنفش تیره و ۵S rRNA با رنگ آبی تیره نشان داده شده است. جایگاه‌های A، P و E ریبوزومی نشان داده شده است. شایان ذکر است که پروتئین‌های ریبوزومی در سطح ریبوزوم و rRNAها در درون جای می‌گیرند و به ترتیب جایگاه‌های A و P و E را ایجاد می‌کنند.

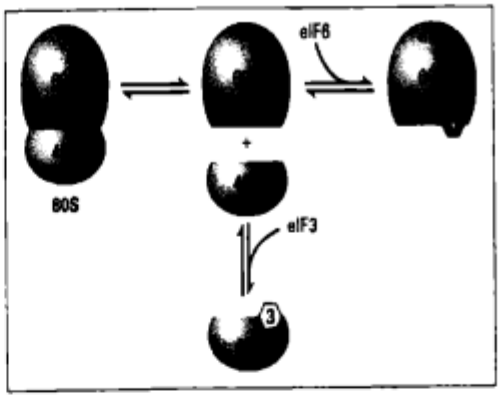
شروع ترجمه معمولاً از اولین AUG از طرف انتهای ۵′ mRNA آغاز می‌شود

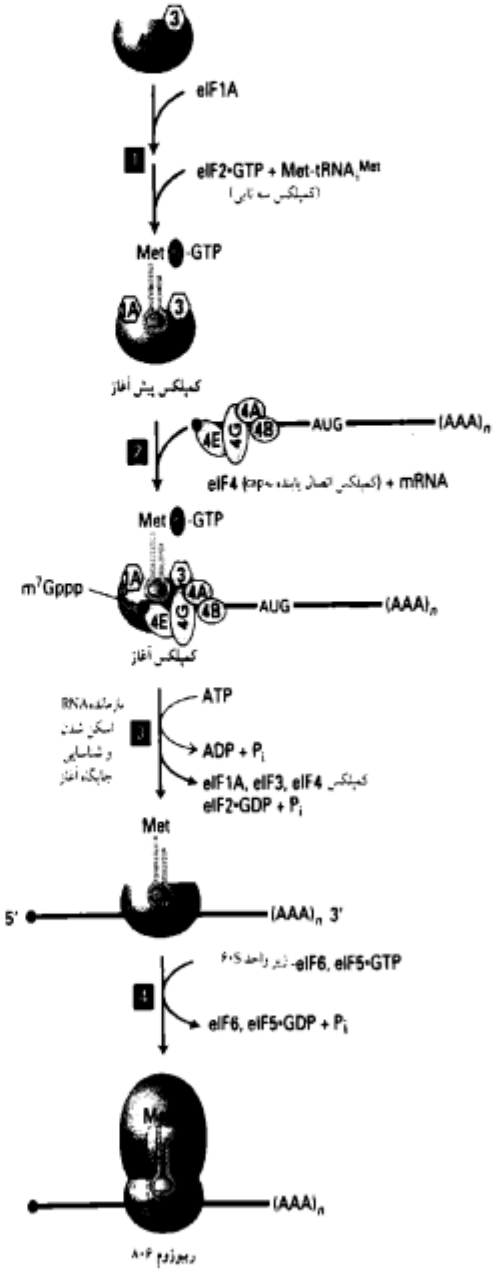
در طول اولین مرحله ترجمه، زیر واحدهای کوچک و بزرگ ریبوزوم به دور یک mRNAای که دارای یک tRNA آمینواسیله شده اتصال یافته به کدون آغاز هست، تجمع می‌یابند. این فرایند با واسطه یک سری پروتئین‌های ویژه که عوامل آغاز ترجمه[1] (IFs) نامیده می‌شوند و به مجموعه وصل گردند ادامه می‌یابد. یک یا چند فاکتور آغازین اختصاصی وجود دارد که شرایط اتصال را فراهم می‌کنند. میانکنش بین این عوامل آغازین به پایداری سیستم کمک می‌کند. علاوه بر این برخی از این عوامل آغازین با GTP جفت می‌شوند و هیدرولیز GTP به GDP به عنوان یک نقطه کنترل عمل می‌کند که در صورتی به پیشروی یک مرحله اجازه می‌دهد که مرحله قبلی به درستی انجام گرفته باشد.

زیر واحدهای ریبوزومی بزرگ و کوچک که در فرایند ترجمه فعال نیستند یعنی وارد این فرایند نشده‌اند با اتصال به دو فاکتور آغازین به صورت جدا از هم نگه داشته می‌شوند. در یوکاریوت‌ها eIF3 به زیر واحد کوچک ۴۰S و eIF6 به زیر واحد بزرگ ۶۰S متصل می‌شوند. هر دوی این فاکتورها در مرحله بعدی آغازین نیز عمل کرده و باعث تجمع دو زیر واحد ریبوزومی می‌شوند که این کار بلافاصله بعد از این‌که زیر واحد کوچک به همراه یک tRNA بارگیری شده آغازگر ($Met\text{-}tRNA_i^{Met}$) به یک کدون آغازین در یک mRNA وصل شد اتفاق می‌افتد. مرحله نخست از آغاز ترجمه عبارتست از تشکیل یک کمپلکس پیش آغازین. کمپلکس پیش آغاز زمانی شکل می‌گیرد که زیر واحد ۴۰S با کمپلکس چند زیر واحدی eIF3 مجتمع شده با eIFIA و یک مجموعه سه تایی شامل $Met\text{-}tRNA_i^{Met}$ و eIF2 متصل به GTP کمپلکس ایجاد می‌کند (شکل ۲۴ـ۴ مرحله ❶). فاکتور آغاز eIF2 بین دو حالت اتصال به GTP و GDP جایگزین می‌شود. این فاکتور تنها زمانی می‌تواند به $Met\text{-}tRNA_i^{Met}$ وصل شود که با GTP همراه باشد. سلول‌ها با فسفریلاسیون یک ریشه سرین روی eIF2 متصل به GDP می‌توانند سنتز پروتئین را تنظیم کنند. کمپلکس فسفریله شده قادر به تبادل GDP متصل شده با GTP نبوده و بنابراین نمی‌تواند به $Met\text{-}tRNA_i^{Met}$ وصل شود و در نتیجه سنتز پروتئین مهار می‌شود.

کلاهک ′۵ یک mRNA که قرار است ترجمه شود توسط کمپلکس اتصالی کلاهک به eIF4 متصل می‌شود. کمپلکس اتصال‌کنندهٔ کلاهک به eIF4 واجد چندین زیرواحد با عملکردهای متفاوت هست. زیرواحد eIF4E مربوط به کمپلکس eIF4 به ساختار کلاهک ′۵ در mRNAها وصل می‌شود (شکل ۱۴ـ۴). سپس کمپلکس mRNA-eIF4 از طریق میانکنش زیر واحد eIF4G مربوط به کمپلکس eIF4 با eIF3 در کمپلکس پیش آغازین، کمپلکس آغازین را تشکیل می‌دهد (شکل ۲۴ـ۴، مرحله ❷). زیر واحد eIF4B مربوط به eIF4 دارای یک نقش ساختمانی می‌باشد یعنی جایگیری زیر واحد RNA هلیکازی eIF4A تا این‌که این زیر واحد بتواند مناطق کوتاه واجد ساختار دوم RNA را در RNA اتصال یافته با استفاده از انرژی هیدرولیز ATP رفع نماید. سپس کمپلکس آغاز چند جزئی احتمالاً در طول mRNA اتصال یافته سُر می‌خورد و یا به اصطلاح آن را اسکن می‌کند. به این صورت که فعالیت هلیکازی eIF4A باعث باز شدن ساختارهای دوم RNA می‌شود که ممکن است این ساختارهای دوم با پدیده اسکن شدن در طول

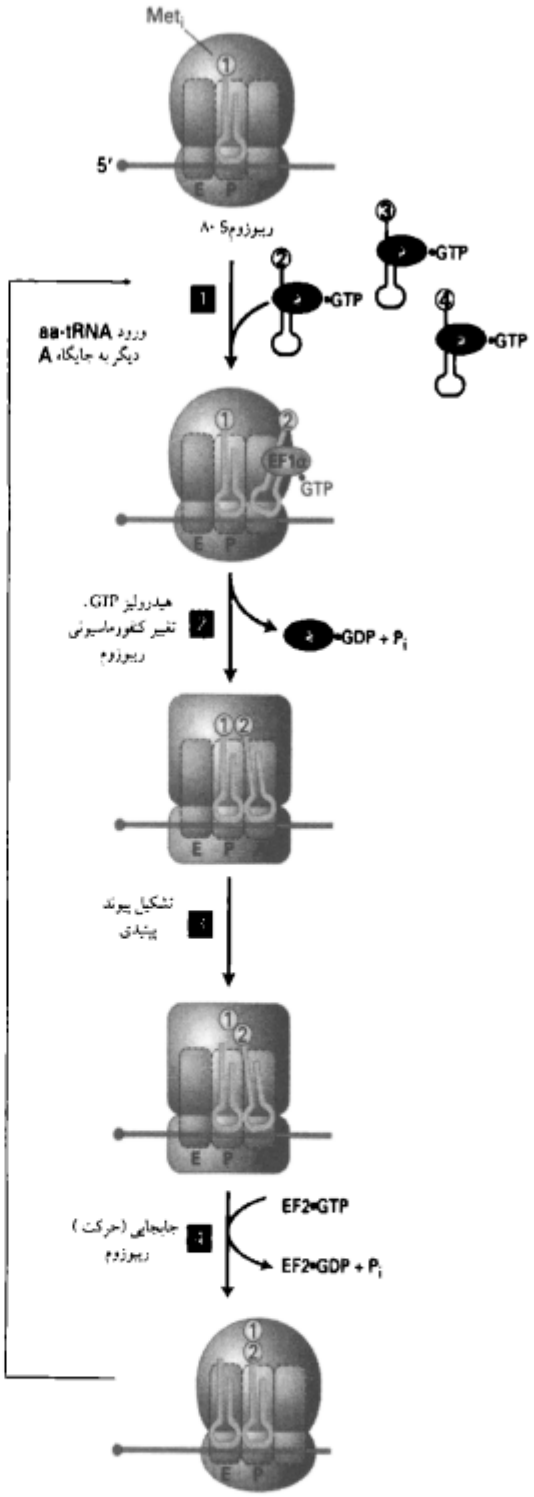
1- Translation initiation factors





▶ **شکل ۲۴-۴: آغاز ترجمه در یوکاریوت‌ها.** داخل کادر: زمانی که زیر واحدهای یک ریبوزوم در انتهای ترجمه از هم جدا می‌شوند. زیر واحدهای ۴۰S و ۶۰S به ترتیب به عوامل آغاز eIF3 و eIF6 اتصال یافته و کمپلکس‌هایی را ایجاد می‌کنند که می‌توانند دور دیگری از ترجمه را آغاز کنند مرحله ❶ و ❷: اتصال متوالی اجزاء نشان داده شده به کمپلکس زیر واحد eIF3 ـ ۴۰S باعث تشکیل کمپلکس آغاز (initiation complex) می‌شود. مرحله ❸: اسکن کردن mRNA توسط کمپلکس آغاز باعث جایگیری زیر واحد کوچک و Met-tRNA$_i^{Met}$ اتصالی در کدون آغاز می‌شود. مرحله ❹: اجتماع زیر واحد بزرگ (۶۰S) باعث ایجاد ریبوزوم ۸۰S می‌شود که آماده ترجمه mRNA می‌باشد. دو فاکتور آغاز eIF2 (مرحله ❶) و eIF5 (مرحله ❹) پروتئین‌های اتصال یافته به GTP هستند که این GTP اتصالی در طی فرایند آغاز ترجمه هیدرولیز می‌شود. زمان دقیقی که عوامل ویژه آغاز رها می‌شوند هنوز تعیین نشده است. برای پی بردن به جزئیات به متن مراجعه کنید.

mRNA در جهت ۳'، مخالف کنند. اسکن کردن زمانی که آنتی‌کدون tRNA$_i^{Met}$، کدون آغاز را شناسایی کرد، متوقف می‌شود که این رمز آغاز (کدون آغاز) در واقع اولین AUG موجود در فرودست انتهای ۵' [بیشتر mRNAهای یوکاریوتی] می‌باشد. (مرحله ❸). شناسایی کدون آغاز باعث هیدرولیز GTP همراه eIF2 می‌شود که یک فرایند برگشت‌ناپذیر بوده و از اسکن شدن بیشتر، ممانعت می‌کند. انتخاب AUG آغازی از طریق نوکلئوتیدهای خاص احاطه‌کننده آن که توالی کوزاک[1] نامیده می‌شود، تسهیل می‌شود. نام این توالی به خاطر ماریلین کوزاک می‌باشد که این توالی را (۵')ACC ' AUG G(۳')) معرفی کرد. نوکلئوتید A که قبل از AUG وجود دارد و نیز گوانین (G) که بلافاصله بعد از رمز آغاز واقع شده است نوکلئوتیدهای بسیار مؤثر در راندمان شروع ترجمه می‌باشند. همین که زیر واحد کوچک ریبوزوم با Met-tRNA$_i^{Met}$ متصل به آن به درستی در محل کدون آغاز جایگیری کرد و GTP اتصال یافته از طریق eIF2 به صورت GDP هیدرولیز شد، عوامل eIF1 و 2 و 3 و 4 جدا شده و زیر واحد کوچک طی واکنشی که توسط 5 و eIF6 کاتالیز می‌شود با زیر واحد بزرگ (۶۰S) ریبوزومی اتصال برقرار می‌کند که نتیجه آن ایجاد یک ریبوزوم کامل ۸۰S می‌باشد. با



شکل ۲۵-۴: طویل شدن زنجیره پپتیدیل در یوکاریوت‌ها. همین که ریبوزوم ۸۰S با Met-tRNA$_i^{Met}$ در جایگاه P ریبوزوم تجمع یافتند (بالا)، یک کمپلکس سه تایی آورندهٔ اسید آمینه دوم (aa_2) رمزدهی شده با mRNA به جایگاه A وصل می‌شود (مرحله ❶). این فرایند با یک تغییر کنفورماسیونی در ریبوزوم القاء شده با هیدرولیز GTP در EF1α.GTP ادامه پیدا می‌کند (مرحله ❷). rRNA بزرگ تشکیل پیوند پپتیدی بین Met و aa_2 را کاتالیز می‌کند (مرحله ❸). هیدرولیز GTP در EF2.GTP باعث تغییر ساختمان فضایی دیگری در ریبوزوم می‌شود که نتیجه آن حرکت ریبوزوم به اندازه یک کدون در طول mRNA و حرکت tRNA$_i^{Met}$ بدون اسیله نشده (unacylated tRNA$_i^{Met}$) به جایگاه E و حرکت tRNA با پپتید متصل به آن به جایگاه P می‌باشد (مرحله ❹). چرخه می‌تواند دوباره با اتصال یک کمپلکس سه تایی آورندهٔ aa_3 به جایگاه A که الآن باز است آغاز گردد. در چرخه‌های دوم و بعدی طویل‌سازی، tRNA طی مرحله ❷ در نتیجه تغییر کنفورماسیونی القا شده توسط هیدرولیز GTP در EF1α.GTP از جایگاه E خارج می‌شود.

تجمع کامل کمپلکس، Met-tRNA$_i^{Met}$ متصل به کدون AUG در جایگاه P قرار می‌گیرد. به کار گرفتن زیر واحد بزرگ ریبوزومی با هیدرولیز یک GTP اتصال یافته با eIF5 همراه می‌شود که در واقع مرحله دیگری از غلط گیری می‌باشد. (مرحله ❹). جفت شدن اتصال زیر واحدهای ریبوزومی با هیدرولیز GTP این امکان را برای فرایند آغازین فراهم می‌کند که تنها زمانی این فرایند ادامه یابد که میانکنش زیر واحدها به درستی انجام گرفته باشد. این شرایط همچنین این مرحله را به یک فرایند برگشت‌ناپذیر تبدیل می‌کند لذا تا زمانی که کل mRNA ترجمه نشده و سنتز پروتئین خاتمه نیافته است، زیر واحدهای ریبوزومی از هم جدا نمی‌شوند.

ماشین سنتز پروتئین در یوکاریوت‌ها، ترجمه بیشتر mRNAهای سلولی را در بین حدود ۱۰۰ نوکلئوتیدی از انتهای ′۵ دارای کلاهک آغاز می‌کند. با وجود این، برخی mRNAهای سلولی واجد یک جایگاه ورود داخلی برای ریبوزوم[1] (IRES) هستند که در فاصله‌ای دور از فرودست انتهای ′۵ قرار گرفته است. علاوه بر این، ترجمه برخی mRNAهای ویروسی که فاقد کلاهک ′۵ هستند از جایگاه توالی IRES توسط ماشین سلول یوکاریوتی میزبان که توسط ویروس آلوده شده است، آغاز می‌شوند. برخی عوامل آغاز ترجمه مشابه که در اسکن کردن ریبوزوم از انتهای ′۵ شرکت دارند برای جایگیری یا شناسایی یک کدون آغاز داخلی AUG هم مورد نیاز هستند، ولی در واقع اینکه چگونه یک توالی IRES شناسایی می‌شود هنوز زیاد روشن نیست. نتایج اخیر نشان می‌دهد که برخی از توالی‌های IRES در قالب یک ساختار RNAای طوری تا می‌خورد که به جایگاه E در ریبوزوم وصل شود (پایین را ملاحظه کنید). نتیجه این عمل جایگیری یک AUG آغاز داخلی نزدیک در جایگاه P می‌باشد.

1- Internal ribosome entry site

در باکتری‌ها، اتصال زیر واحد کوچک به جایگاه شروع توسط مکانیسم‌های متفاوتی انجام می‌گیرد که باعث آغاز از یک جایگاه درونی در mRNAهای پلی‌سیسترونی نسخه‌برداری شده از اپرون‌ها می‌شود. در mRNAهای باکتریایی یک توالی حدوداً شش بازی با انتهای ′۳ rRNA کوچک، حالت مکملی دارد که این قسمت ۷-۴ نوکلئوتیدی قبل از AUG قرار گرفته است. جفت شدن بازها بین این توالی در mRNA (که بعد از کشف آن به نام کاشف آن، توالی شاین دالگارنو[1] نامیده می‌شود) و rRNA کوچک باعث جایگیری زیر واحد کوچک ریبوزوم در جایگاه صحیح و مناسب برای شروع ترجمه می‌شود. سپس $f\text{-Met-tRNA}_i^{Met}$ و عوامل آغاز قابل قیاس با eIF1A و eIF2 و eIF3 با زیر واحد کوچک تجمع یافته و اتصال زیر واحد بزرگ ریبوزومی انجام می‌گیرد تا اینکه ریبوزوم کامل باکتریایی با مکانیسمی شبیه یوکاریوت‌ها ایجاد شود.

در طول افزایش زنجیره، هر آمینواسیل ـ tRNA وارده از سه جایگاه ریبوزومی عبور می‌کند

حال کمپلکسی که در آن جایگیری ریبوزوم ـ Met-tRNA_i^{Met} به درستی انجام گرفته است، آماده است تا کار افزودن یک به یک اسیدهای آمینه را از طریق ترجمه در قالب mRNA انجام دهد. همانند مرحله آغاز، در این مرحله هم یک سری پروتئین‌های خاص که عوامل طویل‌سازی[2] (EF) نامیده می‌شوند مورد نیاز هست تا فرایند طویل شدن زنجیره به انجام برسد. مراحل کلیدی در طویل‌سازی عبارتند از ورود آمینواسیل ـ tRNA با یک آنتی کدون مکمل باکدون بعدی، تشکیل پیوند پپتیدی و حرکت یا جابجایی ریبوزوم در هر بار به اندازه یک کدون در طول mRNA.

همان‌طور که بیان شد با تکمیل فرآیند آغاز ترجمه، Met-tRNA_i^{Met} به جایگاه P ریبوزوم کامل ۸۰S متصل می‌شود (شکل ۲۵-۴، بالا). این منطقه از ریبوزوم به این دلیل جایگاه P نامیده می‌شود که tRNA به صورت شیمیایی به زنجیره پلی‌پپتیدی (Polypeptide) منطقه در حال رشد که در اینجا قرار گرفته وصل می‌شود، آمینواسیل ـ tRNA دوم در قالب یک کمپلکس سه تایی دارای EF1α.GTP آمده و به جایگاه A وصل می‌شود. دلیل نامگذاری جایگاه A به خاطر این است که tRNAهای آمینواسیله شده به آنجا متصل می‌شوند (مرحله ❶). EF1α.GTP متصل به آمینواسیل tRNAهای متنوع به جایگاه A وارد می‌شود ولی مرحله بعدی در ترجمه تنها زمانی پیش می‌رود که آنتی‌کدون tRNA با کدون دوم در منطقه رمزگردان، جفت شود. زمانی که این امر به درستی انجام گرفت، GTP موجود در EF1α.GTP، هیدرولیز می‌شود. هیدرولیز GTP باعث یک تغییر کنفورماسیونی در ریبوزوم می‌شود که نتیجه این تغییر، اتصال محکم آمینواسیل ـ tRNA در جایگاه A و رها شدن کمپلکس EF1α.GDP حاصل می‌باشد (مرحله ❷). این تغییر کنفورماسیونی همچنین باعث جایگیری انتهای ′۳ tRNA آمینواسیله در جایگاه A و در مجاورت نزدیک به انتهای ′۳ مربوط به Met-tRNA_i^{Met} در جایگاه P می‌شود و بنابراین در شرایطی که آنتی‌کدون مربوط به آمینواسیل ـ tRNA تازه وارد، نتواند با آنتی‌کدون موجود در جایگاه A جفت باز تشکیل دهد، اتصال محکم صورت نخواهد گرفت. در این مرحله کمپلکس سه تایی رها شده و جایگاه A برای اتصال کمپلکس‌های دیگر آمینواسیل ـ EF1α.GTP-tRNA تا زمانی که یک tRNA با جفت شدن بازی صحیح وارد بشود خالی می‌ماند. بنابراین هیدرولیز GTP توسط EF1α مرحله دیگری از غلط‌گیری هست که اجازه می‌دهد سنتز پروتئین تنها زمانی پیشروی کند که tRNA آمینواسیله شده صحیحی به جایگاه A وصل شود. این پدیده باعث صحت سنتز پروتئین می‌شود.

با Met-tRNA_i^{Met} آغازی در جایگاه P و آمینواسیل ـ tRNA متصل شده محکم در جایگاه A، گروه آمینوی آلفا (α) آمینواسید دوم با متیونین «فعال شده» در روی tRNA آغازگر واکنش داده (پیوند استری) و یک پیوند پپتیدی حاصل می‌شود (شکل ۲۵-۴، مرحله ❸، همچنین شکل ۱۷-۴). این واکنش پپتیدیل ترانسفرازی توسط rRNA بزرگ کاتالیز می‌شود که به دقت اتم‌های میانکنش‌دهنده را طوری آرایش می‌دهد که باعث پیشرفت واکنش می‌شود. توانایی کاتالیتیکی rRNA بزرگ در باکتری‌ها از طریق برداشت دقیق بخش وسیعی از پروتئین‌ها از زیر واحد بزرگ ریبوزومی به اثبات رسیده است. باکتری‌های تقریباً غنی از rRNA ۲۳S می‌توانند یک واکنش پپتیدیل ترانسفرازی را بین آنالوگ‌های tRNAهای آمینواسیله شده و پپتیدیل ـ tRNA کاتالیز کنند. تأیید بیشتر بر نقش کاتالیتیکی rRNA بزرگ در سنتز پروتئین، از مطالعات کریستالوگرافی حاصل می‌شود که نشان می‌دهد در ساختار کریستالی زیر واحد بزرگ باکتریایی، هیچ پروتئینی در نزدیکی محل سنتز پیوند پپتیدی حضور ندارد.

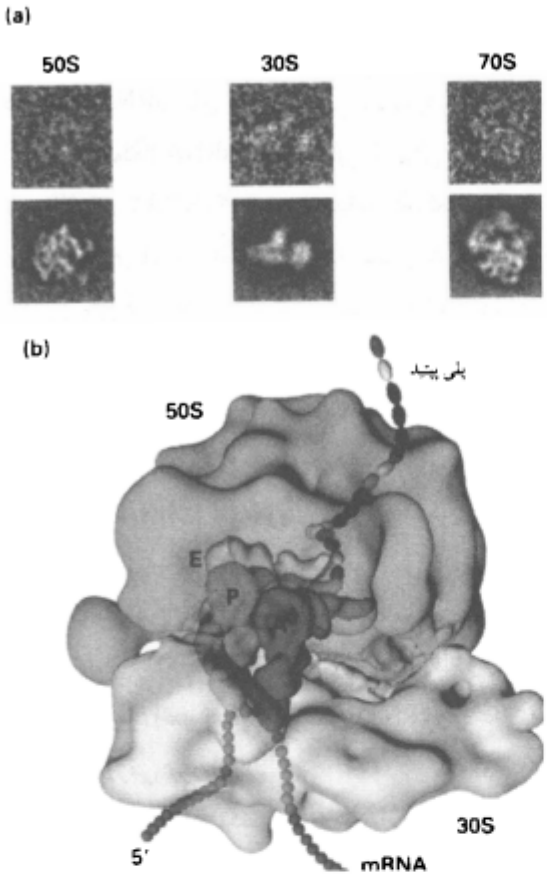
در ادامه سنتز پیوند پپتیدی، ریبوزوم به اندازه یک کدون در طول

1- Shine-Dalgarno 2- Elongation Factors

mRNA حرکت می‌کند. این مرحله جابه‌جایی[1] توسط هیدرولیز GTP در EF2-GTP یوکاریوتی کنترل می‌شود. همین که جابه‌جایی به درستی انجام گرفت، GTP اتصال یافته هیدرولیز می‌شود که این فرآیند برگشت‌ناپذیر دیگری است که از حرکت ریبوزوم در طول RNA در جهت اشتباه و یا جابه‌جایی به تعداد نوکلئوتیدهای نادرست جلوگیری می‌کند. در اثر تغییرات کنفورماسیونی در ریبوزومی که به درستی جابه‌جا شده و در نتیجه هیدرولیز GTP توسط EF2 حال $tRNA_i^{Met}$ بدون متیونین به سمت جایگاه E در ریبوزوم حرکت کرده و به‌طور همزمان tRNA دوم متصل به یک دی‌پپتید (یک پپتیدیل ـ tRNA) به طرف جایگاه P حرکت می‌کند (شکل ۲۵ـ۴ مرحله ❹). به این ترتیب، جابه‌جایی ساختمان فضایی ریبوزوم را به حالتی بر می‌گرداند که جایگاه A باز بوده و قادر هست یک کمپلکس tRNA آمینواسیله شده با EF1α.GTP را پذیرفته و چرخه دیگری از طویل شدن زنجیره را آغاز کند.

تکرار چرخهٔ طویل‌شدن در شکل ۲۵ـ۴ نشان داده شده که در آن یک اسیدآمینه به انتهای C پپتید در حال رشد اضافه می‌شود و این اضافه شدن در جهت توالی mRNA صورت می‌گیرد و زمانی که به کدون خاتمه می‌رسد متوقف می‌شود. در این چرخهٔ متوالی، تغییرات کنفورماسیونی که در مرحلهٔ ❷ اتفاق می‌افتد tRNA غیراستیله را از جایگاه E خارج می‌کند. به موازات بزرگ‌ترشدن زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی تازه سنتز شده، این زنجیره وارد کانالی در زیر واحد بزرگ ریبوزوم می‌شود و از جایگاهی که مقابل زیر واحد کوچک است و با آن میانکنش دارد خارج می‌گردد (شکل ۲۶ـ۴).

در عدم حضور ریبوزوم سه جفت باز هیبرید RNA-RNA بین آنتی کدون در tRNA و کدون در mRNA در جایگاه‌های A و P ممکن نیست پایدار باشند. RNA-RNA دوگانه بین دو مولکول RNA جدا، باید به‌طور قابل توجهی بلند باشد تا در شرایط فیزیولوژیک پایدار گردد. با وجود این چندین میانکنش بین rRNA کوچک و بزرگ و همچنین دُمین‌های tRNAs (به عنوان مثال لوپ‌های D و TψCG، شکل ۲۰ـ۴) که tRNAها را در جایگاه‌های A و P پایدار می‌کنند. میانکنش‌های RNA-RNA دیگری در درست قرار گرفتن جفت بازهای کدون ـ آنتی کدون نقش دارند که در مجموع باعث صحیح خواندن رمز ژنتیکی می‌شوند. در نتیجه میانکنش‌های بین rRNAs و دمین‌های موجود در همهٔ tRNAها سبب حرکت و جابه‌جایی tRNAها در جایگاه‌های A و P و E در لحظه‌ایی که ترجمه توسط ریبوزوم در طول mRNAایی که کدون‌های سه نوکلئوتیدی را در خود دارد می‌شود.



▲ **شکل ۲۶ـ۴: (شکل رنگی) مدلی از ریبوزوم E.coli ۷۰S.** (a) شکل‌های بالا تصویرهایی از ریبوزوم E.coli ۷۰S را نشان می‌دهد که به وسیلهٔ میکروسکوپ کریوالکترون گرفته شده است. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌کنید زیر واحدهای ۳۰S و ۵۰S ریبوزوم نشان داده شده است. قاب‌های پایینی نتیجهٔ تصویرهایی است که از یک جهت چندین بار گرفته شده و از معدل و میانگین این تصویرها یک تصویر مناسب به وسیلهٔ کامپیوتر به وجود آمده است. (b) مدل ریبوزوم ۷۰S براساس تصویرهای به وجود آمده از کامپیوتر و مطالعات cross-linking شیمیایی. سه tRNA در جایگاه‌های E (زرد) و P (سبز) و A (صورتی) قرار گرفته‌اند. زنجیرهٔ پلی‌پپتید در حال تولید در یک تونل که در زیر واحد بزرگ ریبوزوم وجود دارد قرار گرفته است. این تونل از نزدیک ساقهٔ پذیرندهٔ tRNA در جایگاه P شروع می‌شود.

ترجمه به وسیلهٔ عوامل آزادکننده، به هنگام رسیدن به کدون خاتمه پایان می‌پذیرد

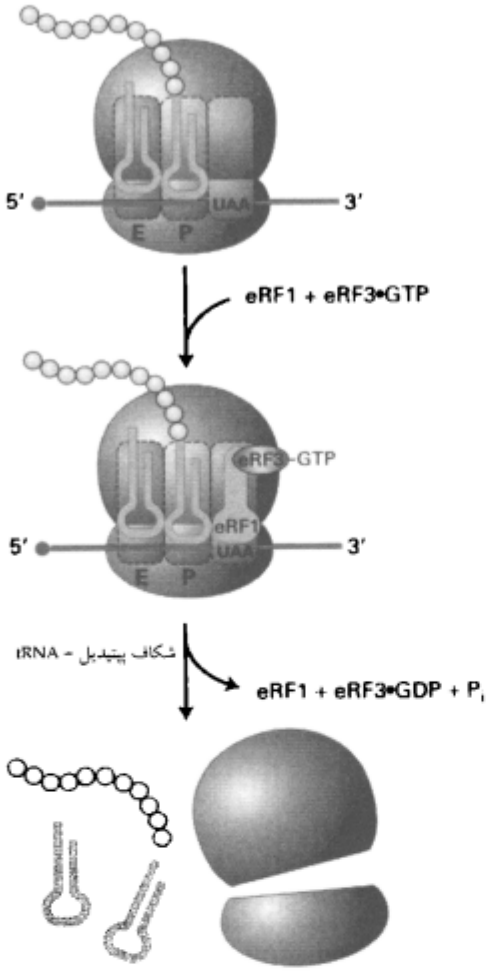
مرحلهٔ پایانی ترجمه، همانند آغاز و طویل‌سازی آن شدیداً نیازمند پیام‌های مولکولی ویژه می‌باشد که سرنوشت و سرانجام

1- Translocation

کمپلکس پپتیدیل tRNA-ریبوزوم -mRNA را تعیین می‌کنند. دو نوع خاص از عوامل آزادکننده (RFs) شناخته شده‌اند. در یوکاریوت‌ها فاکتور eRF1 که شکل آن مشابه tRNAs می‌باشد با اتصال به جایگاه A، مستقیماً کدون‌های پایان را شناسایی می‌کند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد همانند بعضی از عوامل آغازین و طویل‌سازی، فاکتور آزادکنندهٔ یوکاریوتی eRF3 نیز یک پروتئین متصل‌شونده به GTP می‌باشد. eRE3.GTP به همراه پروتئین eRF1 موجب بریدگی در پپتیدیل ـ tRNA می‌شود که سبب آزاد شدن رشتهٔ پروتئین کامل شده می‌گردند (شکل ۲۷ـ۴). باکتری‌ها دارای دو نوع فاکتور آزادکننده می‌باشند. عوامل RF2 و RF1 که از نظر عملکردی مشابه فاکتور eRF_1 بوده و فاکتور متصل‌شونده به GTP (RF3) که مشابه فاکتور eRF3 عمل می‌کند. یک بار دیگر eRF3 GTPase، شناسایی صحیح کدون پایان به وسیلهٔ eRF1 را کنترل می‌کند. پیوند پپتیدیل ـ tRNA در tRNAی که در جایگاه P وجود دارد شکسته نمی‌شود مگر آن که یکی از سه کدون پایانی به وسیلهٔ فاکتور eRF1 به طور صحیح شناخته شود. این خود مثالی دیگر از مراحل اصلاح در سنتز پروتئین می‌باشد.

بعد از آزاد شدن رشتهٔ پروتئین از ریبوزوم، این پروتئین تازه سنتز شده ساختمان فضایی سه بعدی طبیعی را به خود می‌گیرد که این مسیر به وسیله پروتئین‌های دیگری موسوم به چاپرون[1] تسهیل می‌شوند (فصل ۳). عوامل آزادکنندهٔ دیگری موجب جدایی ریبوزوم به صورت زیر واحدهای آزاد، mRNA و tRNA پایانی می‌شوند تا دور بعدی ترجمه را شروع کنند.

در حال حاضر ما می‌توانیم شاهد حضور یک یا تعداد بیشتری از پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP باشیم که در هر مرحله از ترجمه شرکت می‌کنند. این پروتئین‌ها متعلق به سوپر خانواده GTP آزی می‌باشند که پروتئین‌های کلیدی بوده و بین حالت متصل شده‌به GTP یا همان شکل فعال و حالت متصل شده به GDP یا همان شکل غیرفعال در حال گردش می‌باشند (شکل ۳۲ـ۳ را ملاحظه کنید). هیدرولیز پیوند GTP سبب تغییر کنفورماسیونی در خود GTP آز و پروتئین‌های دیگر با آن شده و این عمل برای فرایندهای مولکولی پیچیده بسیار حیاتی می‌باشد. برای مثال در شروع ترجمه به هنگام شناخته شدن جایگاه شروع، هیدرولیز eIF_2.GTP به eIF_2.GDP مانع دسترسی بیشتر mRNA می‌شود و به زیر واحد بزرگ ریبوزومی اجازهٔ اتصال به زیر واحد کوچک داده می‌شود (شکل ۲۴ـ۴، مرحلهٔ ❸). به طور مشابه، هیدرولیز EF_2.GTP به EF_2.GDP در طول مرحلهٔ طویل‌سازی زنجیرهٔ پروتئینی منجر به



▲ **شکل ۲۷ـ۴: پایان ترجمه در یوکاریوت‌ها.** زمانی که یک ریبوزوم در حال تولید رشتهٔ پروتئینی به یک کدون پایان (UAA و UGA و UAG) می‌رسد، فاکتور آزادکنندهٔ eRF1 وارد کمپلکس ریبوزومی می‌شود که این جایگاه در جایگاه A و یا در مجاورت جایگاه A است و به اتفاق فاکتور eRF3.GTP صورت می‌گیرد. با هیدرولیز پیوند GTP، پیوند بین رشتهٔ پروتئینی و tRNA در جایگاه P بریده شده و tRNA از جایگاه P آزاد می‌شود و دو زیر واحد ریبوزومی نیز از همدیگر جدا می‌شوند.

ترجمهٔ صحیح به وسیلهٔ ریبوزوم در طول mRNA می‌شود (شکل ۲۵ـ۴، مرحلهٔ ❹). و همچنین هیدرولیز eRF3.GTP به eRF3.GDP به صحت پایان صحیح ترجمه کمک می‌کند. از آنجایی که هیدرولیز پیوند پر انرژی فسفودی استر β-γ موجود در GTP غیرقابل برگشت می‌باشد، جفت شدن این مراحل در سنتز با هیدرولیز GTP مانع از برگشت این مراحل می‌شود.

نوعی جهش که می‌تواند یک ژن را در هر ارگانیسمی غیرفعال

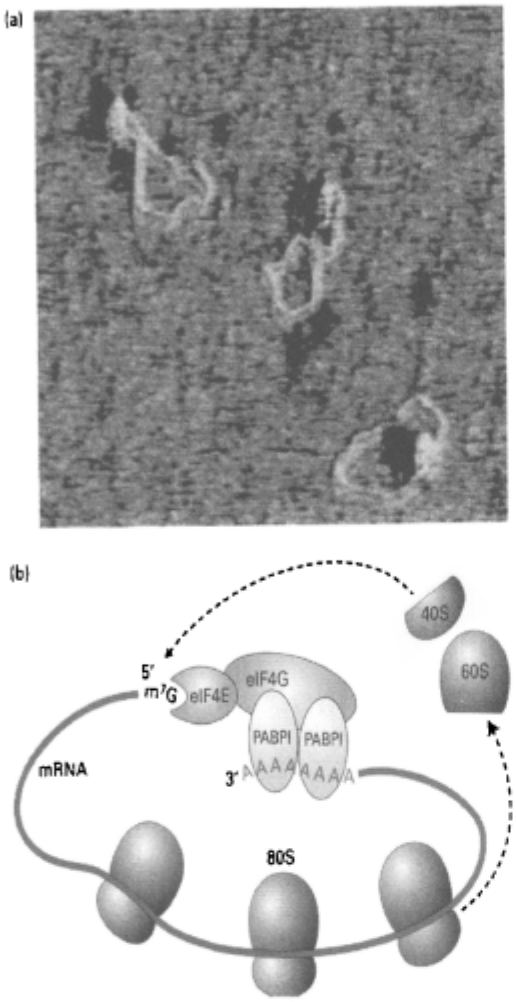
1- Chaperones

کند تغییر در جفت باز می‌باشد. در این تغییر یک کدون که به‌طور معمول یک اسیدآمینه را رمزدهی می‌کرده به کدون پایان تبدیل می‌شود، به عنوان مثال UAC (کدون تیروزین) به UAG (کدون پایان) تبدیل می‌شود. وقتی این عمل در ابتدا و اوایل ترجمه صورت می‌گیرد پروتئین کوتاهی تولید می‌شود که معمولاً هیچ فعالیتی ندارد. چنین جهشی را بی‌معنی[1] می‌نامند چراکه در رمز ژنتیکی هر توالی سه تایی معادل یک اسیدآمینه است و سه توالی کدون پایان اسیدآمینه‌ای را رمزدهی نمی‌کنند.

مطالعات ژنتیکی انجام گرفته بر روی باکتری E.coli نشان می‌دهد که اثر جهش بی‌معنی، می‌تواند با جهش دوم در ژن tRNA مرتفع شود. به این صورت که با تغییر توالی رمزدهی کننده ژن، آنتی کدون tRNA به توالی سه تایی که مکمل کدون پایان اصلی است می‌توان این مشکل را حل کرد. به عنوان مثال جهش در $tRNA^{Tyr}$ که آنتی کدون GUA را به CUA تغییر می‌دهد سبب می‌شود تا با کدون پایان جفت شود. در این حالت tRNA جهش یافته می‌تواند به وسیلهٔ تیروزین آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز شناسایی شده و به تیروزین متصل شود. سلول‌ها هم با جهش بی‌معنی اولیه و هم با جهش بعدی در ژن $tRNA^{Tyr}$ می‌توانند یک تیروزین در جایگاه کدون پایانی که جهش یافته است وارد کنند و با این عمل سبب ادامهٔ سنتز پروتئین بدون روی دادن جهش بی‌معنی شوند. این پروتئین تولید شده می‌تواند به‌طور طبیعی به فعالیت بپردازد.

این مکانیسم از بین بردن اثر جهش، به مقدار زیاد صورت نمی‌گیرد به این ترتیب ترجمه mRNAهای طبیعی که دارای کدون پایانی UAG می‌باشند در بیشتر اوقات در جایگاه مناسب پایان می‌پذیرد. اگر پروتئین به اندازهٔ کافی به وسیله ژن اصلی با جهش بی‌معنی تولید شود و این پروتئین فعالیت لازم را داشته باشد گفته می‌شود که اثر جهش اولی به وسیلهٔ جهش دومی در آنتی کدون ژن tRNA سرکوب شده است.

این مکانیسم سرکوب جهش بی‌معنی یک ابزار قوی در مطالعات ژنتیک باکتری می‌باشد. به عنوان مثال ویروس‌های باکتریایی جهش یافته چون نمی‌توانند در سلول‌های طبیعی رشد کنند می‌توان آنها را جدا کرد اما این ویروس‌های جهش یافته می‌توانند در سلول‌های بیان‌کنندهٔ tRNA سرکوب‌کنندهٔ جهش بی‌معنی رشد کنند چرا که این ویروس‌ها دارای جهش بی‌معنی در یک ژن ضروری خود می‌باشند. چنین ویروس‌هایی که در سلول‌های سرکوب‌کنندهٔ جهش بی‌معنی رشد یافته‌اند می‌توانند به صورت تجربی برای بررسی عملکرد ژن جهش یافته استفاده شوند. به این



▲ **شکل تجربی ۲۸ـ۴: ساختار حلقه‌ای mRNA بازدهٔ ترجمه را افزایش می‌دهد.** ساختار حلقوی mRNA یوکاریوتی مستلزم میانکنش سه پروتئین می‌باشد. (a) در حضور پروتئین متصل‌شونده به پلی (A) I (PABPI)، eIF4E و eIF4G، mRNA ساختار حلقوی به خود می‌گیرد که در تصویر میکروگراف اتمی قابل مشاهده است. در این ساختار میانکنش‌های پروتئین ـ پروتئین و پروتئین ـ mRNA، پلی را بین انتهای ′۳ و ′۵ mRNA ایجاد می‌کند. (b) مدلی از سنتز پروتئین به وسیلهٔ پلی‌زوم‌های چرخه‌ای و برگشت دوبارهٔ زیر واحدهای ریبوزوم به داخل چرخهٔ ترجمه. چندین ریبوزوم می‌توانند به‌طور همزمان یک mRNA یوکاریوتی را ترجمه کنند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید دو انتهای ′۵ و ′۳ به واسطهٔ میانکنش پروتئین‌ها پایدار شده است. وقتی یک ریبوزوم ترجمه را کامل کرد از انتهای ′۳ جدا می‌شود. که این زیر واحدهای جدا شده سریعاً کلاهک ′۵ (m^7G) را پیدا کرده و سنتز دوباره را از سر می‌گیرند.

1- Nonsense

صورت که می‌توان آنها را وارد سلول‌های طبیعی نمود که جهش را سرکوب نمی‌کنند. در نتیجه می‌توان بررسی کرد که چه مرحله‌ای از چرخه حیات ویروس در اثر عدم حضور پروتئین جهش یافته دچار نقص شده است.

پلی‌زوم‌ها و برگشت سریع ریبوزوم به چرخهٔ ترجمه، کارایی ترجمه را بالا می‌برد

ترجمهٔ تنها یک مولکول mRNA یوکاریوتی که یک پروتئین با اندازهٔ معمول تولید می‌کند حدود یک یا دو دقیقه طول می‌کشد. دو پدیده شدیداً سرعت کلی سنتز را در سلول افزایش می‌دهد: ۱ـ ترجمه همزمان یک مولکول mRNA با چندین ریبوزوم. ۲ـ برگشت سریع زیر واحدهای ریبوزومی به چرخه ترجمه بعد از جدا شدن از انتهای ′۳ mRNA. ترجمه همزمان یک mRNA به وسیلهٔ چندین ریبوزوم به آسانی بامیکروگراف الکترونی و بررسی‌های رسوب‌دهی قابل مشاهده است. این تصاویر mRNA اتصال یافته به ریبوزوم‌هایی را نشان می‌دهد که رشته‌های پلی‌پپتیدی در حال رشد را حمل می‌کنند. این ساختارها که پلی‌ریبوزوم‌ها یا پلی‌زوم‌ها نامیده می‌شوند در میکروگرافهای الکترونی برخی از بافت‌ها به صورت حلقوی دیده می‌شوند. مطالعات بعدی بر روی سلول‌های مخمری، شکل حلقوی پلی‌ریبوزوم‌ها را توضیح داده و مکانیسمی را پیشنهاد می‌کند که از طریق آن پلی‌ریبوزوم‌ها بطور مؤثری به چرخه (سنتز پروتئین) باز می‌گردند. این مطالعات نشان دادند که چندین کپی از پروتئین سیتوزولی در تمام سلول‌های یوکاریوتی یافت شده است. پروتئین I متصل‌شونده به پلی (A) (PABPI) می‌تواند هم به دم‌پلی (A) یک mRNA و هم به زیر واحد 4G از فاکتور eIF4 مخمر متصل شود. به خاطر داشته باشید که زیر واحد 4E از فاکتور eIF4 مخمر به انتهای ′۵ mRNA متصل می‌شود. در اثر این میانکنش، دو انتهای یک مولکول mRNA به وسیلهٔ پروتئین‌های حد واسط به یکدیگر متصل شده و mRNA حلقوی را به وجود می‌آورند (شکل a ۲۸ـ۴). چون دو انتهای پلی‌زوم نسبتاً نزدیک یکدیگرند، زیر واحدهای ریبوزومی که از انتهای ′۳ جدا شده‌اند در مجاورت انتهای ′۵ قرار می‌گیرند. در این روش، شروع دوباره ترجمه به وسیلهٔ میانکنش زیر واحد ۴۰S با eIF4 متصل شده به کلاهک ′۵ تسهیل می‌شود. مسیر چرخشی که در شکل b ۲۸ـ۴ به تصویر کشیده شده است احتمالاً در خیلی از سلول‌های یوکاریوتی اتفاق می‌افتد. این روش، بازگشت ریبوزوم به چرخه را افزایش داده و در نتیجه بازدهٔ سنتز پروتئین را بالا می‌برد.

نکات کلیدی بخش ۴-۴

سنتز مرحله به مرحلهٔ پروتئین‌ها بر روی ریبوزوم‌ها

- ریبوزوم‌های پروکاریوتی یوکاریوتی (کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئینی بزرگ که ترجمه بر روی آنها روی می‌دهد) حاوی زیرواحدهای بزرگ و کوچک هستند (شکل ۲۲-۴ را ملاحظه کنید). هر زیرواحد حاوی پروتئین‌های مختلف متعدد و یک مولکول مهم rRNA (بزرگ و کوچک) است. زیرواحد بزرگ همچنین حاوی یک 5S rRNA اضافی در باکتری‌ها و دو rRNA اضافی دیگر در یوکاریوت‌هاست (5S و 5/8S در مهره‌داران)
- rRNAهای مشابه از بسیاری از گونه‌های مختلف در یک ساختار سه‌بعدی مشابهی که حاوی ساقه - حلقه‌های زیاد و محلهای اتصال به پروتئین‌ها، mRNA و tRNAهاست چین می‌خورند. بسیاری از پروتئین‌های کوچک ریبوزومی همراه با rRNAهای محیطی وجود دارند.
- دو tRNA مربوط به متیونین در تمامی سلول‌ها یافت می‌شود ولی فقط یکی از آنها ($tRNA^{Met}$) در شروع ترجمه نقش دارد.
- هر مرحله از ترجمه (شروع، طویل‌شدن زنجیره و پایان) به عوامل پروتئینی ویژه شامل پروتئین‌های متصل شونده به GTP نیاز دارند که پیوند GTP متصل را به هنگام موفقیت کامل هر مرحله به GDP هیدرولیز می‌کنند.
- به هنگام شروع، زیرواحدهای ریبوزومی در نزدیک محل شروع ترجمه در مولکول mRNA با tRNA حاوی متیونین انتهای آمین ($Met\text{-}tRNA^{Met}$) همایش پیدا کرده و با کدون شروع جفت باز تشکیل می‌دهند (شکل ۲۴-۴).
- طویل‌شدن زنجیره شامل چهار مرحله تکراری است. (۱) اتصال آمینواسیل - tRNA به جایگاه A بر روی ریبوزوم، (۲) اتصال محکم آمینواسیل - tRNA به محل شروع A با آزادی tRNA مورد استفاده قبلی از جایگاه E تقویت می‌شود (۳) و در نتیجه انتقال زنجیرهٔ در حال رشد پپتیدی به اسید آمینه تازه آمده توسط زیرواحد بزرگ ریبوزوم کاتالیز شده و (۴) انتقال ریبوزوم به کدون بعدی باعث حرکت پپتیدیل - tRNA در جایگاه A به جایگاه P و حرکت tRNA غیراسیله در جایگاه P به جایگاه E می‌گردد (شکل ۲۵-۴ را ملاحظه کنید).
- در هر چرخه از مرحله طویل‌سازی، ریبوزوم متحمل دو تغییر شکل فضایی می‌شود که با پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP

کنترل می‌شود. اولی (شامل EF1α) باعث اتصال محکم آمینواسیل - tRNA ورودی به جایگاه A و بیرون راندن tRNA از جایگاه و دومی (شامل EF2) باعث عمل جابجایی می‌شود.

- خاتمه ترجمه توسط دوسری از عوامل خاتمه صورت می‌گیرد اینها کدون‌های خاتمه را شناسایی کرده و هیدرولیز پپتیدیل - tRNA (شکل ۲۷-۴ را ملاحظه کنید) را باعث می‌شوند. باز دوباره، تشخیص صحیح کدون انتهایی توسط GTPase(eRF3) کنترل می‌شود.
- کارایی سنتز پروتئین توسط ترجمه یک mRNA بوسیله چندین ریبوزوم افزایش می‌یابد که پلی‌ریبوزوم یا پلی‌زوم تشکیل می‌دهند. در سلول‌های یوکاریوتی، برهمکنش‌های بواسطه پروتئین، دو انتهای پلی‌ریبوزوم را به هم متصل کرده و بنابراین چرخش مجدد زیرواحدهای ریبوزومی را تسهیل می‌کند. در نتیجه کارایی سنتز پروتئین افزایش می‌یابد.

۵ـ۴ همانندسازی DNA

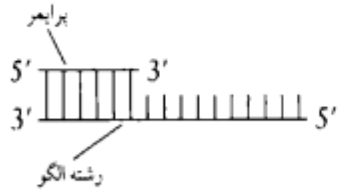
حال که مشاهده کردیم چگونه اطلاعات ژنتیکی موجود در توالی نوکلئوتیدی DNA به پروتئین‌هایی که اکثر فعالیت‌های سلول را انجام می‌دهد ترجمه می‌شود، می‌توانیم به اهمیت دقیق همانندسازی DNA در طول همانندسازی به منظور آماده شدن برای تقسیم سلولی پی ببریم (شکل ۱ـ۴، ❹). ساختار مارپیچ دو رشته‌ایی DNA به وسیلهٔ واتسون و کریک پیشنهاد شد که رشته‌های جدید DNA از رشته‌های موجود (مادری) به عنوان الگو استفاده می‌کند تا رشته‌های جدید (دختر) که مکمل رشته‌های مادری است به وجود آیند.

از نظر تئوری، مدل الگوی جفت شدن باز می‌تواند هم به صورت محافظتی و هم نیمه محافظتی صورت گیرد. در مکانیسم محافظتی، دو رشته دختر یک مولکول DNA دو رشته‌ایی (دوپلکس) جدید را به وجود می‌آورند و DNA دوگانه مادری دست نخورده باقی می‌ماند. در مکانیسم نیمه محافظتی رشته‌های مادری کاملاً از هم باز شده و هرکدام با یک رشتهٔ دختری به صورت دوگانه جفت می‌شود. شواهد قطعی که DNA دو رشته‌ای به وسیلهٔ مکانیسم نیمه محافظتی همانندسازی می‌شود نتیجهٔ آزمایش‌های کلاسیک انجام شده به وسیلهٔ مزلسون و استال می‌باشد که در شکل ۲۹ـ۴ توضیح داده شده است.

همانندسازی از یک رشتهٔ DNA الگو و تولید رشتهٔ مکمل، اساس همانندسازی DNA، نسخه‌برداری DNA و تولید RNA و همان‌طور که در فصل‌های آینده خواهید دید اساس نوترکیبی و تعمیر DNA خواهد بود. در تمام این موارد، اطلاعات در رشتهٔ الگو به شکل توالی خاص نوکلئوتیدی حفظ خواهد شد. در بعضی از ویروس‌های مولکول‌های تک رشته‌ای RNA برای سنتز رشتهٔ مکمل RNA یا DNA به عنوان رشتهٔ الگو عمل می‌کنند. با این حال فراوانی غالب RNA و DNA در سلول‌ها نتیجهٔ سنتز از DNAهای دوگانه از قبل موجود می‌باشد.

DNA پلیمرازها برای شروع همانندسازی به یک پرایمر نیاز دارند

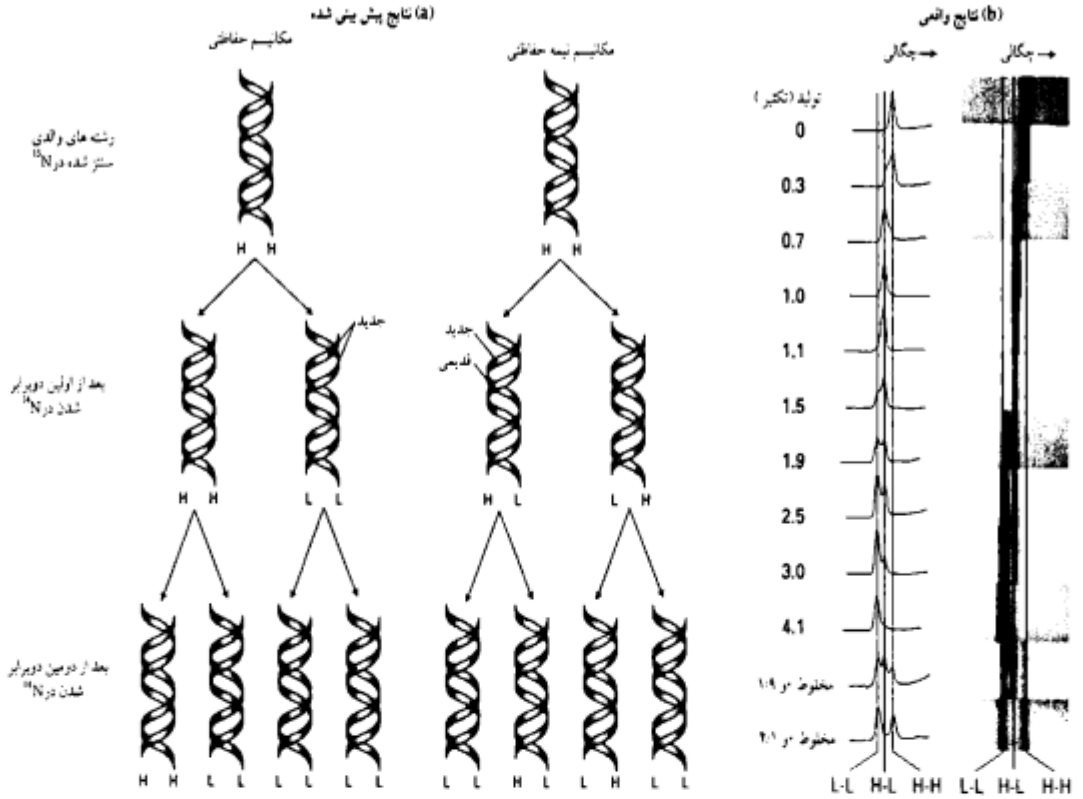
مشابهٔ RNA، DNA نیز از پیش‌سازهای دئوکسی نوکلئوزید ′۵ ـ تری‌فسفات (dNTPs) سنتز می‌شود. همچنین مشابهٔ سنتز RNA، سنتز DNA همیشه در جهت ′۳→′۵ پیش می‌رود چراکه رشد زنجیره، نتیجهٔ تشکیل پیوند فسفودی استری بین اکسیژن ′۳ رشتهٔ در حال رشد و فسفات α یک dNTP می‌باشد (شکل ۱۰a ـ۴). همان‌طور که قبلاً بحث شد یک RNA پلیمراز می‌تواند جایگاه شروع صحیح رونویسی را روی مارپیچ دوگانه DNA پیدا کرده و سنتز RNA را از روی DNA الگوی مکمل شروع کند (شکل ۱۱ـ۴). در مقابل DNA پلیمرازها نمی‌توانند سنتز زنجیره را شروع کنند و به یک رشته کوتاه از DNA و RNA که از قبل وجود دارد نیاز دارند. به این رشتهٔ کوتاه که برای شروع رشد زنجیره مورد نیاز است پرایمر می‌گویند. وقتی یک پرایمر با رشتهٔ الگو جفت شود DNA پلیمراز دئوکسی نوکلئوتیدها را به گروه هیدروکسیل در انتهای ′۳ پرایمر اضافه می‌کند. که این جهت‌یابی پرایمر براساس توالی رشتهٔ الگو می‌باشد.



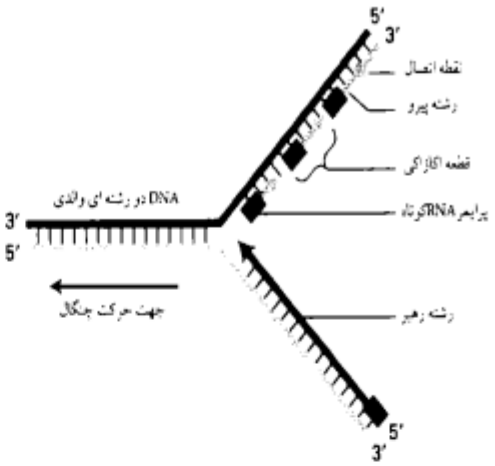
زمانی که یک RNA، پرایمر می‌باشد انتهای ′۵ رشتهٔ دختر RNA بوده و انتهای ′۳ رشتهٔ دختر DNA می‌باشد.

DNA دوگانه باز می‌شود و رشته‌های دختر در چنگال همانندسازی DNA شکل می‌گیرند

برای آن که DNA دوگانه به عنوان یک الگو در طول همانندسازی عمل کند دو رشته‌ایی از DNA که به هم پیچیده‌اند



▲ **شکل ۲۹-۴: (شکل رنگی) آزمایش مزسون ـ استال همانندسازی از نوع نیمه حفاظتی را نشان می‌دهد.** این آزمایش نشان می‌دهد که همانندسازی DNA به صورت نیمه حفاظتی انجام می‌گیرد. ابتدا سلول‌های E.coli در محیط کشت حاوی نمک آمونیومی که دارای نیتروژن سنگین (^{15}N) بود رشد داده شد تا تمام DNAهای سلولی نشاندار شوند. بعد از آن سلول‌ها به محیط کشتی که ایزوتوپ معمولی (سبک) (^{14}N) داشت انتقال داده شد. هر از چند گاهی نمونه‌هایی از محیط کشت برداشت شد و DNA موجود در هر نمونه به وسیلهٔ سانتریفوژ تعادلی شیب غلظت بررسی می‌شدند. در این روش ما کرومولکول‌ها براساس چگالی‌شان جدا می‌شوند. این تکنیک می‌تواند رشته‌های دوگانه سنگین ـ سنگین (H-H) و سبک ـ سبک (L-L) و سنگین ـ سبک (L-H) را به صورت باندهای مجزا از یکدیگر جدا کند. (a) ترکیب‌های مورد انتظار از مولکول‌های دورشته‌ای دختر سنتز شده از DNA نشاندار ^{15}N بعد از آن که سلول‌های E.coli به محیط کشت ^{14}N منتقل شدند، با فرض این‌که همانندسازی DNA به صورت نیمه حفاظتی و حفاظتی رخ می‌دهد. رشته‌های سنگین مادری (H) قرمز می‌باشند و رشته‌های سبک (L) ساخته شده بعد از انتقال به محیط حاوی ^{14}N، آبی می‌باشد. یادآور می‌شویم که مکانیسم حافظتی هرگز DNA H-L تولید نمی‌کند و مکانیسم نیمه حفاظتی هرگز DNA H-H تولید نمی‌کند اما دو برابر شدن در مرحلهٔ دوم H-L DNA تولید می‌کند. بعد از تعداد زیادی همانندسازی، رشته‌های نشاندار شده با ^{15}N (H) نسبت به DNA طبیعی مقدار خیلی کمی خواهند داشت بنابراین در هر دو مکانیسم، بخش اعظم DNA از رشته‌های دوگانه L-L خواهد بود. (b) الگوی باند شدن DNA تزریق شده به دستگاه سانتریفوژ شیب غلظت بعد و قبل از انتقال سلول‌های E.coli از محیط کشت ^{15}N به محیط کشت حاوی ^{14}N. باندهای DNA زیر نور UV قابل مشاهده بوده که فتوگراف آنها نیز تهیه شده است. نمودارهای سمت چپ میزانی از چگالی سیگنال‌های فتوگرافی و هم‌چنین میزانی از غلظت DNA می‌باشند که در سل سانتریفوژ از چپ به راست تغییر می‌کند. تعداد نسل‌ها بعد از انتقال به محیط حاوی ^{14}N به وسیلهٔ محاسبه غلظت سلول‌های E.coli در محیط کشت مشخص شد. این اعداد مطابق با تعداد دورهٔ همانندسازی DNA در هر بار برداشتن از نمونه می‌باشد. بعد از رشد یک نسل، تمام DNA خارج شده از سلول‌ها چگالی H-L DNA داشتند. بعد از نسل ۱.۹ تقریباً نیمی از DNAها چگالی H-L DNA و نیم دیگر چگالی L-L DNA را داشتند. در نسل بعدی بخش اعظم DNA استخراج شده رشته‌های دوگانه L-L بودند و دوگانه H-H هرگز مشاهده نشد. این نتایج مطابق با الگوی مکانیسم نیمه حفاظتی همانندسازی می‌باشد که در شکل (a) نشان داده شده است. ته دو سل سانتریفوژ حاوی ترکیبی از H-H DNA و DNA جدا شده از نسل‌های ۴/۱ و ۱/۹ می‌باشد تا به‌طور واضح جایگاه‌های L-L DNA و H-L و H-H را در شیب غلظت نشان دهد.



▲ **شکل ۳۰ـ۴: (شکل رنگی) سنتز رشته‌های پیرو و پیشرو** DNA. نوکلئوتیدها به وسیلهٔ DNA پلیمراز در جهت ′۳→′۵ به رشتهٔ دختری در حال رشد اضافه می‌شوند (با پیکان نشان داده شده است). رشتهٔ پیشرو به‌طور پیوسته از انتهای ′۵ و تنها از یک پرایمر RNA (قرمز) ساخته می‌شود. رشتهٔ پیرو به‌طور ناپیوسته از چندین پرایمر RNA ساخته می‌شود که این پرایمرها به‌طور متناوب وقتی یک ناحیه از مارپیچ دوگانه DNA باز شد شکل می‌گیرند. سنتز DNA از این پرایمرها قطعات اوکازاکی را به وجود می‌آورند. وقتی هر یک از این قطعات در حال رشد به پرایمر قبلی می‌رسد، پرایمر برداشته شده و قطعات به یکدیگر متصل می‌شوند. تکرار این فرایند در نهایت سبب تولید رشتهٔ پیرو کامل می‌شود.

باید باز شوند تا اجازهٔ جفت شدن بازهای dNTPs که بصورت رشته‌های دختر سنتز خواهند شد داده شود. باز شدن رشته‌های DNA مادری به وسیلهٔ هلیکاز خاصی انجام می‌گیرد. این باز شدن رشته‌ای DNA مادری، از قطعه‌ای از DNA که **منشأهای همانندسازی** نامیده می‌شوند، شروع گردد. توالی نوکلئوتیدی منشأهای همانندسازی در ارگانیسم‌ها به اندازهٔ قابل توجهی متفاوت می‌باشد. با وجود این دارای توالی غنی از A.T هستند. هنگامی که DNA هلیکاز مادری را در جایگاه همانندسازی باز می‌کند، RNA پلیمراز ویژه‌ایی که پریمازنامیده می‌شود RNA پرایمر کوتاهی را به صورت مکمل در رشتهٔ الگوی باز شده می‌سازد. پرایمری که به‌طور مکمل به رشتهٔ DNA الگو جفت شده است به وسیلهٔ DNA پلیمراز پلیمریزه شده و رشتهٔ جدید دختر را به وجود می‌آورد. ناحیه‌ای از DNA که در آن تمام پروتئین‌ها برای سنتز رشته دختر تجمع می‌یابند را چنگال همانندسازی یا چنگال در حال رشد می‌نامند. وقتی همانندسازی انجام می‌گیرد چنگال در حال رشد و پروتئین‌های متصل به آن از جایگاه شروع همانندسازی دور می‌شوند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد باز شدن مارپیچ دوگانه DNA، استرسی را به وجود می‌آورد که به وسیلهٔ توپوایزومراز I از بین می‌رود. برای آن که DNA پلیمراز در طول رشته حرکت کند و یک DNA دوگانه را به وجود آورد هلیکاز باید به‌طور پی در پی مارپیچ دوگانه را باز کند و توپوایزمراز نیز باید سوپرکویل‌هایی که به وجود می‌آیند را جابه‌جا کند.

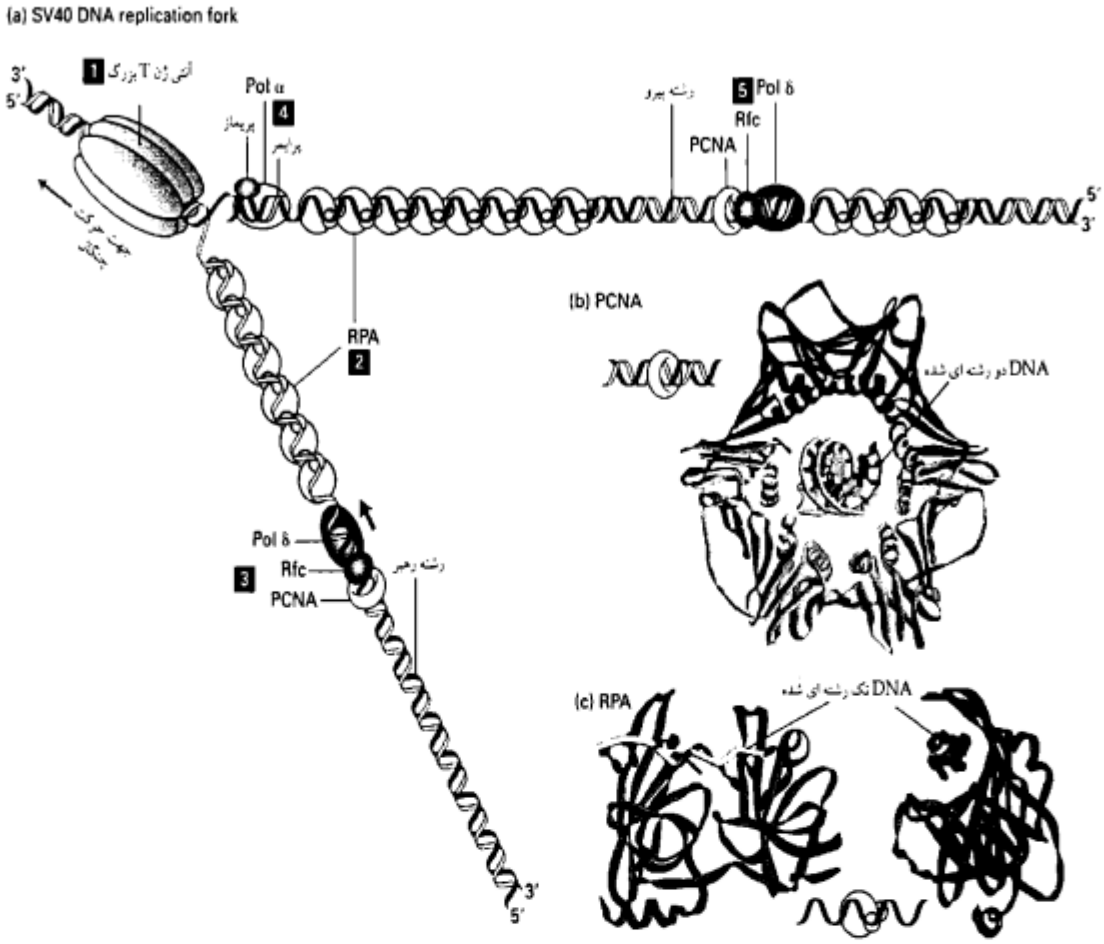
تکمیل عمده اصلی عملکرد چنگال همانندسازی DNA، نتیجهٔ دو ویژگی است: دو رشته از مارپیچ دوگانه DNA مادری به صورت غیرموازی بوده و DNA پلیمراز (همانند RNA پلیمراز) می‌تواند نوکلئوتیدها را تنها در جهت ′۳→′۵ در رشتهٔ دختر در حال رشد اضافه کند. سنتز یک رشتهٔ دختر که رشتهٔ رهبر[1] نامیده می‌شود می‌تواند به‌طور پیوسته تنها از یک پرایمر RNA در جهت ′۳→′۵ پیش رود که همان جهتی است که چنگال همانندسازی جابه‌جا می‌شود (شکل ۳۰ـ۴). مشکل زمانی به وجود می‌آید که رشتهٔ دختر دیگر که رشتهٔ پیرو[2] نام دارد بخواهد همانندسازی کند.

از آنجایی که رشتهٔ پیرو باید در جهت ′۳→′۵ ساخته شود همانندسازی از رشتهٔ الگو را باید در جهت مخالف جابه‌جایی چنگال همانندسازی انجام دهد. یک سلول این کار را با سنتز یک پرایمر جدید به ازای چند صد باز بعد از باز شدن بیشتر مارپیچ دوگانه DNA انجام می‌دهد. هر یک از این پرایمرها که با توالی الگوی خود جفت هستند در جهت ′۳→′۵ ساخته می‌شوند و قطعات ناپیوسته‌ای بنام قطعات اوکازاکی[3] را تشکیل می‌دهند. این قطعات بعد از کشفشان به وسیلهٔ ریجی اوکازاکی به این اسم نامیده شده‌اند (شکل ۳۰ـ۴). پرایمر RNAیی هر قطعهٔ اوکازاکی با DNAیی که در مجاورت قطعهٔ اوکازاکی همسایه ساخته می‌شود جایگزین شده و سرانجام یک آنزیم به نام DNA لیگاز قطعات کنار هم را به هم وصل می‌کند.

چندین پروتئین در همانندسازی DNA شرکت می‌کنند

درک بیشتر جزئیات پروتئین‌های یوکاریوتی که در همانندسازی شرکت می‌کنند به‌طور عمده از مطالعه DNAهای ویروسی بوده که DNA ویروس SV40، (ژنوم حلقوی یک ویروس کوچک که میمون‌ها را آلوده می‌کند) مشخصاً در این مطالعات جزئیات زیادی را در اختیار گذاشته است. سلول‌های آلوده شده به ویروس، تعداد زیادی از ژنوم سادهٔ ویروسی را در زمان کم همانندسازی می‌کنند که یک سیستم ایده‌ال برای بررسی جنبه‌های اساسی همانندسازی DNA

1- Leading Strand 2- Lagging Strand
3- Okazaki fragments



▲ **شکل ۳۱-۴ (شکل رنگی) مدلی از چنگال همانندسازی DNA در SV40.** (a) یک آنتی‌ژن T بزرگ هگزامری ❶(پروتئین ویروسی) به عنوان یک هلیکاز عمل کرده تا رشته‌های DNA را از هم باز کند. قسمت تک رشته‌ایی رشتهٔ الگو که به وسیلهٔ آنتی‌ژن T باز شده‌اند به چندین کپی از پروتئین‌های هترومری RPA متصل می‌شوند. ❷رشتهٔ پیشرو با مجموعه‌ای از DNA پلیمراز δ (polδ)، PCNA و Rfc سنتز می‌شود. ❸سنتز پرایمر برای رشتهٔ پیرو (قرمز، RNA؛ آبی کم‌رنگ، DNA) به وسیلهٔ مجموعه‌ایی از DNA پلیمراز α (Polα) و پریماز انجام می‌گیرد. ❹انتهای ′۳ هر پرایمر سنتز شده به Polα ـ پریماز به کمپلکس PCNA-Rfc-Polδ متصل است که این کمپلکس همانندسازی قطعهٔ اوکازاکی را انجام می‌دهد. ❺ سه زیر واحد از PCNA با رنگ‌های متفاوتی نشان داده شده است. یک دیاگرام از DNA در مرکز تریمر PCNA که به صورت مدل نواری شکل نشان داده شده است. این دیاگرام در بالا و سمت چپ نشان می‌دهد که PCNA به DNA متصل شده است. (c) زیر واحد بزرگ RPA دو دُمین دارد که به DNA تک رشته‌ای متصل است. سمت چپ ساختار دُمین‌های زیر واحد بزرگ RPA را نشان می‌دهد که به DNA تک رشته‌ای که در اینجا اسکلت آن به صورت موازی با سطح کاغذ نشان داده شده است، متصل می‌شود (اسکلت به رنگ سفید، بازها به رنگ آبی). توجه کنید که DNA تک رشته‌ای طوری کشیده می‌شود که بازها به راحتی در معرض قرار بگیرند و یک ساختمان فضایی مناسب برای همانندسازی به وسیلهٔ DNA پلیمراز را داشته باشند. سمت راست طول یک رشتهٔ DNA را نشان می‌دهد که چگونگی قرارگرفتن رشته‌های β دور DNA را آشکار می‌سازد. دیاگرام پایینی در وسط نشان می‌دهد که RPA هترومری به DNA تک رشته‌ای در قسمت (a) متصل شده است.

به وجود می‌آورد. چرا که ویروس‌های ساده مانند SV40 شدیداً به ماشین همانندسازی سلول‌های میزبانشان (در اینجا سلول‌های میمون) وابسته می‌باشند. در نتیجه یک فرصت منحصر به فردی را برای مطالعه همانندسازی از مولکول‌های DNA کوچک یکسان به وسیلهٔ پروتئین‌های سلولی به وجود می‌آورند. شکل ۳۱-۴ چندین پروتئین را نشان می‌دهد که همانندسازی SV40 DNA را در

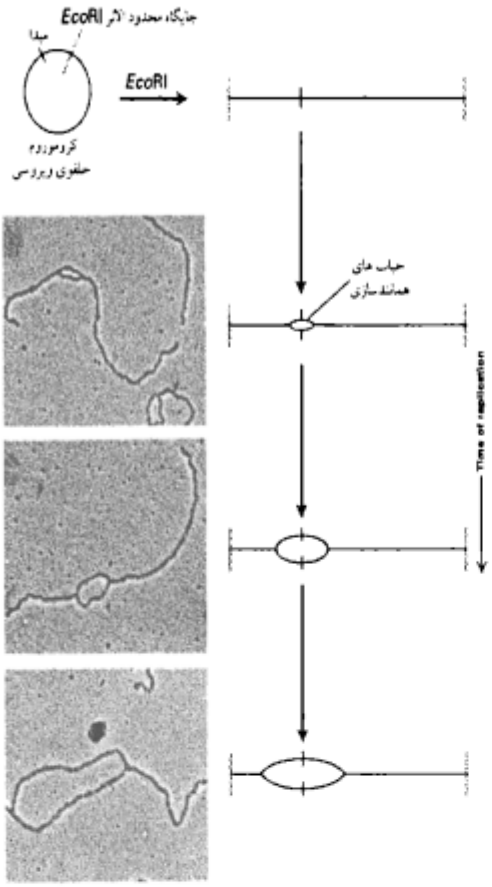
چنگال همانندسازی انجام می‌دهند. پروتئین‌های تجمع یافته در چنگال همانندسازی، ماشین‌های همانندسازی هستند که در فصل ۳ معرفی شدند. این کمپلکس‌های چندجزئی به سلول اجازه می‌دهند تا توالی منظمی از اتفاقات که فعالیت ضروری سلول را تعیین می‌کند، انجام گیرد.

ماشین مولکولی که SV40 DNA را همانندسازی می‌کند تنها یک پروتئین ویروسی دارد. تمام پروتئین‌های دیگر که در همانندسازی SV40 DNA شرکت می‌کنند به وسیلهٔ سلول میزبان تهیه می‌شود. این پروتئین ویروسی، (آنتی‌ژن T بزرگ)، هگزامری را تشکیل می‌دهد که رشته‌های موازی در چنگال همانندسازی را بازمی‌کند. پرایمرهای پیرو و پیشرو DNA دختر به وسیلهٔ کمپلکس پریماز ساخته می‌شود پریماز یک RNA پرایمر کوچک را می‌سازد. بعد از ساخته شدن پرایمر، DNA پلیمراز α (Polα) که پرایمر RNA را به وسیلهٔ دئوکسی نوکلئوتیدها گسترش می‌دهد یک پرایمر RNA-DNA ترکیبی را تشکیل می‌دهد. این پرایمر به وسیلهٔ DNA پلیمراز δ (polδ) گسترش می‌یابد که به خاطر مکانیسم تصحیح خواندن خطای کم‌تری در همانندسازی از رشتهٔ الگو نسبت به DNA پلیمراز α دارد (بخش ۴ـ۶).Polδ با Rfc[1] (فاکتور همانندسازی C) و PCNA[2](آنتی‌ژن هستهٔ سلول در حال تمایز) یک کمپلکس تشکیل می‌دهد که جایگزین کمپلکس پریماز ـ Polα که در حال سنتز پرایمر است می‌شود.

همان‌طور که در شکل b ۳۱ـ۴ توضیح داده شده، PCNA یک پروتئین هموتریمریک بوده و دارای یک حفرهٔ مرکزی است که DNA دو رشته‌ای دختر از آن عبور می‌کند. در نتیجه مانع از جدا شدن کمپلکس Polδ-PCNA-Rfc از رشتهٔ الگو می‌شود. Polδ پلیمراز اصلی یوکاریوت‌ها در طویل‌سازی رشتهٔ DNA طی همانندسازی می‌باشد.

بعد از آن که DNAهای مادری از یکدیگر جدا شده و به صورت تک رشته‌ای در چنگال همانندسازی ایجاد شدند، چندین کپی از RPA (پروتئین همانندسازی A) که یک پروتئین هتروتریمری می‌باشد به DNA تک رشته‌ای در چنگال همانندسازی متصل می‌شود (شکل c۳۱ـ۴). متصل شدن RPA ساختمان فضایی رشتهٔ الگو را برای کپی‌برداری پلیمراز به صورت مناسب حفظ می‌کند. پروتئین‌های RPA، از رشته‌های الگو به وسیله Polα و Polδ در حال سنتز رشته‌های مکمل جفت شده با رشته‌های مادری جدا می‌شوند.

چندین پروتئین یوکاریوتی که در همانندسازی DNA شرکت



▲ شکل تجربی ۳۲ـ۴: میکروسکوپ الکترونی همانندسازی دو سویهٔ را در SV40 DNA ثابت می‌کند. میکروسکوپ الکترونی از SV40 DNA در حال همانندسازی، رشد دو سویهٔ رشته‌های DNA را در نقطهٔ آغازین نشان می‌دهد. DNA ویروسی در حال همانندسازی از سلول‌های آلوده شده به وسیلهٔ SV40 توسط آنزیم محدودکنندهٔ EcoR1 بریده شده‌اند که این آنزیم یک جایگاه را در DNA حلقوی شناسایی می‌کند. این عمل صورت می‌گیرد تا یک ناحیهٔ مشخص برای توالی خاص در ژنوم SV40 به وجود آید. توالی مورد شناسایی EcoR1 در این شرایط به عنوان انتهاهای DNA خطی به راحتی شناسایی می‌شود که به وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است. میکروگراف‌های الکترونی از مولکول‌های SV40 DNA که به وسیلهٔ EcoR1 بریده شده و بعد از آن در حال همانندسازی می‌باشند یک مجموعه از مولکول‌های بریده را نشان می‌دهد که به‌طور قابل توجهی دارای حباب‌های همانندسازی بزرگ‌تری بوده و مرکز این حباب‌ها تا انتهای مولکول DNA بریده شده فاصلهٔ ثابتی داشتند. این یافته مطابق با رشد دو سویهٔ رشته‌ها از یک نقطهٔ آغازین که در مرکز یک حباب همانندسازی قرار گرفته است، بود. این یافته در دیاگرام‌های مربوطه کاملاً مشخص می‌باشد.

1-Replication factorC

2-Proliferating cell nuclear antigen

می‌کند در شکل ۴ـ۳۱ نشان داده نشده است. DNA پلیمراز ε نیز در سنتز DNA کروموزومی سلول شرکت می‌کند که عملکرد دقیق آن مشخص می‌باشد. همچنین DNA پلیمرازهای مشخصی در تعمیر بازهایی که به صورت ناجور روبروی هم قرار گرفته‌اند و نقص‌های به وجود آمده در DNA، شرکت می‌کنند (قسمت ۴ـ۶ را ملاحظه کنید). یک توپرایزومراز در جلوی هلیکاز برای برداشتن استرس فشار به وجود آمده از باز شدن رشتهٔ مادری به DNA مادری اتصال دارد. ریبونوکلئاز H و FENI، ریبونوکلئوتیدها را از انتهاهای ۵′ قطعات اوکازاکی بر می‌دارند این قطعات توسط دئوکسی‌نوکلئوتیدهای اضافه شده توسط DNA پلیمرازی جایگزین می‌شوند. قطعات اوکازاکی متوالی به وسیلهٔ DNA لیگاز در جهت ۳′→۵′ پیوند فسفواستری به هم متصل می‌شوند. همانندسازی از DNA خطی یک مشکل خاصی را به وجود می‌آورد چرا که انتهای ۵′ پرایمر RNA از رشته‌های پیرو به وسیلهٔ این مکانیسم نمی‌تواند جایگزین شود. این مشکل در اکثر یوکاریوت‌ها به وسیلهٔ کمپلکس پروتئین ـ RNA که تلومراز نامیده می‌شود حل شده است. این کمپلکس تلومراز، الگوی خودش را برای همانندسازی دارد که در فصل ۶، ژن‌ها، ژنومیکس، و کروموزوم بحث شده است.

همانندسازی DNA معمولاً به صورت دو جهته از نقطهٔ آغازین صورت می‌گیرد

همانطوریکه در شکل‌های ۴ـ۳۰ و ۴ـ۳۱ نشان داده شده است، هر دو رشتهٔ DNA مادری به وسیلهٔ باز شدن موضعی در چنگال همانندسازی در حال همانندسازی به رشتهٔ دختر هستند. به صورت تئوری، همانندسازی DNA از یک نقطهٔ آغازین می‌تواند تنها شامل یک چنگال همانندسازی باشد که در یک جهت حرکت می‌کند. روش دیگر آن است که، دو چنگال همانندسازی از یک نقطهٔ آغازین به وجود آمده و در جهت مخالف هم حرکت می‌کنند و موجب رشد دو سویه دو رشتهٔ دختر شوند.

چندین نوع آزمایش شامل آنچه که در شکل ۴ـ۳۲ نشان داده شده است شواهد اولیه در حمایت از رشد دو سویهٔ رشته‌ها را به وجود آورد. نظر عمومی آن است که تمام سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی مکانیسم دو سویه‌ای را در همانندسازی DNA به خدمت گرفته‌اند. در مورد SV40 DNA، همانندسازی به وسیلهٔ اتصال دو هلیکاز هگزامری T ـ آنتی‌ژن بزرگ به یک نقطهٔ آغازین SV40 شروع می‌شود و تجمع پروتئین‌های دیگر، دو چنگال همانندسازی را تشکیل می‌دهد. سپس این‌ها از نقطهٔ آغازین SV40 در جهت مخالف با سنتز رشته‌های پیرو و پیشرو در دو چنگال از یکدیگر دور می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۴ـ۳۳ نشان داده شده است، چنگال همانندسازی سمت چپ به سنتز DNA در جهت چپ ادامه می‌دهد و به‌طور مشابه چنگال همانندسازی راست سنتز DNA را در جهت راست دنبال می‌کند.

بر خلاف SV40 DNA، DNA کروموزومی یوکاریوتی دارای چندین نقطهٔ آغازین همانندسازی می‌باشد که این نقاط به وسیلهٔ صدها و ده‌ها کیلوباز از یکدیگر جدا شده‌اند. یک پروتئین شش زیر واحدی هگزامر که ORC (کمپلکس تشخیص‌دهندهٔ نقطهٔ آغازین) نامیده می‌شود به هر یک از این نقطه‌های آغازین متصل می‌شود. پروتئین ORC همچنین در نقطهٔ آغازین به پروتئین‌هایی که برای نشاندن هلیکاز هگزامر سلولی متشکل از ۶ پروتئین همولوگ MCM (که مخفف minichromosom maintenance می‌باشد غربالگری ژنتیکی که در ابتدا برای مشخص کردن ژن‌های رمزدهی کنندهٔ آنها به کار برده شد) مورد نیاز هستند متصل می‌شود.

دو هلیکاز MCM که به صورت مخالف قرار گرفته‌اند رشته‌های مادری را در نقطه آغازین جدا می‌کنند. و پروتئین‌های RPA به رشته‌های تک رشته‌ای حاصل متصل می‌شوند. سنتز پرایمر و مراحل بعدی در همانندسازی DNA سلولی مشابه آنهایی است که در همانندسازی SV40 DNA اتفاق می‌افتد (شکل‌های ۴ـ۳۲ و ۴ـ۳۱).

همانندسازی DNA سلولی و اتفاقات دیگر منجر به تمایز شدیداً تنظیم شده سلول‌ها می‌شوند. به‌طوری که تعداد مناسبی از سلول‌های هر بافت در طول نمو و سراسر زندگی یک ارگانیسم تولید می‌شود. همچنین در رونویسی اکثر ژن‌ها، تنظیم همانندسازی DNA سلولی به عنوان یک مرحلهٔ کنترلی اولیه به حساب می‌آید. فعال شدن فعالیت هلیکاز MCM که برای شروع همانندسازی مورد نیاز است به وسیلهٔ پروتئین‌کینازهای خاصی با نام **کینازهای وابسته به سیکلین** فاز S تنظیم می‌شود. کینازهای وابسته به سیکلین جنبه‌های دیگر تمایز سلولی شامل فرآیندهای پیچیدهٔ میتوز که به وسیلهٔ آن سلول یوکاریوتی به دو سلول دختر تقسیم می‌شود را تنظیم می‌کنند. ما مکانیسم‌های تنظیمی متفاوتی که سرعت تقسیم سلولی را تعیین می‌کنند در فصل ۲۰ بحث خواهیم کرد.

نکات کلیدی بخش ۵-۴

همانندسازی DNA

- هر رشته در DNA دورشته‌ای مادر به عنوان یک الگوبرای

سنتز رشته دختر عمل کرده و با رشته جدید جفت باز تشکیل داده و یک دورشته‌ای دختر تشکیل می‌شود (با استفاده از مکانیسم نیمه حفاظتی). رشته‌های جدید در جهت ′۳ـ′۵ تشکیل می‌شوند.

- همانندسازی در توالیهایی که مبدأ نامیده می‌شوند شروع می‌گردد. هر کدام از مولکولهای DNA در کروموزوم‌های یوکاریوتی حاوی چندین توالی شروع همانندساری می‌باشند.
- DNA پلیمراز برخلاف RNA پلیمراز نمی‌تواند رشته‌های DNA دورشته‌ای را باز کند و نمی‌تواند سنتز رشته‌های مکمل جدید را برای رشته مکمل شروع کند.
- در محل چنگال همانندسازی، یکی از رشته‌های دختر(رشته رهبر) به صورت پیوسته طویل می‌شود. رشته دختری دیگر (رشته پیرو) به صورت مجموعه‌هایی از قطعات اکازاکی مجزا از پرایمرهای حاوی یکصدنوکلئوتید تشکیل می‌شود (شکل ۳۰-۴)
- ریبونوکلئوتیدهای انتهای ′۵ هر قطعه اکازاکی با طویل شدن انتهای ′۳ قطعه اوکازاکی بعدی برداشته و جایگزین می‌شود. در نهایت قطعات اکازاکی مجاور توسط DNA لیگاز به هم متصل می‌شوند.
- هلیکاز با استفاده از انرژی هیدرولیز حاصل از ATP رشته‌های DNA والدی را از هم جدا می‌کند. پرایماز پرایمرهای کوتاه DNA را سنتز می‌کند که با رشته DNA مکمل جفت باز تشکیل می‌دهند. این شروع درانتهای ′۳ توسط DNA پلیمراز $(pol\alpha)\alpha$ گسترش یافته و باعث تولید یک رشته دختری ′۵RNA_′۳DNA می‌شود.
- بسیاری از DNA در سلول‌های یوکاریوتی توسط Polδ سنتز می‌شود که به جای Polα عمل کرده و طویل سازی پیوستهٔ رشته دختر را در جهت ′۳ـ′۵ انجام می‌دهد. Polδ با اتصال به پروتئین Rfc متصل به PCNA (یک پروتئین تریمری که دور DNA دورشته‌ای دختر را می‌گیرد) به صورت پایدار و همراه با رشته الگو درمی‌آید.
- همانندسازی DNA یوکاریوتی در بدن توسط کنترل فعالیت هلیکاز MCM که همانندسازی DNA را در چندین جایگاه شروع در کروموزوم‌ها شروع می‌کند تنظیم می‌شود.

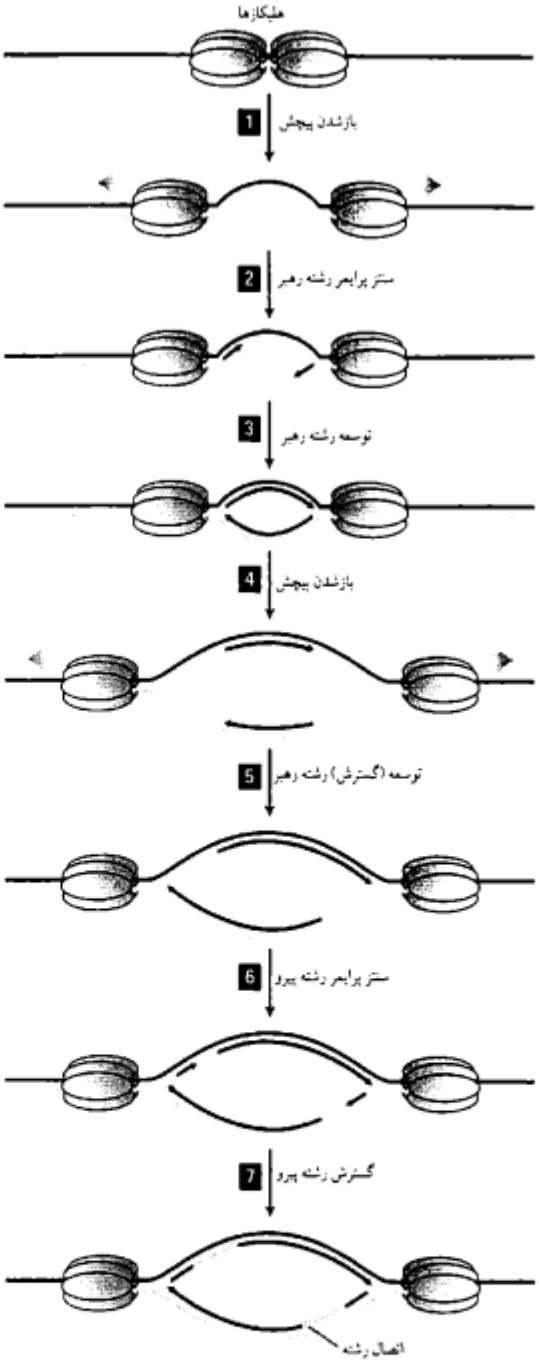
۴ـ۶ تعمیر و نوترکیبی DNA

آسیب DNA دور از دسترس نبوده و به طرق مختلف می‌تواند به وجود آید. آسیب DNA می‌تواند به صورت شکست خودبه‌خودی در پیوند شیمیایی DNA به وسیله عوامل محیطی از قبیل پرتوهای فرابنفش و پرتوهای یونی و یا به وسیلهٔ واکنش با ترکیبات شیمیایی ژنوتوکسیک که به‌طور طبیعی در متابولیسم سلولی تولید شده و یا در محیط وجود دارند به وجود آید. یک تغییر در توالی DNA طبیعی **جهش** نامیده می‌شود که می‌تواند در طول مرحلهٔ همانندسازی زمانی که DNA پلیمراز نوکلئوتید اشتباه را همزمان با خواندن یک الگوی آسیب‌دیده وارد می‌کند، رخ دهد. همچنین جهش‌ها می‌توانند با میزان کم‌تر در پی همانندسازی DNA پلیمراز از رشتهٔ الگوی سالم به وجود آیند و اگر این جهش‌ها تصحیح نشوند به‌طور تدریجی در سلول‌ها جمع می‌شوند و زمانی که مقدار آنها زیاد شود سلول‌ها دیگر نمی‌توانند عملکرد صحیح داشته باشند. علاوه بر این، به علت تکثیر بالای DNA در سلول‌های زاینده، این سلول‌ها می‌توانند جهش‌های زیادی را به خود بگیرند. بنابراین جلوگیری از اشتباه در توالی DNA در سلول‌های مختلف برای حیات مهم می‌باشد. در نتیجه سلول برای تعمیر DNA آسیب‌دیده و تصحیح اشتباه در توالی، چندین مکانیسم سلولی را در خود به وجود آورده است. یک مکانیسم برای تعمیر شکست‌های به وجود آمده در هر دو رشتهٔ DNA که به آن مکانیسم نوترکیبی می‌گویند، به وسیلهٔ سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود. در این مکانیسم، ترکیبی از ژنوم مادری و پدری از طریق تبادل قطعات کروموزوم‌ها در طول تولید سلول‌های زاینده (اسپرم و تخمک) بوجود می‌آیند.

به‌طور قابل توجهی نقص در مکانیسم تعمیر DNA و به وجود آمدن سرطان رابطهٔ خیلی نزدیکی دارند. وقتی که مکانیسم تعمیر، جهش را از بین نبرد، جهش‌ها در DNA سلول جمع می‌شوند. اگر این جهش‌ها ژن‌هایی که در تنظیم تقسیم سلولی شرکت می‌کنند را تحت تأثیر قرار دهند منجر به تولید تومور و در پی آن سرطان می‌شوند. در فصل ۲۵ به‌طور جزئی به نحوهٔ ایجاد سرطان در پی نقص در سیستم تعمیر DNA پرداخته شده است. در این قسمت ما به چند مثال بر خواهیم خورد و همچنین ابتدا به روش‌هایی می‌پردازیم که یکنواختی DNA می‌تواند بررسی شود و سپس به مکانیسم‌های تعمیری می‌پردازیم که سلول برای اطمینان از صحت غلط‌گیری این مولکول بسیار مهم، در خود پدید آورده است.

DNA پلیمرازها اشتباهات را در طول همانندسازی به وجود می‌آورند و خود آنها را تصحیح می‌کنند

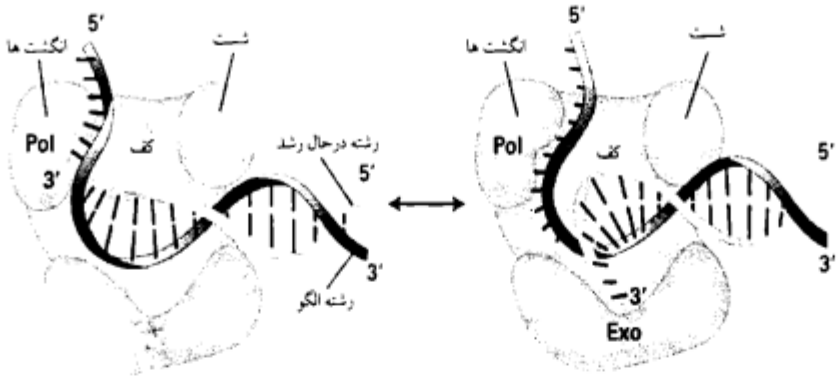
اولین مرحله در جلوگیری از ورود جهش‌ها، خود DNA پلیمراز



شکل ۳۳-۴: (شکل رنگی) مکانیسم دو سویه همانندسازی DNA. چنگال همانندسازی سمت چپ مشابه چنگال همانندسازی نشان داده شده در شکل ۳۱-۴ است که در آن شکل، پروتئین‌های دیگر هم نشان داده شده است. شکل بالا دو هلیکاز هگزامری T - آنتی‌ژن بزرگ را نشان می‌دهد که ابتدا در نقطهٔ آغازین همانندسازی در جهت مخالف یکدیگر قرار گرفته‌اند. مرحله ❶: با مصرف انرژی تولید شده از هیدرولیز ATP، دو هلیکاز در جهت مخالف حرکت می‌کنند و DNA دو رشته‌ای را از یکدیگر باز کرده و آن را به رشته‌های الگوی تک رشته‌ای تبدیل می‌کنند و بعد از آن پروتئین‌های RPA به آن متصل می‌شوند. مرحله ❷: کمپلکس‌های پریماز - Polα پرایمرهای (قرمز) کوتاه رشته‌های مادری که به صورت تک رشته‌ایی وجود دارند را می‌سازند. مرحله ❸ کمپلکس PCNA-RFC-Polδ جای کمپلکس پریماز - Polα را گرفته، سنتز پرایمر کوتاه را ادامه می‌دهد و رشته‌های پیشرو (سبز پر رنگ) در هر چنگال همانندسازی تولید می‌کند. مرحلهٔ ❹: هلیکاز رشته‌های مادری را بیشتر باز می‌کند و پروتئین‌های RPA به تک رشته‌هایی که تازه باز شده‌اند متصل می‌شوند. مرحله ❺ : کمپلکس PCNA-RFC-Polδ رشته‌های پیشرو را گسترش می‌دهند. مرحله ❻: کمپلکس پریماز - polα پرایمر را در رشته‌های پیرو چنگال همانندسازی می‌سازند. مرحله ❼ : کمپلکس PCNA-RFC-Polδ به جای کمپلکس پریماز - Polα قرار می‌گیرند و قطعات اوکازاکی در رشته پیرو (سبز کم رنگ) را گسترش می‌دهند. این رشته‌های پیرو در نهایت به انتهای رشتهٔ پیشرو در $5'$ متصل می‌شود. محلی که اتصال صورت می‌گیرد در شکل به صورت دایره نشان داده شده است. همانندسازی به وسیلهٔ باز شدن بیشتر رشته مادری و همانندسازی رشته‌های پیرو و پیشرو همان‌طور که در مراحل ❹ و ❼ نشان داده شده است، ادامه می‌یابد. با وجود آن که برای نظم و روشنی بیشتر، مراحل به صورت جداگانه نشان داده شده است اما باز شدن و سنتز رشته‌های پیرو و پیشرو به‌طور همزمان انجام می‌گیرد.

انتهای $3'$ دوباره به جایگاه پلیمراز بر می‌گردد و در آنجا که این باز را به‌طور صحیح قرار می‌دهد. همانند DNA پلیمراز E.coli، DNA پلیمراز یوکاریوتی δ و ε که همانندسازی DNA کروموزومی سلول‌های جانوری را بر عهده دارد نیز دارای فعالیت غلط‌گیری می‌باشند. غلط‌گیری یک فعالیت حیاتی برای سلول‌ها می‌باشد تا از انباشته شدن جهش‌ها در سلول جلوگیری شود.

می‌باشد. زمانی که DNA پلیمراز در حال همانندسازی روی رشتهٔ الگو در حال پیش رفتن باشد یک نوکلئوتید نادرست به انتهای $3'$ رشته در حال رشد اضافه می‌شود (شکل ۳۱-۴). به عنوان مثال DNA پلیمراز E.coli یک نوکلئوتید نادرست را به ازای اضافه کردن 10^4 نوکلئوتید در توالی DNA به وجود می‌آورد. با وجود این، نرخ ایجاد جهش در باکتری خیلی کمتر از این یعنی حدود ۱ اشتباه به ازای اضافه کردن 10^6 نوکلئوتید در DNA می‌باشد. صحت قابل ملاحظه در عملکرد DNA پلیمراز E.coli به دلیل غلط‌گیری DNA پلیمراز می‌باشد.



▲ **شکل ۴ـ۳۴: غلط‌گیری توسط DNA پلیمراز.** پلیمرازها ساختار سه بعدی مشابهی دارند که شبیه یک دست راست نیمه باز می‌باشند. انگشتان به قطعهٔ تک رشته‌ایی رشتهٔ الگو متصل می‌شوند و فعالیت کاتالیتیک پلیمرازی در فضای بین انگشتان و کف دست انجام می‌شود. تا زمانی که نوکلئوتیدهای صحیح به انتهای ′۳ رشتهٔ در حال رشد اضافه می‌شود این رشته در جایگاه پلیمرازی باقی می‌ماند. وارد شدن باز نادرست به انتهای ′۳ سبب باز شدن انتهای جفت رشتهٔ تازه تشکیل شده می‌گردد. در نتیجه پلیمراز متوقف شده و انتهای ′۳ رشتهٔ در حال رشد به جایگاه اگزونوکلئاز ′ (Exo)′۳←۵ که با جایگاه پلیمرازی ۳ نانومتر فاصله دارد منتقل می‌شود و در این جایگاه، بازی که به صورت اشتباه وارد شده را بر می‌دارد. در پی آن انتهای ′۳ به جایگاه پلیمریزاسیون بر می‌گردد و طویل‌شدن رشته ادامه می‌یابد.

غلط‌گیری، وابسته به فعالیت اگزونوکلئازی ′۳←۵′ DNA پلیمراز می‌باشد. وقتی یک باز نادرست در طول همانندسازی DNA وارد می‌شود جفت شدن باز موجود در انتهای ′۳ رشتهٔ در حال رشد و رشتهٔ الگو اتفاق نمی‌افتد. در نتیجه پلیمراز توقف می‌کند، سپس انتهای ′۳ رشتهٔ در حال رشد را به جایگاه اگزونوکلئاز خود انتقال می‌دهد که در آنجا باز نادرست برداشته می‌شود (شکل ۴ـ۳۴). سپس

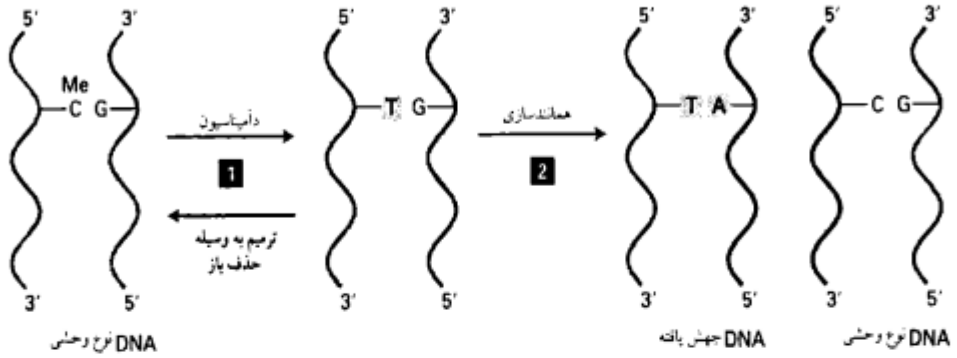
آسیب‌های شیمیایی و پرتویی DNA می‌توانند منجر به جهش شوند

DNA بـه‌طور پـیوسته هـدف مـجموعه‌ای از آسـیب‌های واکنش‌های شیمیایی می‌باشد. برآورد تعداد آسیب‌های DNA در یک سلول انسان، حدود 10^4 تا 10^6 آسیب در روز می‌باشد. حتی اگر DNA در معرض ترکیبات شیمیایی آسیب زننده قرار نگیرد در حالت طبیعی و فیزیولوژیک دارای ساختار ناپایداری می‌باشد. بـه عنوان مثال پیوندی که باز پورین را به دئوکسی ریبوز متصل می‌کند در شرایـط فـیزیولوژیک مسـتعد هـیدرولیز شـدن بـا سـرعت پـایین می‌باشدکه نتیجه آن ایجاد قند بدون اتصال به باز است. در نتیجه اطلاعات موجود در DNA از بین رفته و منجر به ایجاد جهش در طی همانندسازی می‌شود. واکنش‌هایی که به‌طور طبیعی در سلول صورت می‌گیرند از قبیل حرکت الکترون‌ها در طول زنجیرهٔ انتقال الکترون در مـیتوکندری و اکسـیداسـیون لیـپیدها در پـراکسـیزوم، تـرکیبات شیمیایی‌متفاوتی را به وجود می‌آورند که با DNA واکنش داده و به آن آسیب می‌زنند. این تـرکیبات شـامل رادیکـال هـیدروکسیل و سوپراکسید (O_2^-) می‌باشند. این‌ها هم‌چنین می‌توانند جهش‌هایی ایجاد کنند که منجر به ایجاد سرطان شوند.

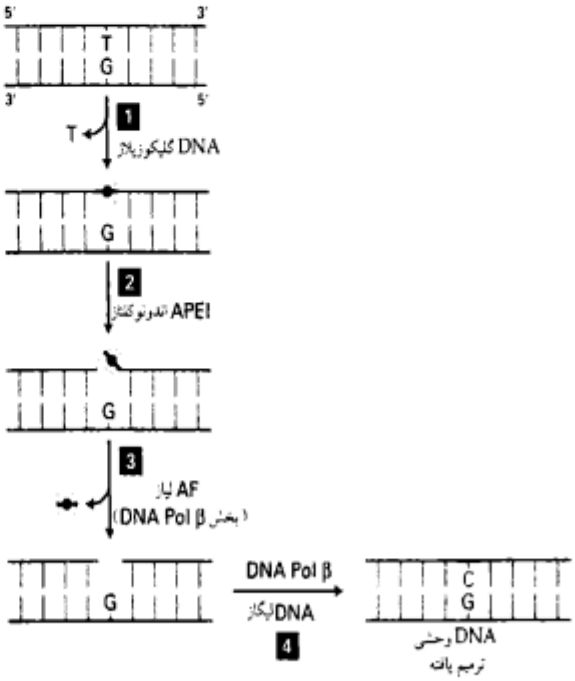
خیلی از جهش‌های خودبه‌خودی **جهش‌های نقطه‌ای**[1] هستند که باعث تغییر در یک جفت باز در توالی DNA می‌شوند. یکی از جهش‌های نقطه‌ای که به فراوانی اتفاق می‌افتد دآمـیناسیون بـاز سیتوزین (C) می‌باشد که این باز را به باز یوراسیل (U) تبدیل می‌کند. علاوه بر این، باز تغییر یافتهٔ ۵ ـ متیل سیتوزین که به‌طور معمول در توالی DNA وجود دارد نیز با دآمیناسیون به باز تیمین تبدیل می‌شود. اگـر ایـن تـغییرات قـبل از هـمانندسازی DNA شناسایی نشود سلول از رشته‌هایی که دارای U و T هستند به عنوان الگو استفاده می‌کند و جفت بازهای T.A یا U.A تشکیل می‌دهد که در نتیجه آن تغییرات قابل توجهی در توالی DNA به وجود می‌آید (شکل ۴ـ۳۵).

پرتوهای محیطی نیز پیامدهای قـابل تـوجهی روی DNA دارند. پرتوهای یونیزان با انرژی بالا مثل اشعهٔ X و گاما می‌توانند باعث شکست در هر دو رشته شوند. پرتو UV مـوجود در اشـعهٔ خورشید باعث خرابی مارپیچ دورشته‌ای DNA می‌شوند کـه بـا همانندسازی و رونویسی تداخل ایجاد می‌کند.

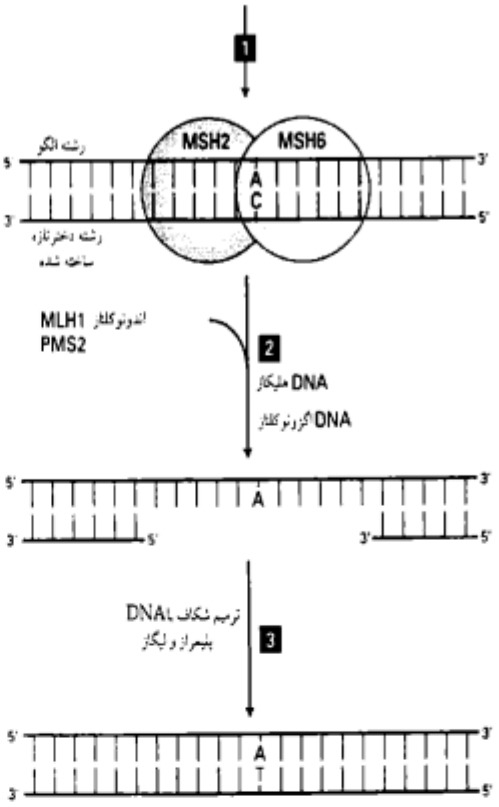
1- Point mutations



▲ **شکل ۳۵-۴: دآمیناسیون منجر به جهش نقطه‌ای می‌شود.** جهش نقطه‌ای که خودبه‌خودی صورت می‌گیرد می‌تواند به وسیلهٔ دآمیناسیون ۵ ـ متیل سیتوزین (C) و تبدیل آن به تیمین (T) صورت گیرد. اگر جفت باز T.G که از این فرآیند به وجود آمده‌اند به صورت جفت باز C.G به وسیلهٔ مکانیسم تعمیر به وسیلهٔ حذف باز برگردانده نشوند (مرحلهٔ ❶) سبب تغییر قابل توجهی در توالی (جهش) DNA بعد از همانندسازی از آن خواهند شد. (مرحله ❷). بعد از یک دوره همانندسازی یک مولکول DNA دختری دارای جفت باز جهش یافته T.A خواهد بود و DNA دختری دیگر جفت باز طبیعی C.G را خواهد داشت.



◀ **شکل ۳۶-۴: ترمیم برش بازی یک عدم تطابق T.G.** یک DNA گلیکوزیلاز مخصوص به عدم تطابق T.G (که عمدتاً از طریق دآمینه شدن ۵ ـ متیل سیتوزین ـ شکل ۳۵-۴ ـ پدید می‌آید) باز تیمین را به بیرون از مارپیچ DNA می‌کشاند و بعد آن را بریده و از قند جدا می‌سازد (مرحلهٔ ❶) و فقط دئوکسی ریبوز باقی می‌ماند. سپس یک اندونوکلئاز خاص به نام AP (Apurinic) آندونوکلئاز ۱ (APE1) برای جایگاه بدون باز ایجادشده ، رشتهٔ DNA را برش می‌دهد (مرحلهٔ ❷) و دئوکسی ریبوز فسفات توسط یک اندونوکلئاز به نام AP لیاز (Apurinic) که با DNA پلیمراز β مرتبط است جدا می‌شود. DNA پلیمراز β نوعی خاص از DNA پلیمرازها است که در ترمیم استفاده می‌شود (مرحلهٔ ❸). قطعه‌ای از رشتهٔ DNA که بریده شده بود توسط DNA پلیمراز β دوباره پر می‌شود و DNA لیگاز هم دو انتهای این قطعهٔ تازه ساخته شده را به بقیهٔ رشته متصل می‌کند (مرحلهٔ ❹) و در نتیجه جفت باز اصلی G.C دوباره پدید می‌آید.



▲ **شکل ۳۷ـ۴: ترمیم برش عدم تطابق در سلول‌های انسانی.** مسیر ترمیمی برش عدم تطابق، خطاهای ناشی از همانندسازی را اصلاح می‌کند. یک کمپلکس از پروتئین‌های MSH2 و MSH6 (همولوگ‌های ۲ و ۶ پروتئین MutS باکتری) به قطعهٔ حاوی عدم تطابق DNA متصل می‌شود، به گونه‌ای که بین الگو و رشتهٔ دختری (تازه‌ساز) تمایز قائل شود (مرحلهٔ ❶). این منجر به اتصال MLH1 و PMS2 (همولوگ‌های MutL باکتریایی) می‌شود. سپس کمپلکس پروتئین ـ DNA حاصله به یک اندونوکلئاز متصل می‌شود و این اندونوکلئاز، رشتهٔ دختری تازه‌ساز را برش می‌دهد. سپس یک DNA هلیکاز، مارپیچ DNA را باز می‌کند و یک اگزونوکلئاز چندین نوکلئوتید از انتهای قطع شدهٔ رشتهٔ دختری که شامل باز عدم تطابق می‌شود، جدا می‌کند (مرحلهٔ ❷). در انتها، همانند ترمیم برش بازی، فضای خالی ایجاد شده توسط یک DNA پلیمراز (Polδ) پر می‌شود و توسط یک DNA لیگاز قطعهٔ جدید به بقیهٔ رشته متصل می‌گردد (مرحلهٔ ❸).

سیستم‌های ترمیمی از طریق برش DNA، با صحت بالایی تخریب DNA را تشخیص داده و آنها را ترمیم می‌کنند

در سلول‌ها علاوه بر اینکه آنزیم DNA پلیمراز با خاصیت «غلط‌گیری»، آنچه خود ساخته است را دوباره بررسی کرده و اشتباهات رخ داده را ترمیم می‌کند، سیستم‌های ترمیمی دیگری نیز برای جلوگیری از جهش‌های ناشی از همانندسازی اشتباه DNA و یا جهش‌هایی که به‌طور خودبه‌خودی یا در اثر مواجهه با مواد شیمیایی خاص و یا تابش اشعه رخ داده‌اند، وجود دارد. سیستم‌های متعددی عمل ترمیم DNA را از طریق برش DNA[1] انجام می‌دهند که به خوبی هم مطالعه شده‌اند. نخست سه سیستم شناخته شد (از طریق مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی بر روی E.coli). وجود پروتئین‌های همولوگ با پروتئین‌های باکتریایی در یوکاریوت‌ها، از مخمر گرفته تا انسان، بیانگر این است که این مکانیسم‌های ترمیمی در مراحل ابتدایی تکامل به وجود آمده‌اند تا از صحت DNA محافظت کنند. تمام این سیستم‌ها به‌طور مشابهی عمل می‌کنند: قطعه‌ای از رشتهٔ آسیب‌دیدهٔ DNA برش می‌یابد و این فضای خالی ایجاد شده با استفاده از رشتهٔ DNA مکمل توسط DNA پلیمراز و لیگاز ساخته می‌شود.

حال نگاه عمیق‌تری به برخی از این مکانیسم‌های ترمیمی می‌اندازیم، از ترمیم جهش‌های تک بازی تا ترمیم DNA شکسته شده در هر دو رشته. برخی از این مکانیسم‌ها ترمیم را بسیار دقیق انجام می‌دهند و برخی دیگر دقت کمی دارند.

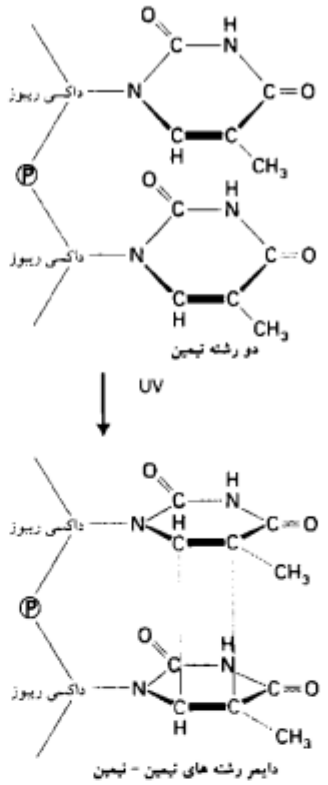
ترمیم برش بازی، عدم تطابق T.G و نیز بازهای آسیب دیده را ترمیم می‌کند

در انسان رایج‌ترین نوع جهش‌های نقطه‌ای، تبدیل باز C به T است که نتیجهٔ دِآمینه شدن ۵ ـ متیل سیتوزین و تبدیل آن به تیمین است (شکل ۴-۳۵ را ملاحظه کنید). مسئله‌ای که در رابطه با **ترمیم برش بازی**[2] وجود دارد این است که سیستم چگونه تشخیص بدهد کدام رشته صحیح و کدام رشته حاوی جهش است. از آنجایی که عدم تطابق G.T تقریباً همیشه در اثر تبدیل شیمیایی C به U یا ۵ ـ متیل سیتوزین به T اتفاق می‌افتد، سیستم ترمیمی به گونه‌ای تکامل یافته که T را حذف کرده و آن را با C جایگزین می‌کند (شکل ۴ـ۳۶ را ملاحظه کنید).

عدم تطابق G.T توسط یک DNA گلیکوزیلاز تشخیص داده می‌شود که باز T را از مارپیچ DNA به بیرون می‌کشد و سپس پیوندی که بین آن و قند نوکلئوتید وجود دارد را هیدرولیز می‌کند. پس از این برش، یک آنزیم به نام «AP اندونوکلئاز» (AP مخفف apurinic، به معنای بدون پورین است) رشتهٔ DNA را در نزدیکی

1- Excision-repair systems

2- Base-excision repair



▲ **شکل ۳۸ـ۴: شکل‌گیری دایمرهای تیمین ـ تیمین.** رایج‌ترین نوع تخریب DNA که در اثر تابش اشعهٔ U.V اتفاق می‌افتد، دایمرهای تیمین ـ تیمین است که این دایمرها می‌توانند توسط سیستم ترمیم برش نوکلئوتیدی، ترمیم شوند.

ناحیهٔ بدون باز (نوکلئوتیدی که باز T آن جدا شده) برش می‌دهد. سپس قند دئوکسی ریبوز فسفاته‌ای که فاقد باز است هم جدا می‌شود. پس از آن یک DNA پلیمراز مخصوص سیستم ترمیمی، قطعه را دوباره می‌سازد و به جای T در مقابل G، C قرار می‌دهد. این ترمیم باید پیش از همانندسازی DNA انجام بگیرد زیرا باز اشتباه در این جفت، یعنی T، در داخل DNA به‌طور طبیعی (A.T) واقع شده در نتیجه می‌تواند یک جفت واتسون ـ کریکی پدید آورده و به یک جهش نقطه‌ای پایدار تبدیل شود که دیگر سیستم ترمیم قادر به شناسایی آن نخواهد بود (شکل ۳۵ـ۴، مرحلهٔ ❷ ملاحظه کنید). سلول‌های انسانی مجموعه‌ای از گلیکوزیلازها دارند که هر کدام مختص گروه متفاوتی از بازهای تغییر یافتهٔ DNA هستند. به عنوان مثال، یک از آنها، ۸ـ اکسی گوانین که یک شکل اکسید شدهٔ گوانین است را حذف کرده، و اجازه می‌دهد که با گوانین سالم جایگزین شود و برخی دیگر، بازهای تغییر یافته توسط عوامل آلکیله کننده را حذف می‌کنند. نوکلئوتید باقی مانده پس از عمل نوکلئاز، فاقد باز است. این نوکلئوتید توسط مکانیسم ترمیمی که گفته شد جایگزین می‌گردد. یک مکانیسم مشابه در ترمیم نقص‌های ناشی از دِپوریناسیون، یعنی حذف باز گوانین یا آدنین از DNA که در نتیجه هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی بین دئوکسی ریبوز و باز حاصل می‌شود عمل می‌کند. دِپوریناسیون به‌طور خودبه‌خودی اتفاق می‌افتد و در پستانداران امری رایج است. اگر نواحی فاقد باز، ترمیم نشده رها شوند، موجب پیدایش جهش به هنگام همانندسازی می‌شوند زیرا آنها قادر نیستند جفت بازی صحیح را تعیین کنند.

برش عدم تطابق، عدم تطابق‌های دیگر و حذف و اضافه‌های کوچک را ترمیم می‌کند

فرایند دیگری که این هم از باکتری تا انسان حفظ شده است، عدم تطابق‌ها و حذف یا اضافه شدن یک یا چند نوکلئوتید (که به‌طور تصادفی توسط DNA پلیمراز داخل رشتهٔ DNA قرار می‌گیرند) را حذف می‌کند. همان مسئله‌ای که در مورد ترمیم برش بازی (برش باز T در عدم تطابق T.G) وجود داشت، در مورد سیستم **ترمیمی برش عدم تطابق**[1] هم وجود دارد. یعنی این‌که چگونه تشخیص داده شود کدام رشته صحیح و کدام رشته حاوی نوکلئوتید غلط است. چگونگی این تشخیص در سلول‌های انسانی دقیقاً مشخص نیست. تصور می‌شود که پروتئین‌هایی که به قطعهٔ حاوی عدم تطابق متصل می‌شوند، رشتهٔ دختری را از رشتهٔ الگو تشخیص می‌دهند. سپس قطعهٔ حاوی عدم تطابق از رشتهٔ دختری که حاوی خطای همانندسازی است بریده می‌شود و آن را ترمیم می‌کند (شکل ۳۷ـ۴). بر خلاف سیستم ترمیم برش بازی، سیستم ترمیم برش عدم تطابق پس از همانندسازی DNA اتفاق می‌افتد.

نوعی سرطان کولون به نام «**سرطان غیرپولیپی ارثی کولورکتال**[2]» وجود دارد که افرادی که یک جهش ارثی در یکی از نسخه‌های ژن MLH1 و MSH2 دارند مستعد ابتلا به آن هستند. پروتئین‌های MLH1 و MSH2 برای ترمیم عدم تطابق ضروری‌اند (شکل ۳۷ـ۴ را ملاحظه کنید). سلول‌هایی که حداقل یک نسخهٔ فعال از هر کدام از این ژن‌ها را داشته باشند ترمیم عدم تطابق طبیعی دارند. اما تومور زمانی پدید می‌آید که یک جهش اتفاقی در نسخهٔ دوم این ژن‌ها هم رخ بدهد. وقتی هر

1- Mismatch excision repair

2- Hereditary nanpolyopsis colorectal cancer

دو نسخهٔ ژن غیرفعال باشند سیستم عدم تطابق عمل نخواهد کرد. جهش‌های غیرفعال‌کننده در ژن‌ها در شکل غیرارثی سرطان کولون هم رایج‌اند.

برش نوکلئوتیدی، اداکت‌های شیمیایی را که شکل طبیعی DNA را به هم می‌زنند ترمیم می‌کند

سلول‌ها از سیستم **ترمیمی برش نوکلئوتیدی**[1] برای تثبیت کردن نواحی از DNA که حاوی بازهای تغییر یافته هستند استفاده می‌کنند. این بازهای تغییر یافته که اداکت‌های شیمیایی[2] نامیده می‌شوند شکل طبیعی DNA را در یک ناحیهٔ خاص به هم می‌زنند. نکتهٔ کلیدی در این نوع ترمیم، وجود پروتئین‌هایی است که توانایی این را دارند که در طول مولکول دو رشته‌ای DNA بلغزند و به دنبال برآمدگی‌ها و یا دیگر بدشکلی‌ها در مارپیچ دو رشته‌ای بگردند. به عنوان مثال، این مکانیسم، **دایمرهای تیمین ـ تیمین** (که یک نوع رایج از تخریب توسط اشعهٔ U.V است) را ترمیم می‌کند. این دایمرها با همانندسازی و رونویسی تداخل می‌کنند.

شکل ۴ـ۳۹ نشان می‌دهد که سیستم برش نوکلئوتیدی، DNA تخریب شده را ترمیم می‌کند. حدود ۳۰ پروتئین در این فرایند درگیرند که اولین آنها در نتیجهٔ مطالعهٔ نقص‌های پدید آمده در سیستم ترمیم DNA بر روی سلول‌های کشت شدهٔ افراد مبتلا به گزرودرما پیگمینتوزوم[3] شناسایی شد. این بیماری، ارثی بوده و چنین افرادی مستعد ابتلا به سرطان هستند. این افراد در صورت مواجهه با اشعه U.V نور خورشید به نوعی سرطان پوستی به نام **ملانوما** و همچنین **کارسینومای سلول‌های پوششی** مبتلا می‌شوند. سلول‌های این بیماران سیستم برش نوکلئوتیدی فعال ندارند. جهش حداقل در یک ژن از هفت ژن مختلف که نام آنها از XP-A تا XP-G می‌باشد منجر به غیرفعال‌سازی این سیستم ترمیمی و ابتلا به گزرودرما پیگمینتوزوم می‌گردد. جهش در هر کدام از این ژن‌ها فنوتیپ مشابهی پدید خواهد آورد. اکنون وظایف اکثر این پروتئین‌های XP در سیستم ترمیم برش نوکلئوتیدی به خوبی شناخته شده است (شکل ۴ـ۳۹ را ملاحظه کنید).

جالب است که پنج زیر واحد از TFIIH که یک فاکتور رونویسی عمومی لازم برای رونویسی از تمام ژن‌ها است، برای ترمیم برش نوکلئوتیدی در سلول‌های یوکاریوتی نیز مورد نیاز هستند. دو تا از این زیر واحدها با هلیکازها، همولوژی (شباهت) دارند (شکل ۴ـ۳۹). در رونویسی، فعالیت هلیکازی TFIIH باعث باز شدن مارپیچ DNA در نقطهٔ شروع می‌شود و در نتیجه RNA پلیمراز می‌تواند رونویسی را آغاز کند (شکل ۷ـ۳۱ را ملاحظه کنید). به نظر می‌رسد که طبیعت از یک ترکیب پروتئینی مشابهی در دو فرایند متفاوت سلولی که هر دو به فعالیت هلیکازی احتیاج دارند، استفاده کرده است.

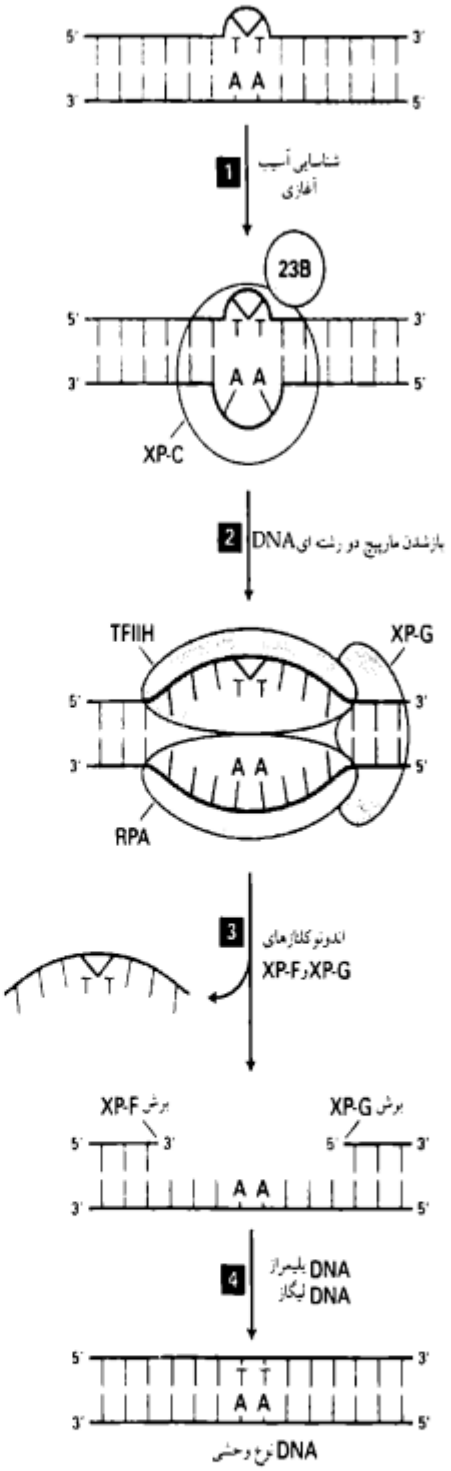
استفاده از زیر واحدهای مشترک در رونویسی و ترمیم DNA ممکن است به شرح این پدیدهٔ مشاهده شده کمک کند که در یوکاریوت‌های پیشرفته، تخریب پدیده آمده در مناطقی از ژنوم که به‌طور فعال در حال رونویسی شدن هستند با سرعت بسیار بیشتری نسبت به مناطقی که در حال رونویسی نیستند، ترمیم می‌شود. به این پدیده «**ترمیم همراه با رونویسی**»[4] گفته شده است. از آنجایی که فقط بخش کوچکی از ژنوم هر سلول یوکاریوتی پیشرفته رونویسی می‌شود، ترمیم جفت شده با رونویسی، فقط به مناطق بسیار حساس مربوط می‌شود. در این سیستم، اگر RNA پلیمراز در یک نقطهٔ آسیب‌دیده (مثل دایمر تیمین ـ تیمین) از حرکت بایستد، یک پروتئین کوچک به سمت RNA پلیمراز کشیده می‌شود. این اتفاق موجب تحریک گشوده شدن مارپیچ DNA در آن نقطه می‌گردد. سپس TFIIH به سمت آن کشیده شده و واکنش‌های مراحل ❷ تا ❹ در شکل ۴ـ۳۹ اتفاق می‌افتند.

دو سیستم از نوترکیبی، جهت ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای DNA، استفاده می‌کنند

اشعه یونیزان (مثل تابش X و γ) و برخی داروهای ضد سرطان موجب شکست در دو رشتهٔ DNA می‌شوند. این شکست‌ها آسیب‌های شدیدی برای DNA هستند زیرا اتصال مجدد قطعهٔ جدا شده به بقیهٔ DNA اگر اشتباه صورت بگیرد می‌تواند منجر به از بین رفتن ترتیب صحیح کروموزومی و عملکرد ژن‌ها شود. به عنوان مثال، اتصال اشتباه می‌تواند یک ژن هیبرید پدید آورد که انتهای آمین آن را یک توالی اسیدآمینه‌ای و انتهای کربوکسیل آن را یک توالی نامربوط به آن ژن به وجود می‌آورد. و یا پروموتر یک ژن نزدیک ناحیهٔ رمزدهی کنندهٔ یک ژن دیگر قرار گرفته و در نتیجه سطح بیان آن ژن را تغییر دهد.

دو سیستم برای ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای به وجود آمده‌اند. مکانیسم غالب برای ترمیم چنین شکست‌هایی در جانداران

1- Nucleotide excision repair
2- Chemical adducts
3- Xeroderma pigmentosum
4-Transcription-coupled repair



◀ **شکل ۳۹ـ۴: ترمیم برش نوکلئوتیدی در سلول‌های انسانی.** یک آسیب DNA که می‌تواند ساختار مارپیچ دو رشته‌ای DNA را به هم بزند، مثل دایمر تیمین ـ تیمین، ابتدا توسط کمپلکسی از XP-C (پروتئین گزرودرما پیگمنتوزوم C) و پروتئین 23 B تشخیص داده می‌شود (مرحلهٔ ❶). سپس این کمپلکس، فاکتور رونویسی TFIIH را به سمت خود می‌کشد. زیر واحدهای هلیکازی فاکتور TFIIH با مصرف ATP، دو رشتهٔ DNA را به‌طور جزئی باز می‌کند. بعد پروتئین‌های XP-G و RPA به این کمپلکس متصل شده و دو رشتهٔ DNA را بیشتر باز می‌کنند تا اینکه یک حباب حدوداً ۲۵ بازی پدید می‌آید (مرحلهٔ ❷). سپس XP-G (که اکنون به عنوان اندونوکلئاز عمل می‌کند) و XP-F (دومین اندونوکلئاز)، رشتهٔ تخریب شده را در نقطه‌هایی با فاصلهٔ ۲۴ تا ۳۲ باز از هر طرف آسیب می‌برند (مرحلهٔ ❸). در نتیجه قطعهٔ DNA حاوی بازهای تخریب شده رها می‌شود و بعد تجزیه شده و به نوکلئوتیدهای مجزا تبدیل می‌شود. نهایتاً ناحیهٔ خالی توسط DNA پلیمراز، دقیقاً مشابه همان چیزی که در همانندسازی رخ می‌دهد، پر می‌شود و DNA لیگاز این قطعهٔ تازه‌ساز را به بقیهٔ رشته می‌چسباند (مرحلهٔ ❹).

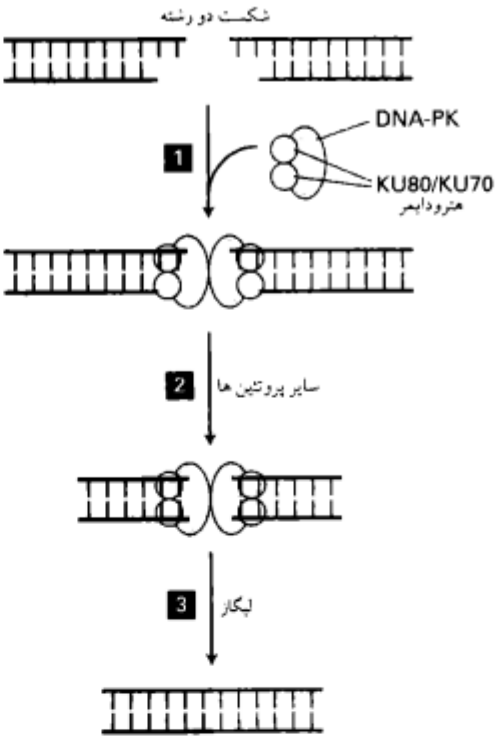
پر سلولی «**اتصال انتهای غیرهمولوگ**[1]» است. در این مکانیسم اتصال دو انتهای غیرهمولوگ دو مولکول DNA اتفاق می‌افتد. این فرآیند، خطاپذیر است، حتی اگر قطعات DNA متصل شده مربوط به یک کروموزوم باشند، فرآیند ترمیم حتماً با حذف چندجفت باز در نقطهٔ اتصال همراه خواهد بود (شکل ۴۰ـ۴). چنین حذفی می‌تواند باعث ایجاد جهش شود. این مورد مثالی است برای این‌که چگونه ترمیم تخریب DNA می‌تواند موجب ایجاد جهش شود. مکانیسم دوم «**نوترکیبی همولوگ**» نام دارد که در بخشهای دیگر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

از آنجایی که حرکت DNA در هسته حاوی از پروتئین‌ها خیلی کم است، معمولاً انتهاهای صحیح البته با از دست رفتن چند جفت باز به یکدیگر متصل می‌شوند. اما اگر قطعات مربوط به دو کروموزوم مختلف به هم متصل شوند منجر به نقل مکان یک تکه از DNA، از یک کروموزوم به کروموزوم دیگر می‌شود. چنین نقل مکان‌هایی ممکن است ژن‌های کایمریک ایجاد کنند که می‌توانند اثرات شدیدی بر عملکرد طبیعی سلول مانند رشد خارج از کنترل سلول که نشانهٔ سرطان است، بگذارند. اثرات مخرب شکست دو رشته‌ای DNA باعث می‌شود همانند فیلم ژولیوس سزار، اثر شکسپیر، به آن نقش «نامهربان‌ترین» اعطا شود!

نوترکیبی همولوگ می‌تواند تخریب DNA را ترمیم کند و تنوع ژنتیکی پدید آورد

زمانی تصور می‌شد که نوترکیبی همولوگ یک فرایند ترمیمی کوچک و کم اهمیت در سلول‌های انسانی است. این تصور زمانی که فهمیدند بسیاری از سرطان‌های انسانی از طریق جهش‌های ارثی در ژن‌های مهم در «ترمیم نوترکیبی همولوگ» پدید می‌آیند، تغییر کرد

1- Nonhomologous end-joining



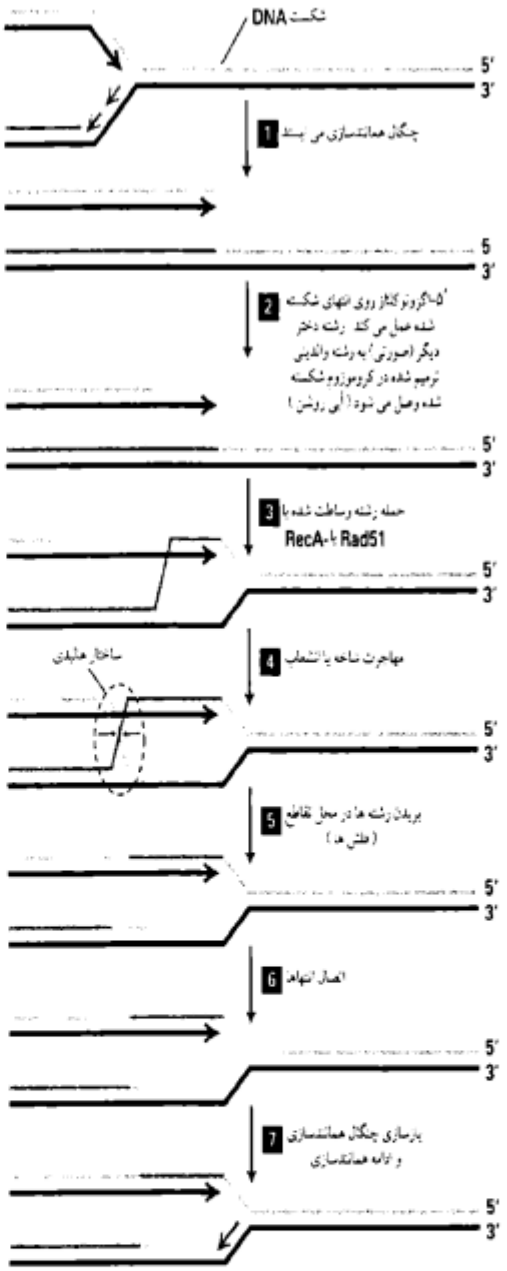
▲ **شکل ۴۰ـ۴. اتصال انتهاهای غیرهمولوگ.** وقتی کروماتیدهای خواهری برای کمک به ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای در دسترس نیستند، توالیهای نوکلئوتیدی که در DNA سالم مقابل یکدیگر نبوده‌اند، با هم برخورد می‌کنند. این انتهاهای DNA معمولاً از یک جایگاه کروموزومی هستند و هنگامی که به هم متصل می‌شوند، چندین جفت باز از دست می‌رود. گاهی اوقات انتهاهایی از دو کروموزوم مختلف، تصادفاً به هم متصل می‌شوند. کمپلکسی از دو پروتئین به نام‌های UK و پروتئین کیناز وابسته به DNA به انتهاهای یک برش دو رشته‌ای متصل می‌شود (مرحلهٔ ❶). بعد از شکل‌گیری یک سیناپس، انتهاهای تعدادی از بازهای خود را توسط نوکلئازها از دست می‌دهند (مرحلهٔ ❷) و دو مولکول دو رشته‌ای به همدیگر می‌چسبند (مرحلهٔ ❸). در نتیجه، شکست دو رشته‌ای ترمیم می‌شود اما چند جفت باز در ناحیهٔ شکست از دست می‌روند.

(جدول ۱ـ۲۵ را ملاحظه کنید). به عنوان مثال اکثر زنانی که به‌طور ژنتیکی مستعد سرطان پستان هستند یک جهش در یکی از آلل‌های ژن BRCA-1 و یا BRCA-2 دارند. این ژن‌ها پروتئین‌هایی را رمزدهی می‌کنند که در این فرایند ترمیمی دخالت دارند. نقص و یا از دست رفتن دومین آلل از این ژن‌ها در چنین زنانی، باعث مهار مسیر ترمیم نوترکیبی همولوگ می‌شود و بنابراین بروز سرطان در سلول‌های اپی‌تلیال یا تخمدان را تحریک می‌نماید. با این حال هنوز مشخص نیست که چرا این بافت‌های پاسخ‌دهنده به استروژن، مکان‌های ترجیحی کارسینوژنز هستند. مخمرها می‌توانند شکست‌های دو رشته‌ای تحریک شده توسط اشعه γ را ترمیم کنند. جداسازی و آنالیز جهش یافته‌های حساس به تابش (RAD) که در این نوع سیستم ترمیمی، ناکارآمد هستند، مطالعهٔ این فرایند را تسهیل ساخت. در واقع تمام پروتئین‌های Rad مخمر در ژنوم انسانی همولوگ دارند، و پروتئین‌های انسانی و مخمری به‌طور مشابهی عمل می‌کنند.

انواعی از آسیب‌های DNA که توسط مکانیسم‌هایی قبلی نمی‌توانستند ترمیم شوند، می‌توانند توسط مکانیسم‌هایی که در آنها توالی تخریب شده توسط یک قطعهٔ کپی شده از توالی مشابه یا یک DNA همولوگ بر روی کروموزوم همولوگ (در مورد ارگانیسم‌های دیپلوئید) و کروموزوم خواهری (در مورد تمام ارگانیسم‌ها) جایگزین می‌شود، ترمیم گردند. این مکانیسم‌ها شامل تعویض رشته‌ها بین مولکول‌های جداگانه DNA می‌باشد و بنابراین با مکانیسم‌های **نوترکیبی DNA** مرتبط می‌شوند.

مکانیسم‌های نوترکیبی مشابه، علاوه بر تأمین یک مکانیسم جهت ترمیم DNA، از طریق تعویض نواحی بزرگی از کروموزوم‌های همولوگ بین جفت مادری و پدری در طول تقسیم **میوز**، (نوعی خاص از تقسیم سلولی که سلول‌های زاینده (اسپرم و تخمک) را پدید می‌آورد)، تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه بوجود می‌آورند (شکل ۳ـ۵). در حقیقت، تعویض مناطقی از کروموزوم‌های همولوگ، که به آن «**کراسینگ‌آور**» گفته می‌شود، برای جدایی مناسب کروموزوم‌ها طی نخستین تقسیم میوزی سلول لازم است. میوز و پیامدهای ایجاد ترکیبات جدیدی از ژن‌های پدری و مادری بر روی یک کروموزوم توسط نوترکیبی، بعداً در فصل ۵ مورد بحث قرار خواهند گرفت. مکانیسم‌هایی که منجر به جدایی مناسب کروموزوم‌ها طی میوز می‌شوند در فصل ۲۰ توضیح داده شده‌اند. در اینجا ما بر روی مکانیسم‌های مولکولی نوترکیبی DNA و تعویض رشته‌های DNA بین دو مولکول DNA متمرکز می‌شویم.

ترمیم یک چنگال همانندسازی فروپاشیده: یک مثال از ترمیم نوترکیبی DNA، ترمیم یک چنگال همانندسازی فروپاشیده می‌باشد. اگر یک شکست در پیوند فسفودی استری یک رشته از DNA پدید آمده باشد و پیش از این‌که چنگال همانندسازی به آن برسد ترمیم نشود، وقتی هلیکاز به نقطهٔ شکسته رسید بخش‌های همانندسازی شدهٔ کروموزوم‌های دختری جدا می‌شوند زیرا پیوند کوالانی بین دو قطعه از رشتهٔ والدی وجود ندارد. به این فرایند «**چنگال**



▲ **شکل ۴۱-۴: (شکل رنگی) ترمیم نوترکیبی یک چنگال همانندسازی فروپاشیده.** رشته‌های والدی به صورت آبی روشن و تیره نشان داده شده‌اند. رشتهٔ دختری پیشرو قرمز تیره است و رشتهٔ دختری پیرو صورتی است. خطوط مورب در مرحلهٔ ❸ و بعد از آن نشان‌دهندهٔ یک پیوند فسفودی استر از رشتهٔ DNA است. فلش‌های کوچک سیاه در مرحلهٔ ❹ نشان‌دهندهٔ شکست پیوندهای فسفودی استر در تقاطع رشته‌های DNA در ساختار هالیدی است.

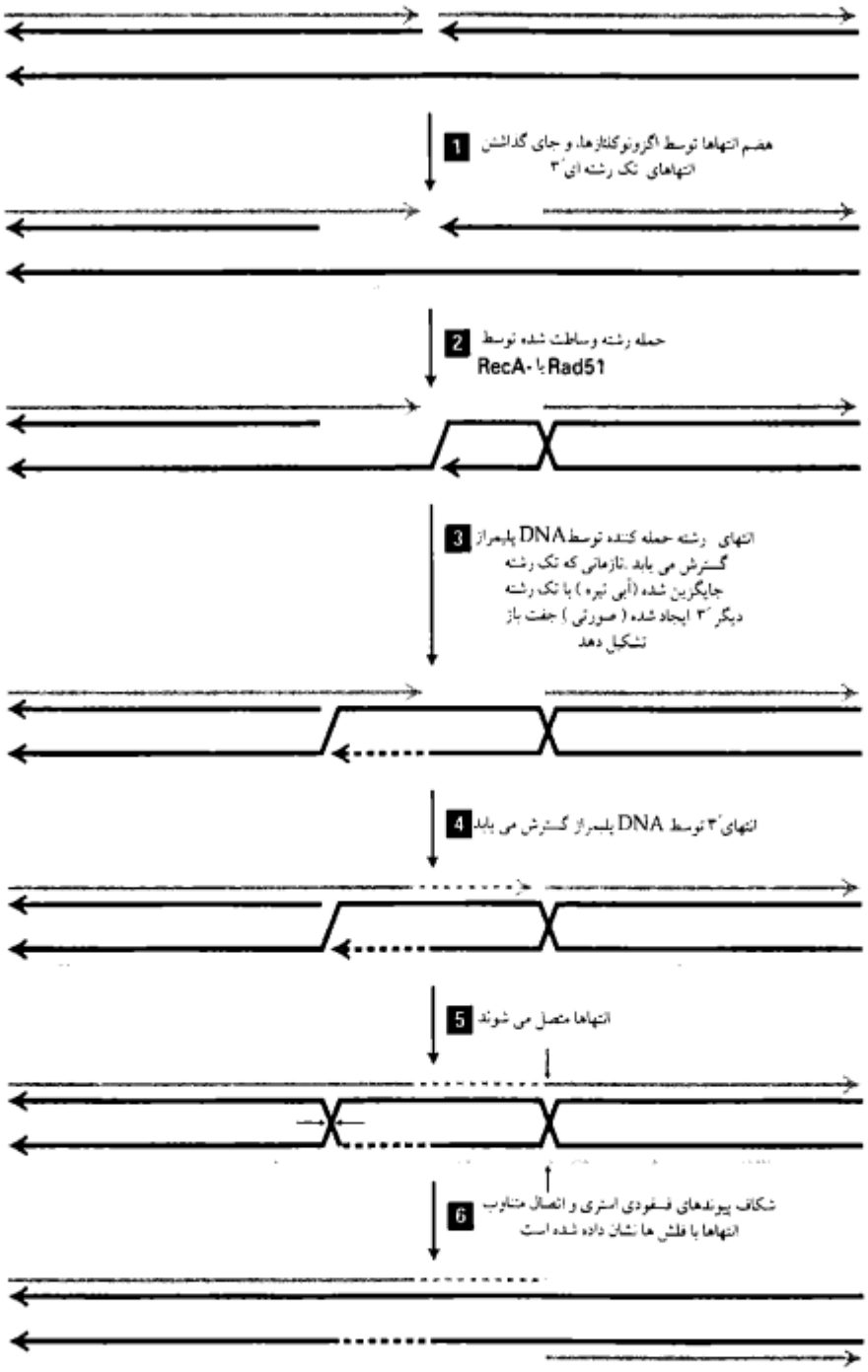
همانندسازی فروپاشیده[1] گفته می‌شود (شکل ۴۱-۴ مرحله ❶). اگر این ترمیم نشود حداقل بر روی یک سلول دختری که از آن سلول پدید می‌آید معمولاً کشنده خواهد بود زیرا اطلاعات ژنتیکی از محل برش تا انتهای کروموزوم را ندارد. فرایند نوترکیبی که شکست دو رشته‌ای پدید آمده را ترمیم کرده و یک چنگال همانندسازی دیگر پدید می‌آورد، با آنزیم‌ها و پروتئین‌های متعددی سر و کار دارند که فقط برخی از آنها در اینجا بیان می‌شوند.

اولین مرحله در ترمیم شکست دو رشته‌ای این است که، رشته‌ای که انتهای '۵ آن در نقطهٔ شکست واقع شده (آبی کم رنگ)، توسط یک اگزونوکلئاز تجزیه می‌شود و بخشی از رشتهٔ دیگر که انتهای '۳ آن در نقطهٔ شکست واقع شده (قرمز تیره) را تک رشته‌ای می‌کند (شکل ۴۱-۴ مرحلهٔ ❷). رشتهٔ پیرو تازه ساخته شده (صورتی) در مقابل رشتهٔ مادری همولوگ، که دچار شکست نشده، به بخش همانندسازی نشدهٔ کروموزوم مادری متصل می‌شود (شکل ۴۱-۴ مرحلهٔ ❷). یک پروتئین کلیدی که برای مرحلهٔ بعد لازم است پروتئینی است که در باکتری RecA، و در ساکارومایسیس سرویزیه و بقیهٔ یوکاریوت‌ها، Rad51 نامیده می‌شود. چندین مولکول Rad51 / RecA به DNA تک رشته‌ای (که هم اکنون به عنوان رشتهٔ مهاجم تلقی می‌شود) متصل می‌گردد و هیبرید شدن آن را با یک توالی دقیقاً مکمل و یا تقریباً مکمل، در DNA دو رشته‌ای همولوگ آن کاتالیز می‌کنند، حال یا مولکول ایجاد شده تحت تأثیر لیگاز بعد از فروپاشی چنگال همانندسازی (همان‌طور که در شکل نشان داده شده)، و یا کروموزوم همولوگ دیگر در ارگانیسم‌های دیپلوئید قرار می‌گیرد. رشتهٔ دیگر (آبی تیره) در این DNA دو رشته‌ای هدف (رشته‌ای که با رشتهٔ مهاجم جفت نمی‌شود) به صورت یک لوپ تک رشته‌ای در طول ناحیهٔ هیبریداسیون مکملش و رشتهٔ مهاجم در می‌آید (شکل ۴۱-۴ مرحلهٔ ❸). تهاجم یک تک رشته‌ای مکمل یکی از رشته‌های DNA به مولکول دو رشته‌ای DNA، که توسط RecA یا Red51 کاتالیز می‌شود، فرآیند کلیدی در نوترکیبی است. از آنجایی که هیچ جفت بازی در این پروسه یعنی **تهاجم رشته** از دست نرفته و یا ایجاد نمی‌شود، نیازی هم به دریافت انرژی ندارد.

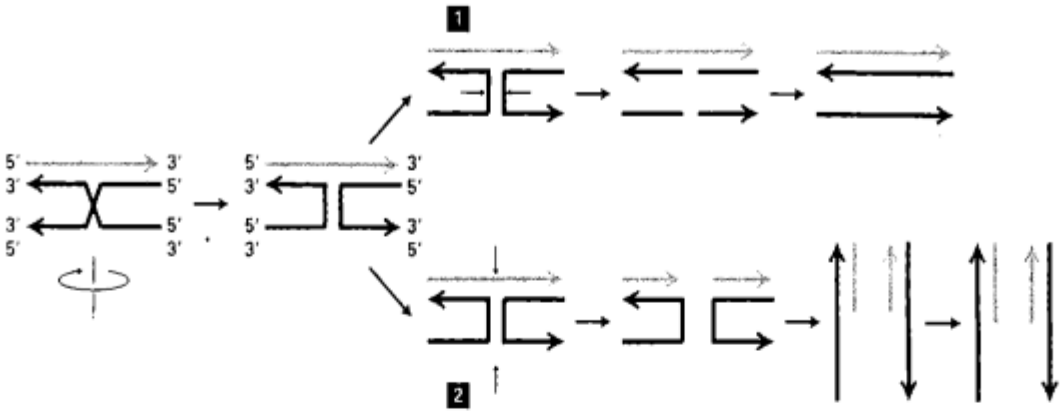
سپس، منطقهٔ هیبرید شده بین DNA هدف (صورتی) و رشتهٔ مهاجم (قرمز تیره)، توسط پروتئین‌هایی که از هیدرولیز ATP بهره می‌برند، از ناحیهٔ شکست فاصله می‌گیرد. به این فرآیند، **مهاجرت شاخه**[2] گفته می‌شود (شکل ۴۱-۴ مرحلهٔ ❹). زیرا نقطه‌ای است که در آن DNA هدف (صورتی)، یک رشتهٔ مکمل را قطع می‌کند (آبی

1- Keplieation fork collapse

2- Branch migration



▲ **شکل ۴۲-۴: شکست دو رشتهٔ DNA توسط نوترکیبی همولوگ ترمیم می‌گردد.** جهت سهولت، هر مارپیچ دو رشته‌ای DNA به صورت دو خط موازی نشان داده شده و قطبیت رشته‌ها توسط نوک پیکان‌ها در انتهاهای ۳′ مشخص شده‌اند. مولکول بالایی دارای یک شکست دو رشته‌ای است. توجه کنید که در دیاگرام DNA بالایی، رشته‌ای که انتهای ۳′ آن در سمت راست قرار دارد در بالا قرار گرفته، و در دیاگرام DNA پائینی، این رشته در زیر نشان داده شده است. متن را ملاحظه کنید.



▲ **شکل ۴۳ـ۴: تفکیک متفاوتی از ساختار هالیدی.** خطاهای مورب و عمود نشان‌دهندهٔ یک پیوند فسفودی استر می‌باشند. رسم این فرآیندها به وسیلهٔ چرخش دیاگرام مولکول‌های زیری به اندازهٔ °۱۸۰ درجه بسیار ساده است که مولکول‌های بالا و پایین دارای رشته‌هایی با جهت‌گیری یکسانی می‌باشند. بریدن پیوندها، همان‌طور که در مرحلهٔ ❶ نشان داده شده است و اتصال انتهای آنها کروموزوم‌های اولیه را به وجود می‌آورد. برش رشته‌ها، همان‌طور که در مرحلهٔ ❷ نشان داده شده، و اتصال مجدد آنها کروموزوم‌های نوترکیب را به وجود می‌آورد. برای مشاهدهٔ انیمیشن سه‌بعدی از ساختار هالیدی و تفکیک آن به سایت http://engels.genetics.wisc.edu/Holliday/holliday3D.html رجوع کنید.

تیره) و به سمت مکملش در مولکول DNA شکسته شده می‌رود (قرمز تیره). بنابراین در ساختار DNA به آن شاخه گفته می‌شود. در این دیاگرام، خطوط مورب فقط یک پیوند فسفودی استری را نشان می‌دهند. مدل‌سازی مولکولی و مطالعات دیگر نشان می‌دهند که اولین باز در هر دو طرف شاخه، با یک مکمل جفت می‌شود. با مهاجرت این شاخه به سمت چپ، تعداد جفت بازها ثابت باقی می‌ماند؛ یک جفت باز جدید توسط رشتهٔ مهاجم (قرمز) پدید می‌آید و یک جفت باز در رشته مادری (آبی تیره) از دست می‌رود.

وقتی منطقهٔ هیبریداسیون به آن سوی انتهای ′۵ رشتهٔ شکسته (آبی روشن) می‌رود، این DNA مادری شکسته شده به‌طور فزاینده‌ای، تک رشته‌ای می‌شود، در حالی که مکمل آن یعنی رشتهٔ مهاجم (قرمز تیره) با رشتهٔ DNA هدف (صورتی) جفت می‌شود. سپس این رشتهٔ DNA مادری تک رشته (آبی روشن) با منطقهٔ مکمل در رشتهٔ دیگر مادری (آبی تیره) که آن هم در اثر حرکت شاخه به سمت چپ تک رشته‌ای شده، جفت می‌شود (شکل ۴۱ـ۴ مرحلهٔ ❹). ساختار حاصل شده، **ساختار هالیدی**[1] نامیده می‌شود. هالیدی نام دانشمندی است که اولین بار این ساختار را به عنوان ساختار حد واسط در نوترکیبی ژنتیکی مطرح کرد. خطوط مورب در مرحلهٔ ❹ یک پیوند فسفودی استری را نشان می‌دهد (نه یک قطعه DNA) وتمام بازها در ساختار هالیدی به صورت جفت شده با مکمل‌هایشان در رشته‌های مادری هستند. شکست پیوندهای فسفودی استری که از یک رشتهٔ مادری به سمت دیگر رشتهٔ مادری می‌گذرند، و اتصال انتهاهای ′۵ و ′۳ که در رشته‌های مادری یکسانی جفت شده‌اند (مراحل ❺ و ❻) موجب ایجاد ساختاری شبیه به چنگال همانندسازی می‌شود. اتصال مجدد پروتئین‌های چنگال همانندسازی موجب توسعهٔ رشتهٔ رهبر (پیشرو) تا قبل از نقطهٔ اصلی شکست DNA و آغاز مجدد سنتز رشتهٔ پیرو می‌شود (مرحلهٔ ❼) بنابراین یک چنگال همانندسازی مجدداً ایجاد می‌شود. تمام فرایند موجب می‌شود که رشتهٔ تخریب نشدهٔ بالایی در مولکول پائینی DNA، طی مرحلهٔ ❷ (صورتی / آبی روشن) حفظ شود و به عنوان یک الگو برای توسعهٔ رشتهٔ پیشرو (قرمز تیره) در مرحلهٔ ❼ عمل کند.

شکست در هر دو رشتهٔ DNA به وسیلهٔ نوترکیبی همولوگ تعمیر می‌شود: یک مکانیسم مشابه که نوترکیبی همولوگ نامیده می‌شود می‌تواند شکست دو رشته‌ای کروموزوم را تعمیر کند. هم‌چنین می‌تواند قطعات بزرگ دو مولکول DNA دو رشته‌ای را جابه‌جا کند (شکل ۴۲ـ۴). در نوترکیبی همولوگ نیز، اشغال شدن رشته به وسیلهٔ مولکول RecA در باکتری و Rad51 در یوکاریوت‌ها صورت می‌گیرد (مراحل ❶ و ❷). انتهای ′۳ رشتهٔ اشغال شده به وسیلهٔ یک DNA پلیمراز گسترش می‌یابد و رشتهٔ مادری را به عنوان یک حلقه تک رشته‌ای از DNA جابه‌جا می‌کند

1- Holliday structure

(آبی تیره، مرحلهٔ ❸). وقتی سنتز DNA به اندازهٔ کافی صورت می‌گیرد رشتهٔ والدی جابه‌جا شده که مکمل ناحیهٔ تک رشته‌ایی در انتهای ′۳ موجود در انتهای دیگر DNA شکسته (ناحیهٔ تک رشته‌ایی صورتی سمت چپ مرحلهٔ ❶) می‌باشد و با توالی مکمل صورت جفت باز می‌دهد (مرحلهٔ ❸). سپس این انتهای ′۳ (صورتی) به وسیلهٔ DNA پلیمراز گسترش می‌یابد که از یک حلقه تک رشته‌ایی قابل جابجایی والدی (آبی تیره) به عنوان الگو استفاده می‌کند (مرحلهٔ ❹).

در مرحلهٔ بعد انتهای ′۳ که به وسیلهٔ سنتز DNA ایجاد شده به انتهای ′۵ به وجود آمده در مرحلهٔ ❶ از طریق تجزیهٔ اگزونوکلئازی انتهای شکسته شده، پیوند می‌خورد (مرحلهٔ ❺). این فرایند دو ساختار هالیدی در مولکول‌های جفت شده به وجود می‌آورد (مرحلهٔ ❺). مهاجرت شاخهٔ ساختارهای هالیدی می‌تواند در هر دو جهت صورت گیرد (نشان داده نشده). در نهایت شکست در ناحیه‌ایی که با پیکان‌ها نشان داده شده است و اتصال انتهای ′۵ و ′۳ در هر یک از ساختارهای هالیدی بریده شده، دو کروموزوم نوترکیب تولید می‌کند که یکی دارای DNA از مولکول DNA والدی (رشته‌های صورتی و قرمز) در یک سمت از نقطهٔ شکست، و دیگری نیز دارای DNA از مولکول DNA والدی دیگر (آبی تیره و کم رنگ)، در سمت دیگر نقطهٔ شکست می‌باشند (مرحلهٔ ❻). هر یک از کروموزوم‌ها دارای یک ناحیهٔ سومی هستند که بلافاصله در نزدیکی نقطهٔ شکست ابتدایی قرار گرفته‌اند که این ناحیه یک دورشته‌ای ناجور (هترو دوپلکس) را تشکیل می‌دهد. در اینجا این ناحیه به شکلی است که یک رشته از یک والد با رشتهٔ مکمل از والد دیگر (رشته صورتی یا قرمز با رشتهٔ آبی پررنگ یا کم رنگ جفت شده است) جفت می‌شود. اشتباه در جفت شدن بازها بین دو رشتهٔ والدی معمولاً به وسیلهٔ مکانیسمی که در بالا بحث شد تعمیر می‌شود که در این مکانیسم یک جفت باز مکمل به وجود می‌آید. در این فرایند تفاوت‌های توالی موجود بین دو توالی مادری از بین می‌رود که از این فرایند به عنوان وارون‌سازی ژنی[1] یاد می‌شود.

دیاگرام‌های شکل ۴۳ـ۴ نحوه و چگونگی برش جفت رشته‌ها در محل برخورد و تلاقی آنها در ساختار هالیدی برای تولید یک مولکول نوترکیب یا مولکول والدی را نشان می‌دهد. این فرآیند را تفکیک ساختار هالیدی[2] می‌نامند که مولکول‌های DNAای که در ابتدا به وسیله RecA/Rad51 اشغال‌کنندهٔ رشته، به هم ملحق شده بودند را از یکدیگر جدا می‌کند. هر یک از ساختارهای هالیدی که در مرحلهٔ ❺ از شکل ۴۲ـ۴ نشان داده شده است می‌توانند بریده شده و به دو صورت که با پیکان نشان داده شده، دوباره به یکدیگر متصل شوند. در نتیجه چهار محصول می‌تواند از فرآیند نوترکیبی به وجود آید. دو تا از این محصولات تولید دوبارهٔ کورموزوم والدی است (به استثناء ناحیهٔ دورشته‌ای ناجور (هترو دوپلکس) در نقطهٔ شکست که برای توالی والدی مورد نیاز است (وارون‌سازی ژن) و دو محصول دیگر که در شکل ۴۲ـ۴ نشان داده شده است کروموزوم‌های نوترکیب را به وجود می‌آورند.

نوترکیبی میوزی: میوز شکل خاصی از تقسیم سلولی خاص در یوکاریوت‌ها می‌باشد که سلول‌های زایندهٔ هاپلوئید (به عنوان مثال تخمک و اسپرم)، از سلول دیپلوئید تولید می‌کند (شکل ۳۸ـ۲۰). حداقل یک نوترکیبی بین کروموزوم‌های همولوگ، مادری و پدری قبل از تقسیم میوز سلول صورت می‌گیرد. نوترکیبی به وسیلهٔ یک آنزیم آغاز می‌شود که یک شکست در هر دو رشتهٔ DNA یک کروموزوم ایجاد می‌کند. این آنزیم دارای جایگاه‌های متعددی بر روی یک کروموزوم می‌باشد. این فرآیند در شکل ۴۲ـ۴ رسم شده است. تمام فرآیند از برش DNA یک کروموزوم تا تفکیک ساختارهای هالیدی آنقدر تکرار می‌شود تا حداقل یک نوترکیبی، که کراسینگ‌آور هم نامیده می‌شود، بین یک جفت از کروموزوم‌های همولوگ به وجود آید. همان‌طور که در ابتدا اشاره شد اتصال بین کروموزوم‌های همولوگ برای جداسازی مناسب در طول تقسیم سلولی در مرحلهٔ اول میوز مورد نیاز است (فصل ۲۰). حاصل این فرایند این است که هر سلول زاینده دارای چندین کروموزوم نوترکیب می‌باشد که از بخش‌های بزرگ کروموزوم مادری یا کروموزوم پدری ساخته شده است.

نکات کلیدی بخش ۶-۴

تعمیر DNA و نوترکیبی

- تغییرات در توالی DNA ناشی از همانندسازی اشتباه و اثرات ترکیبات شیمیایی و فیزیکی مختلف است.
- بسیاری از اشتباهات که در هنگام همانندسازی DNA رخ می‌دهد توسط فرآیند غلط‌گیری تصحیح می‌شود. در این فرآیند DNA پلیمراز می‌تواند بازهای اشتباه (ناجورجفت شده) را در انتهای ′۳ زنجیرهٔ در حال رشد شناسایی کرده و توسط فعالیت ′۵ـ′۳ اگزونوکلئازی ذاتی خود آنها را بردارد (شکل ۳۴-۴ را ملاحظه کنید).

1- Gen Conversion

2- Resolution of holliday structure

■ سلول‌های یوکاریوتی سه سیستم ترمیم با برداشت برای تصحیح بازهای ناجور و برای برداشت دیمرهای تیمین - تیمین تحریک شده توسط UV یا ترکیبات شیمیایی از DNA دارند. ترمیم با برداشت باز، ترمیم عدم همخوانی و ترمیم با برداشت نوکلئوتید با صحت بالا خطاها را از میان برمی‌دارند.

■ ترمیم شکست‌های دورشته‌ای توسط اتصال انتهای غیرهمولوگ می‌تواند بخشهای DNA را از کروموزوم‌های مختلف متصل کند و ممکن است یک ترانسلوکاسیون انکوژنیک هم ایجاد کند. مکانیسم تعمیر حتی هنگامی که قسمتی از یک کروموزوم یکسان بهم متصل شوند نیز ممکن است حذف‌های کوچکی را ایجاد کند.

■ نقص‌های ارثی در مسیر ترمیمی ترمیم با برداشت نوکلئوتید مثل افراد مبتلا به گزردورماپیگمانتازوم منجر به سرطان پوست می‌شود. سرطان ارثی کولون نیز ناشی از جهشهای پروتئین‌های ضروری در مسیر ترمیم عدم ناهمخوانی است. نقص در ترمیم توسط نوترکیبی همولوگ همراه با جهش ارثی آلل ژن BRCA.1 یا BRCA-2 باعث ایجاد سرطان‌های سینه و رحم می‌گردد.

■ ترمیم خطای آزاد دورشته‌های شکسته شده در DNA توسط نوترکیبی همولوگ با استفاده از کروماتید خواهری آسیب‌دیده به عنوان مکمل صورت می‌گیرد. این فرآیند می‌تواند منجر به نوترکیبی کروموزوم‌های مادری گردیده و توسط یوکاریوتها در ایجاد تنوع ژنتیکی توسط نوترکیبی کروموزومهای والدی در رشد سلول‌های جنینی بکار گرفته شود.

۷-۴ ویروس‌ها: انگل‌های سیستم ژنتیکی سلول

ویروس‌ها انگل‌های داخل سلولی اجباری هستند. آنها به خودی خود توانایی تکثیر ندارند و باید از سیستم سلولی میزبان برای سنتز پروتئین‌های ویروسی و همانندسازی ژنوم خود استفاده کنند. ویروس‌های RNAایی که معمولاً در سیتوپلاسم سلول میزبان تکثیر می‌یابند یک ژنوم RNAایی دارند و ویروس‌های DNAایی که معمولاً در هستهٔ سلول همانندسازی می‌کنند ژنوم DNAایی دارند (شکل ۱-۴). ژنوم ویروسی ممکن است دو رشته‌ای یا تک رشته‌ای باشد که به نوع ویروس بستگی دارد. به تمام ذرهٔ ویروسی که توانایی آلوده‌کنندگی دارد **ویریون**[1] می‌گویند که از پوشش پروتئینی دربرگیرندهٔ اسیدنوکلئیک و پوشش پروتئینی خارجی تشکیل شده است که هر دو از نوکلئیک اسید ویروسی محافظت کرده و همچنین در عفونت‌زایی سلول میزبان نقش بازی می‌کنند. ویروس‌های ساده، DNA یا RNA کافی، تنها برای رمزدهی کردن چهار پروتئین را دارند و اکثر ویروس‌های پیچیده DNA و یا RNA کافی، برای رمزدهی کردن ۲۰۰ پروتئین را دارند. علاوه بر این‌که ویروس‌ها در آلوده‌سازی سلول‌ها نقش دارند همچنین استفادهٔ زیادی به عنوان ابزارهای تحقیقاتی در مطالعهٔ اساس فرایندهای بیولوژیکی که در فصل‌های قبل بحث شد نیز دارند.

اغلب ویروس‌ها میزبان‌های محدودی دارند

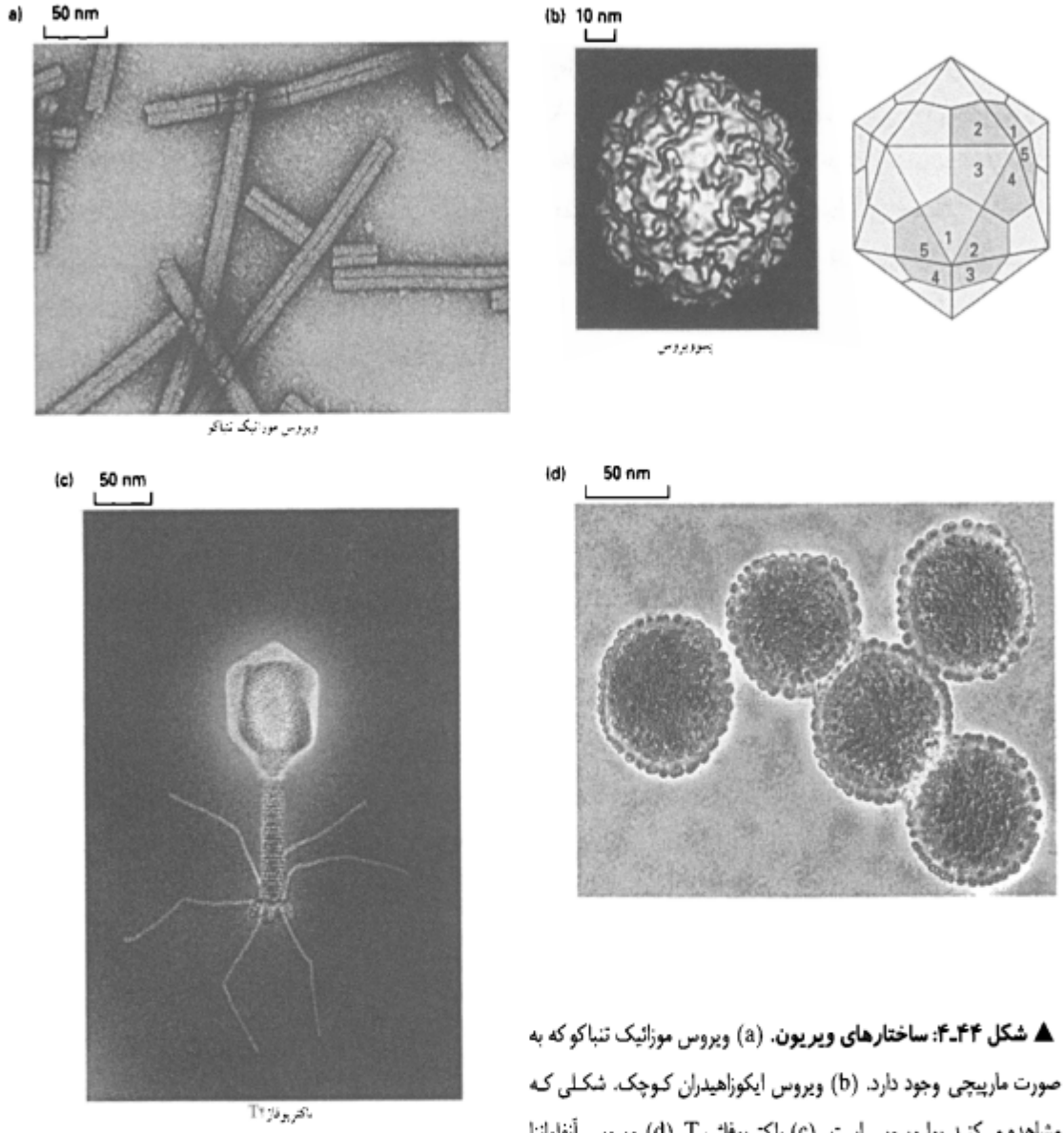
سطح ویریون‌ها دارای چندین کپی از یک نوع پروتئین می‌باشد که به‌طور اختصاصی به چندین کپی از گیرنده‌های سطح سلول میزبان متصل می‌شوند. این میانکنش تعیین‌کنندهٔ میزبان ویریون است که با گروهی از انواع سلول‌ها که ویروس می‌تواند آلوده کرده و فرآیندهای آلوده‌سازی را انجام دهد، مشخص می‌شود. اکثر ویروس‌ها یک سری از میزبان‌های محدود دارند.

ویروسی که تنها باکتری‌ها را آلوده می‌کند **باکتریوفاژ**، یا به طور خلاصه فاژ می‌نامند. ویروس‌هایی که سلول‌های حیوانی یا گیاهی را آلوده می‌کنند به عنوان ویروس‌های حیوانی یا ویروس‌های گیاهی یاد می‌شوند. تعدادی از ویروس‌ها هم در سلول حیوانی و هم در سلول گیاهی و هم در حشراتی که ویروس‌ها از آنها تغذیه می‌کنند، یافت می‌شوند. حشراتی که تحرک بالایی دارند به عنوان حاملی برای انتقال ویروس بین میزبان حیوانی و گیاهی می‌باشند. تعدادی از ویروس‌ها که تنها حیوانی می‌باشند، تعداد زیادی میزبان دارند، مانند ویروس وزیکولار دهان که در حشرات و انواع متفاوتی از پستانداران رشد می‌کند. اکثر ویروس‌های حیوانی که حتی در یک دسته هم قرار نمی‌گیرند (پولیوویروس‌ها) تنها گونه‌های نزدیک به هم مثل پریمات‌ها را آلوده می‌کنند. محدودهٔ سلول‌های میزبان بعضی از ویروس‌های حیوانی تنها تعدادی از سلول‌های متفاوت می‌باشد چرا که فقط این سلول‌ها، گیرنده‌های سطحی مناسب برای اتصال ویروس را دارا می‌باشند.

کپسید ویروس‌ها آرایش منظمی از یک یا چندین نوع پروتئین می‌باشند

اسید نوکلئیک ویریون درون یک پوشش پروتئینی، یا کپسید،

1- Virion



▲ **شکل ۴۴-۴: ساختارهای ویریون.** (a) ویروس موزائیک تنباکو که به صورت مارپیچی وجود دارد. (b) ویروس ایکوزاهیدران کوچک. شکلی که مشاهده می‌کنید پولیویروس است. (c) باکتریوفاژ T_4. (d) ویروس آنفلوانزا که یکی از ویروس‌های دارای پوشش است.

قرار گرفته است. این کپسید از چندین کپی از یک یا چندین نوع پروتئین متفاوت تشکیل شده است که یکی از این پروتئین‌ها تنها به وسیلهٔ یک ژن رمزدهی می‌شوند. به همین دلیل هم یک ویروس می‌تواند تمام پروتئین مورد نیاز برای کپسید بزرگ خود را تنها به وسیلهٔ تعدادی ژنِ محدود رمزدهی کند. این استفادهٔ مؤثر از اطلاعات ژنتیکی بسیار با اهمیت است، چراکه تنها مقدار محدودی از DNA و

و ژنوم ویروسی به صورت نوکلئوکپسید وجود دارد. در بعضی ویروس‌ها چندین کپی از یک نوع پروتئین پوششی وجود دارد که یک ساختار هلیکال را به وجود می‌آورند که DNA یا RNA ویروسی در بر گرفته و آن را محافظت می‌کند. در این ساختار شیارها مارپیچی در تونل پروتئینی به وجود می‌آید که RNA یا DNA آن قرار می‌گیرد. ویروس‌هایی با این چنین نوکلئوکپسید هلیکال م

طول مراحل آلوده‌سازی، برخی از ویروس‌های ایکوزاهیدران با گیرنده‌های سطح سلول از طریق شکاف بین زیر واحدهای کپسید میانکنش می‌دهد. برخی دیگر از طریق فیبرهای پروتئینی طویلی که از نوکلئوکپسید بیرون زده، با گیرنده‌های سطح سلول میانکنش می‌دهند. در خیلی از باکتریوفاژهای DNAدار، DNA ویروسی در درون سر ایکوزاهیدران قرار گرفته است و این سر به دم میله‌ای شکل متصل است. در طول مرحلهٔ آلوده‌سازی، پروتئین‌های ویروسی در نوک دُم به گیرنده‌های سلول میزبان متصل می‌شوند. سپس DNA ویروسی از طریق دُم وارد سیتوپلاسم سلول میزبان می‌شوند (شکل c ۴ـ۴۴). در بعضی از ویروس‌ها، نوکلئوکپسیدی که متقارن می‌باشد به وسیلهٔ یک غشاء بیرونی که **پوشش**[1] می‌نامند پوشیده می‌شود. این غشاء بیرونی عمدتاً از فسفولیپید دو لایه که دارای یک یا دو نوع گلیکوپروتئین پوششی از نوع ویروسی می‌باشد تشکیل شده است (شکل d ۴ـ۴۴). فسفولیپیدها در پوشش ویروسی مشابه فسفولیپیدهای موجود در غشاء پلاسمایی سلول میزبان آلوده شده می‌باشد. پوشش ویروسی در حقیقت از جوانه زدن غشاء سلول میزبان به وجود می‌آید اما در پوشش ویروسی همان‌طور که به‌طور مختصر اشاره شد گلیکوپروتئین‌های ویروسی نیز وجود دارند.

ویروس‌ها می‌توانند کلون شده و در سنجش پلاک شمارش شوند

تعداد ذرات ویروسی که یک نمونه را آلوده می‌کنند می‌توانند به وسیلهٔ **سنجش پلاک**[2] شمارش شوند. این سنجش به وسیلهٔ کشت دادن یک نمونهٔ رقیق شده از ذرات ویروسی روی ظرفی که روی آن را سلول‌های میزبان پوشانده‌اند صورت می‌گیرد. بعد از آلوده شدن سلول‌های میزبان در ظرف، تعدادی از نقاط که نشان‌دهندهٔ لیز شدن سلول‌های میزبان می‌باشد به وجود می‌آید. با شمارش این نقاط که پلاک نامیده می‌شوند به میزان آلوده شدن سلول‌ها پی برده می‌شود (شکل ۴ـ۴۵). در ابتدا هر جایی که یک ویریون تنها یک سلول را آلوده می‌سازد یک پلاک در ظرف کشت به وجود می‌آید. این ویروس در این سلولی که وارد شده، همانندسازی می‌کند و در آخر سلول را پاره کرده و تعداد زیادی ویریون جدید از سلول آزاد شده و سلول‌های همسایه را در ظرف کشت آلوده می‌کنند. بعد از چند چرخهٔ آلوده‌سازی، تعداد زیادی از سلول‌های میزبان پاره می‌شوند و یک ناحیه واضح و قابل مشاهده بنام پلاک در یک لایه از سلول‌هایی که آلوده نشده‌اند به وجود می‌آید.

از آنجایی که همهٔ ویریون‌های جدید در یک پلاک از یک ویروس مادری به وجود آمده‌اند پس یک **کلون**[3] ویروسی را به وجود می‌آورند. این نوع از سنجش پلاک به‌طور استاندارد برای ویروس‌های حیوانی و باکتریایی استفاده می‌شود. ویروس‌های گیاهی می‌توانند به‌طور مشابه با شمارش لیز شدن نقاط روی برگ‌های گیاه که به وسیلهٔ تلقیح ویروس‌ها ایجاد شده، سنجش شوند. بررسی جهش‌های ویروسی که معمولاً به وسیلهٔ سنجش پلاک شناخته‌می‌شوند به‌طور گسترده‌ای به فهم و شناخت فرآیندهای مولکولی سلول کمک می‌کند.

چرخه‌های لیتیک رشد ویروسی، منجر به مرگ سلول‌های میزبان می‌شود

هر چند جزئیات چرخه در بین انواع متفاوت ویروس‌ها مختلف است اما آنهایی که در رشد خود چرخهٔ لیتیک را نشان می‌دهند به طور کلی به صورت زیر می‌باشند.

۱ـ جذب ـ ویریون از طریق چندین پروتئین کپسید به گیرنده‌های سطح سلول متصل می‌شود.

۲ـ نفوذ ـ ژنوم ویروسی از غشاء پلاسمایی عبور می‌کند. در چندین ویروس، پروتئین‌های ویروسی که در درون کپسید وجود دارند نیز وارد سلول میزبان می‌شوند.

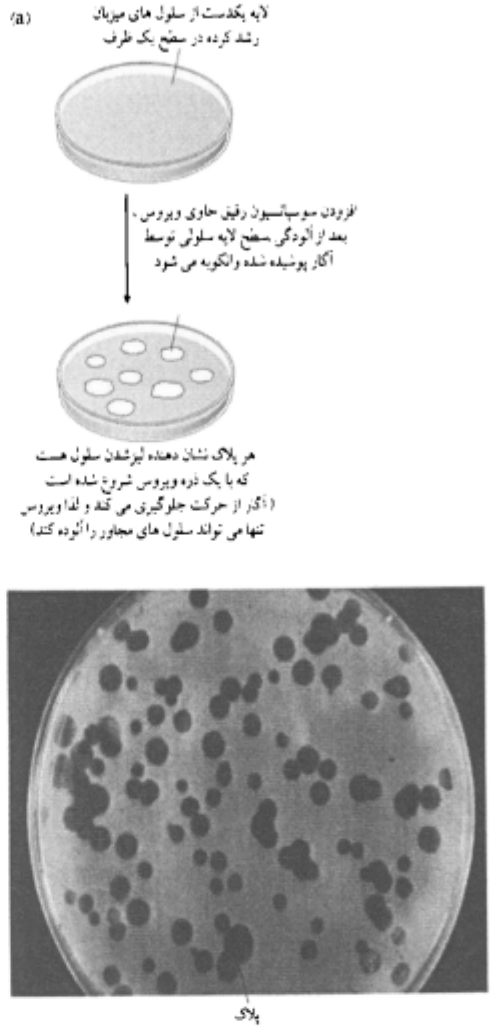
۳ـ همانندسازی ـ mRNAsهای ویروسی به کمک ماشین رونویسی سلول میزبان (ویروس‌های DNAدار) یا به وسیلهٔ آنزیم‌های ویروسی (ویروس‌های RNAدار) به وجود می‌آیند. برای هر دو نوع از ویروس‌ها، mRNAهای ویروسی توسط ماشین ترجمهٔ سلول، ترجمه می‌شوند. تولید چندین کُپی از ژنوم ویروس به تنهایی با پروتئین‌های ویروسی و یا باکمک پروتئین‌های سلول میزبان انجام می‌شود.

۴ـ تجمع ـ پروتئین‌های ویروسی و ژنوم‌های همانندسازی شده با یکدیگر ملحق می‌شوند تا ویریون‌های جدید را به وجود آورند.

۵ـ آزاد شدن ـ سلول‌های آلوده که ناگهان پاره شده (لیز) و ویریون‌های تازه تشکیل شده با هم خارج شوند و چه آن که ویریون‌های تازه شکل یافته به صورت تدریجی از سلول خارج شوند موجب مرگ سلول میزبان می‌شوند.

شکل ۴ـ۴۶ چرخه لیتیک باکتریوفاژ T_4 را نشان می‌دهد. باکتریوفاژ T_4 یک ویروس از نوع DNAدار بدون پوشش می‌باشد. در این

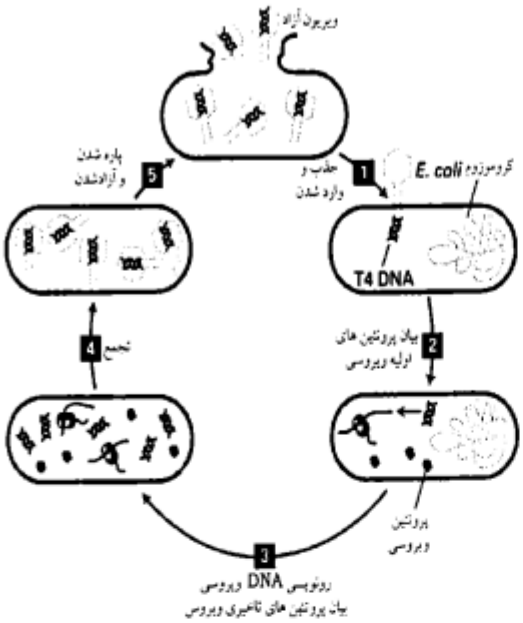
1- Envelope
2- Plaque assay
3- Clone



▲ **شکل تجربی ۴-۴۵: سنجش پلاک تعداد ذرات آلوده‌کننده در سوسپانسیون ویروسی را تعیین می‌کند.** (a) هر لیز شدن یا هر پلاک که آلوده‌سازی یک سلول توسط یک ویریون را نشان می‌دهد از یک کلون ویروسی تشکیل یافته است. (b) پلاک‌هایی که در محیط کشت حاوی باکتری سودوموناس فلوئورسانس به وسیلهٔ باکتریوفاژ $\phi S1$ ایجاد شده‌اند.

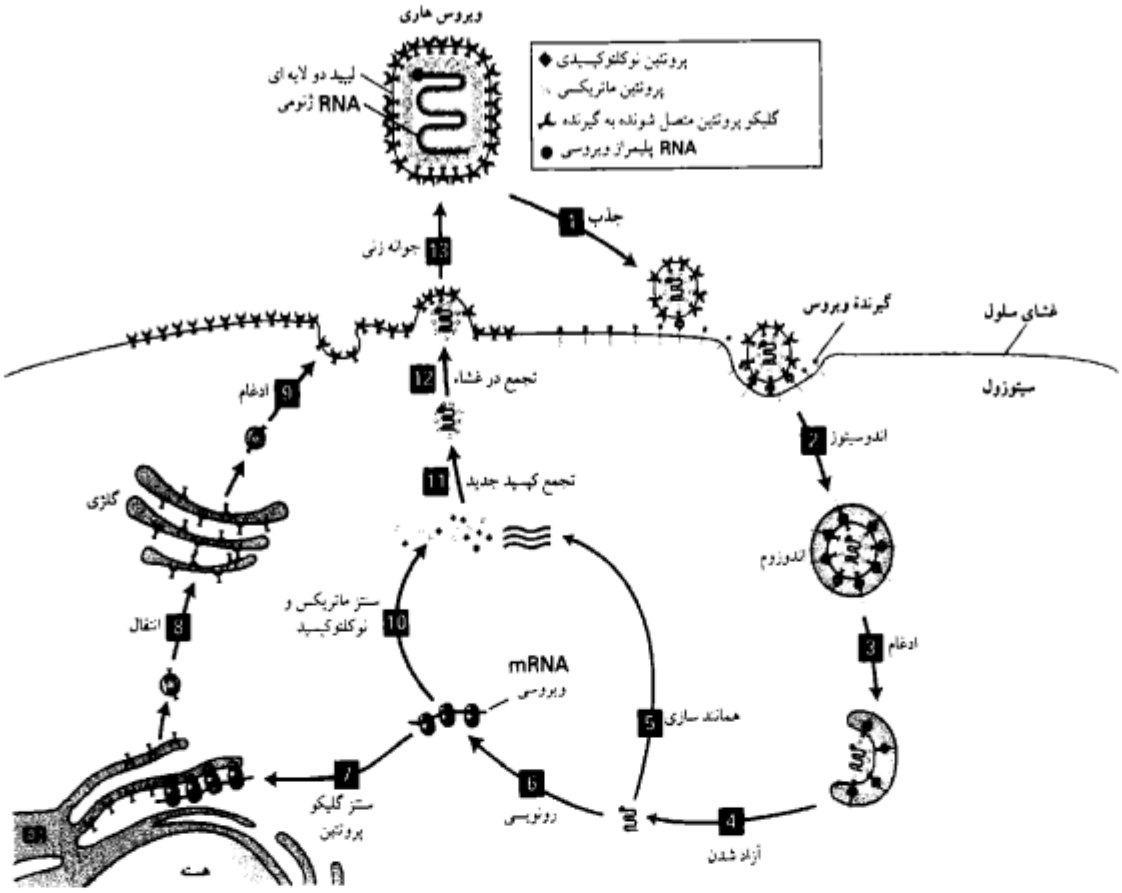
تصویر این ویروس یک باکتری E.coli را آلوده کرده است. به‌طور کلی پروتئین‌های کپسید به‌طور قابل توجهی تولید می‌شوند چرا که کپی‌های زیادی از آنها برای اجتماع هر ویریون جدید لازم است. در هر سلول آلوده شده به ویروس، حدود ۱۰۰ تا ۴۰۰ نسل از ویریون‌های T_4 تولید شده و پس از لیز شدن سلول رها می‌گردند.

چرخهٔ لیتیک برای ویروس‌های DNA داری که سلول‌های یوکاریوت را آلوده می‌کنند، تا حدودی، پیچیده‌تر است. در اکثر این ویروس‌ها ژنوم DNA از طریق برخی پروتئین‌های همراه به داخل هستهٔ سلول، نقل مکان می‌کند. داخل هسته، DNA ویروسی توسط ماشین رونویسی میزبان، رونویسی می‌شود. همچنین آنزیم‌های

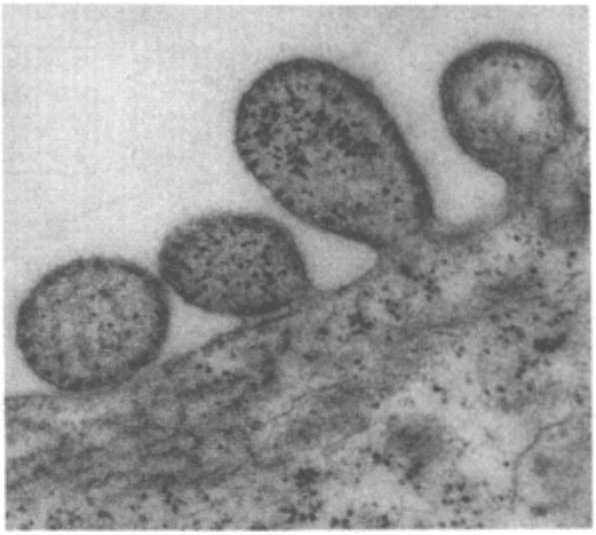


▲ **شکل ۴-۴۶: چرخه همانندسازی لیتیک ویروس باکتریایی بدون پوشش.** باکتریوفاژ T_4 باکتریوفاژ E.coli می‌باشد که دارای ژنوم دو رشته‌ای DNA بوده و فاقد پوشش غشایی است. بعد از آن که پروتئین‌های پوششی ویروس در نوک دم موجود در T_4 با پروتئین‌های گیرنده در سطح سلول میزبان میانکنش می‌دهد ژنوم ویروس به درون سلول میزبان تزریق می‌شود (مرحلهٔ ❶). آنزیم‌های سلول میزبان ژن‌های اولیه ویروس را رونویسی می‌کنند که mRNA تولید شده به پروتئین‌های اولیهٔ ویروسی ترجمه می‌شوند (مرحلهٔ ❷). پروتئین‌های اولیه، DNA ویروسی را همانندسازی کرده و موجب بیان پروتئین‌های تأخیری ویروس به وسیلهٔ آنزیم‌های سلول میزبان می‌شود (مرحلهٔ ❸). پروتئین‌های تأخیری ویروس شامل کپسید، پروتئین‌های تجمعی و آنزیم‌هایی که DNA سلول میزبان را تخریب می‌کنند تا نوکلئوتیدهای لازم را جهت سنتز DNA ویروسی فراهم نمایند. ویریون‌های جدید در درون سلول اجتماع می‌یابند (مرحلهٔ ❹) و هنگامی که پروتئین‌های ویروسی سلول را لیز کردند رها می‌گردند (مرحلهٔ ❺) ویروس‌های تازه آزاد شده چرخهٔ دیگری را به وسیلهٔ آلوده کردن سلول‌های میزبان دیگر شروع می‌کنند.

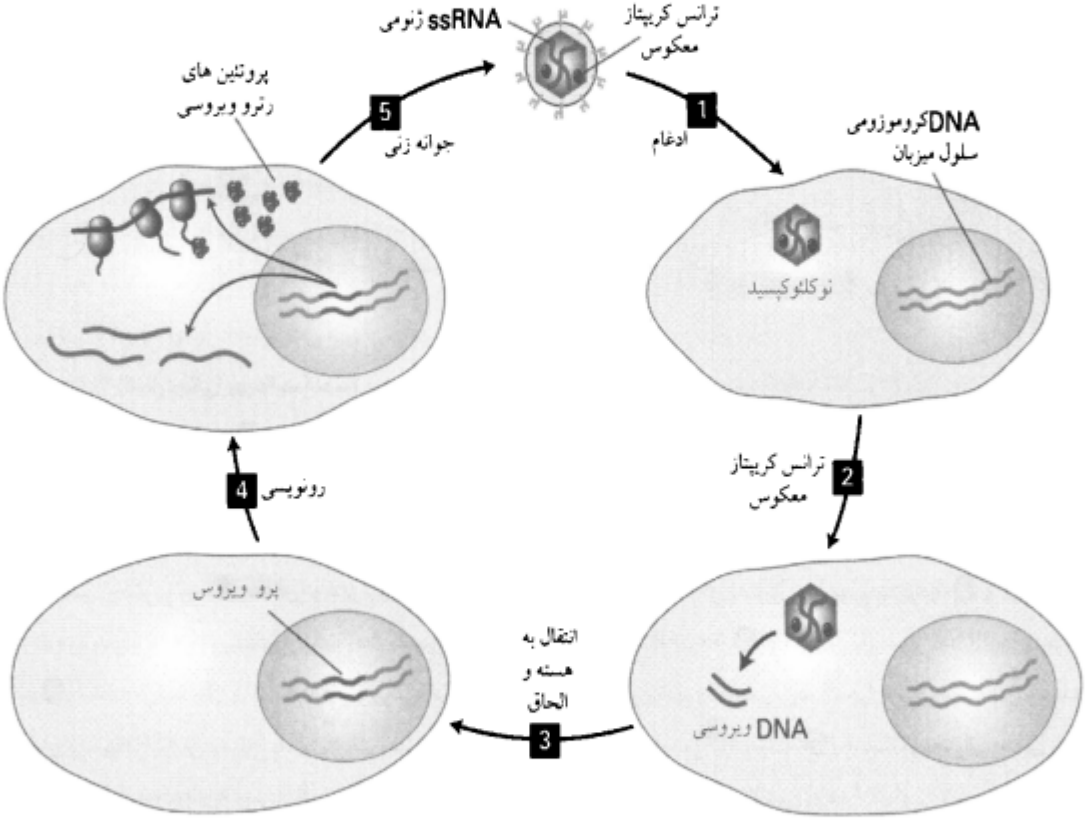
میزبان، RNA اولیهٔ ویروسی را پردازش می‌کنند و mRNA ویروسی حاصل می‌شود که به سیتوپلاسم منتقل شده و توسط ریبوزوم‌ها و عوامل ترجمهٔ میزبان، به پروتئین ویروسی ترجمه می‌شود. سپس پروتئین‌های ویروسی به هسته باز می‌گردند و در آنجا خودشان مستقیماً DNA ویروسی را همانندسازی می‌کنند و یا اینکه ماشین همانندسازی سلول را به سمت همانندسازی DNA



▲ **شکل ۴-۴۷: (شکل رنگی) چرخهٔ همانندسازی لیتیک یک ویروس جانوری پوشش‌دار.** ویروس Rabies یک ویروس پوشش‌دار است و یک ژنوم RNA تک رشته‌ای دارد. اجزای ساختاری این ویروس در بالای شکل نشان داده شده است. بعد از این‌که یک ویریون به چندین کپی از یک پروتئین غشایی خاص در سطح سلول میزبان جذب شد (مرحلهٔ ❶)، سلول آن را به صورت یک اندوزوم در بر می‌گیرد (مرحلهٔ ❷). یک پروتئین سلولی در غشای اندوزوم یون‌های H^+ را از سیتوزول به داخل اندوزوم پمپ می‌کند. کاهش pH در اندوزوم موجب تغییر ساختمان فضایی گلیکو پروتئین ویروسی می‌شود. در نتیجهٔ این تغییر، پوشش ویروسی در غشای دو لایهٔ لیپیدی اندوزوم ادغام شده و نوکلئوکپسید به داخل سیتوزول رها می‌گردد (مرحلهٔ ❸ و ❹). RNA پلیمرازهای ویروسی از ریبونوکلئوزیدهای تری‌فسفاته در سیتوزول برای همانندسازی ژنوم RNA (مرحلهٔ ❺) و همچنین برای سنتز mRNAهای ویروسی (مرحلهٔ ❻) استفاده می‌کنند. یکی از mRNAهای ویروسی، گلیکو پروتئین داخل غشایی ویروسی را رمزدهی می‌کند که چون توسط ریبوزوم‌های چسبیده به شبکهٔ آندوپلاسمی (ER) ترجمه می‌شود، این پروتئین در داخل غشای شبکهٔ آندوپلاسمی قرار می‌گیرد (مرحلهٔ ❼). قسمت کربوهیدراتی به دُمین بزرگ این پروتئین در داخل شبکه آندوپلاسمی اضافه می‌گردد و بعد در حین عبور این بخش از غشای شبکه آندوپلاسمی به همراه گلیکو پروتئین، از دستگاه گلژی، تغییرات دیگری نیز بر روی آن اتفاق می‌افتد (مرحلهٔ ❽). وزیکول‌های حاوی گلیکو پروتئین بالغ در غشای پلاسمایی میزبان ادغام می‌شود و گلیکو پروتئین در سطح سلول واقع می‌شود، به نحوی که دُمین بزرگ آن به سمت خارج سلول قرار می‌گیرد (مرحلهٔ ❾). ضمناً، بقیهٔ mRNAهای ویروسی در ریبوزوم‌های سلول میزبان ترجمه می‌شوند و پروتئین نوکلئوکپسیدی، پروتئین ماتریکس، و RNA پلیمراز ویروسی را ایجاد می‌کنند (مرحلهٔ ❿). این پروتئین‌ها با RNA ژنومی ویروس (قرمز روشن) تجمع یافته و نوکلئوکپسیدهای جدید را پدید می‌آورند (مرحلهٔ ⓫). سپس این نوکلئوکپسیدهای جدید با دُمین سیتوزولی گلیکو پروتئین‌های ویروسی همراه می‌شوند (مرحلهٔ ⓬). غشای پلاسمایی دور تا دور نوکلئوکپسید را می‌گیرد و «جوانه» را پدید می‌آورد که سپس این جوانه رها می‌گردد (مرحلهٔ ⓭).



▶ **شکل ۴۸ـ۴: ویریون‌های تولید شده توسط جوانه زدن رها می‌گردند.** ویریون‌های جدیداً تولید شدهٔ ویروس‌های پوشش‌دار از طریق جوانه زدن از سلول‌های آلوده رها می‌شوند. در این تصور میکروسکوپ الکترونی (TEM) از یک سلول آلوده شده به ویروس measles، ویریون‌های جوانه زده به وضوح مشخص‌اند که از سلول بیرون زده‌اند. ویروس measles، ویروس RNAدار و پوشش‌داری است که یک نوکلئوکپسید مارپیچی دارد (همانند ویروس rabies) و تکثیر آن همانند آن چیزی است که در شکل ۴ـ۴۷ نشان داده شده است.



▲ **شکل ۴۹ـ۴: (شکل رنگی) چرخهٔ سلولی رتروویروس.** ژنوم رتروویروس‌ها به صورت دو مولکول تک رشته‌ای یکسان RNA است. این ویروس‌ها پوشش دارند. مرحلهٔ ❶: پس از اینکه گلیکوپروتئین‌های پوشش ویروس با یک پروتئین خاص غشایی میزبان میانکنش داد. پوشش رتروویروسی مستقیماً با غشای سلول میزبان ادغام شده و در نتیجه نوکلئوکپسید به سیتوپلاسم وارد می‌گردد. مرحلهٔ ❷: ترانس کریپتاز معکوس ویروسی و دیگر پروتئین‌ها، ژنوم RNA تک رشته‌ای ویروس را به یک DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌کنند. مرحلهٔ ❸: DNA دو رشته‌ای ویروسی به هسته نقل مکان می‌کند و به یکی از چندین نقطهٔ ممکن در کروموزوم سلول میزبان داخل می‌شود. برای سهولت، فقط یک کروموزوم سلول میزبان نشان داده شده است. مرحلهٔ ❹: DNA ویروسی وارد شده به کروموزوم میزبان (پرو ویروس) توسط RNA پلیمراز سلول میزبان رونویسی شده و mRNAها (قرمز تیره) و RNAهای ژنومی (قرمز روشن) تولید می‌کند. ماشین سلول میزبان mRNAهای ویروسی را به گلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های نوکلئوکپسید ترجمه می‌کند. مرحلهٔ ❺: ویریون‌های جدید اجتماع می‌یابند و از طریق جوانه‌زنی از سلول رها می‌شوند (که در شکل ۴-۴۷ نشان داده شده است).

ویروسی جهت‌دهی می‌کنند، همانند ویروس SV40 که قبلاً مورد بحث قرار گرفت. در هسته، تجمع پروتئین‌های کپسیدی با DNA ویروسی همانندسازی شده اتفاق می‌افتد و هزاران تا چند صد هزار نسل ویریونی حاصل می‌گردد.

اکثر ویروس‌های گیاهی و جانوری که ژنوم RNAای دارند، نیازی به عملکردهای هسته‌ای برای همانندسازی لیتیک ندارند. در برخی از این ویروس‌ها، یک آنزیم رمز شده توسط ویروس که در حین نفوذ ویروس به سلول وارد می‌شود، RNA ژنومی را در سیتوپلاسم به mRNAهایی رونویسی می‌کند. این mRNAها مستقیماً توسط ماشین ترجمهٔ میزبان به پروتئین تبدیل می‌شوند. سپس یک یا چند پروتئین از این پروتین‌ها چندین کپی دیگر از ژنوم RNA ویروسی تولید می‌کند. نهایتاً، ژنوم‌های تولید شده با پروتئین‌های کپسیدی تازه ساخته شده تجمع یافته و ویریون‌های جدیدی را در سیتوپلاسم پدید می‌آورند.

پس از این‌که ساخته شدن هزاران تا صدها هزار ویریون جدید صورت گرفت، اکثر باکتری‌های آلوده شده و برخی سلول‌های گیاهی و جانوری آلوده شده لیز شده و ویریون‌ها رها می‌شوند. البته بروز این اتفاق به نوع میزبان و یا نوع ویروس بستگی دارد. اما در بسیاری از عفونت‌های ویروسی سلول‌های گیاهی و جانوری پدیدهٔ لیز به‌طور مجزا اتفاق نمی‌افتد بلکه سلول میزبانی که مرده، تدریجاً متلاشی شده و ویریون‌ها را رها می‌سازد.

همان‌طور که قبلاً بیان شد، ویروس‌های حیوانی پوشش‌دار، توسط یک لایهٔ فسفولیپیدی خارجی پوشیده شده‌اند که این پوشش، از غشای پلاسمایی سلول میزبان منشأ گرفته است و حاوی مقداری زیادی از گلیکو پروتئین‌های ویروسی هم می‌باشد. فرایند جذب و رهاسازی ویروس‌های پوشش‌دار اساساً با ویروس‌های بدون پوشش متفاوت است. برای توضیح همانندسازی لیتیک ویروس‌های پوشش‌دار، ویروس rabies را مورد بررسی قرار می‌دهیم که نوکلئوکپسید آن از یک ژنوم RNA تک رشته‌ای که توسط چندین کپی از پروتئین نوکلئوکپسید پوشیده شده، تشکیل شده است. ویریون‌های rabies نیز همانند اکثر RNA ویروس‌های دیگر، در سیتوپلاسم همانندسازی می‌کنند و نیازی به آنزیم‌های هسته‌ای میزبان ندارند. همان‌طور که در شکل ۴ـ۴۷ نشان داده شده یک ویریون rabies از طریق اتصال به یک رسپتور خاص سطح سلولی به سلول میزبان جذب شده و بعد از طریق اندوسیتوز به سلول وارد می‌گردد. ویروس‌های تولید شده از طریق جوانه زدن از سلول میزبان رها می‌شوند. ویریون‌هایی که جوانه می‌زنند به وضوح توسط میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده هستند (شکل ۴ـ۴۸). ده‌ها هزار از ویریون‌های تولید شده قبل از آن که سلول بمیرد از سلول میزبان جوانه می‌زنند.

در برخی چرخه‌های رشد غیرلیتیک، DNA ویروسی به داخل ژنوم سلول میزبان وارد می‌شود

برخی ویروس‌های باکتریایی که به آنها فاژهای ملایم[1] گفته می‌شود، می‌توانند با میزبان خود، ارتباط غیرلیتیک برقرار کنند و آنها را نکشند. به عنوان مثال وقتی باکتریوفاژ، E.coli را آلوده می‌کند، DNA ویروسی به جای آن که خودش همانندسازی شود و تکثیر یابد می‌تواند وارد کروموزوم میزبان شود. DNA ویروسی وارد شده به ژنوم میزبان که پروفاژ نامیده می‌شود به عنوان بخشی از DNA میزبان همانندسازی می‌شود و از یک نسل سلول به نسل بعدی منتقل می‌گردد. به این پدیده **لیزوژنی**[2] گفته می‌شود. تحت شرایط خاصی، DNA پروفاژ فعال می‌شود و از کروموزوم میزبان جدا شده و وارد چرخهٔ لیتیک می‌گردد. در نتیجه ویریون‌های جدید تولید و رها می‌شوند. ژنوم تعدادی از ویروس‌های جانوری نیز می‌توانند به ژنوم سلول میزبان وارد گردند. یکی از مهم‌ترین این ویروس‌ها، رتروویروس‌ها هستند. این ویروس‌ها پوشش دارند و ژنوم آنها دو رشتهٔ یکسان RNA است. این ویروس‌ها را به این دلیل رتروویروس نامیده‌اند که ژنوم RNA آنها برای ایجاد یک مولکول DNA به عنوان الگو عمل می‌کند که این فرایند معکوس انتقال اطلاعات ژنتیکی، یعنی رونویسی RNA به DNA است.

در چرخهٔ زندگی رتروویروس (شکل ۴ـ۴۹) یک آنزیم ویروسی که **ترانس کریپتاز معکوس** نامیده می‌شود، در ابتدا از ژنوم RNA ویروس یک رشتهٔ DNA مکمل RNA ویروسی می‌سازد، سپس همین آنزیم، مکمل این رشتهٔ DNA را هم می‌سازد. (این واکنش پیچیده در فصل ۶ در مبحث انگل‌هایی به نام **رتروترانس پوزون‌ها** با جزئیات مورد بررسی قرار خواهد گرفت). DNA دو رشته‌ای حاصل، به درون کروموزوم میزبان وارد می‌شود. نهایتاً، DNA وارد شده که **پرروویروس** نامیده می‌شود توسط ماشین رونویسی سلول‌های میزبان، رونویسی می‌گردد که این RNA یا به پروتئین‌های ویروسی ترجمه می‌شود و یا داخل پروتئین‌های پوششی ویروس بسته‌بندی شده و از طریق جوانه زدن از سلول میزبان رها می‌گردد. چون اکثر رتروویروس‌ها میزبان خود را نمی‌کشند، سلول‌های آلوده می‌توانند تکثیر شده و سلول‌های دختری

1- Temperate phages 2- Lysogeny

با DNA حاوی پروویروس تولید کنند. این سلول‌های دختری نیز DNA پروویروسی را رونویسی می‌کنند و نسل‌های جدیدی از ویروس‌ها از سلول جوانه می‌زنند.

برخی رتروویروس‌ها حاوی ژن‌های مولد سرطان (**انکوژن‌ها**) هستند و سلول‌هایی که با چنین رتروویروس‌هایی آلوده شوند به سلول‌های توموری تبدیل می‌گردند. مطالعات راجع به رتروویروس‌های سرطان‌زا (اکثراً ویروس‌های پرندگان و موش) مطالب زیادی در مورد فرآیندهایی که منجر به تبدیل سلول طبیعی به سلول سرطانی می‌شوند به وجود آورده است (فصل ۲۵).

در بین رتروویروس‌های شناخته شدهٔ انسانی، ویروس لنفوسیت T انسانی (HTLV) نوعی از لوسمی (سرطان خون) را ایجاد می‌کند و ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) را ایجاد می‌کند. هر دو ویروس فقط می‌توانند نوع خاصی از سلول‌های سیستم ایمنی را آلوده کنند. ویروس HIV می‌تواند برخی نورون‌های سیستم عصبی مرکزی و سلول‌های گلیال را نیز آلوده کند. فقط این سلول‌ها دارای گیرنده سطحی هستند که می‌توانند با پروتئین‌های پوشش ویروسی میانکنش دهند، به همین دلیل فقط این سلول‌ها میزبان این ویروس‌ها هستند. بر خلاف اکثر رتروویروس‌های دیگر، ویروس HIV در نهایت سلول‌های میزبان خود را می‌کشد. مرگ تعداد زیادی از سلول‌های سیستم ایمنی باعث ایجاد نقص در پاسخ ایمنی در بیماران مبتلا به AIDS می‌شود.

برخی ویروس‌های DNAدار نیز می‌توانند به کروموزوم‌های سلول میزبان وارد شوند. یک مثال، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) است که عموماً زگیل و دیگر نقص‌های خوش‌خیم پوستی را ایجاد می‌کند. ژنوم سروتیپ‌های خاصی از HPV به کروموزوم سلول‌های اپی‌تلیال دهانهٔ رحم وارد شده و موجب پدید آمدن سرطان دهانهٔ رحم می‌شود. تست پاپ اسمیر می‌تواند سلول‌هایی را که در مراحل اولیهٔ فرایند سرطانی شدن توسط HPV هستند، شناسایی کرده و به این ترتیب تدابیری جهت درمان مؤثر فراهم می‌آورد.

نکات کلیدی بخش ۷-۴

ویروس‌ها، انگلهای سیستم ژنتیکی سلول

- ویروس‌ها انگل‌های کوچکی هستند که می‌توانند فقط در سلول‌های میزبان همانندسازی کنند. ژنوم ویروس‌ها ممکن است DNA (ویروس‌های DNA دار) یا RNA (ویروس‌های RNA دار) وبه صورت یک یا دورشته‌ای باشد.
- کپسید که ژنوم ویروس را می‌پوشاند ازچندین کپی از یک یا تعداد کمی از پروتئین‌های کدشده توسط ویروس تشکیل شده است. بعضی ویروس‌ها یک پوشش بیرونی هم دارند که شبیه به غشای پلاسمایی بوده ولی حاوی پروتئین‌های گذار غشایی ویروس است.
- بسیاری از ویروس‌های DNAدار گیاهان و حیوان به آنزیمهای هسته‌ای سلول میزبان نیاز دارند تا بتوانند رونویسی از ژنوم ویروسی را به صورت mRNA و تولید ژنومهای توانمند انجام دهند. برخلاف این بسیاری از ویروس‌های RNA دار آنزیمهایی راکد می‌کنند که می‌توانند ژنوم RNA را به mRNA ویروسی رونویسی کرده وکپی‌های جدیدی از ژنوم RNAای را تولید کنند.
- ریبوزوم‌های سلول میزبان، tRNAها وعوامل رونویسی، درسنتز تمام پروتئین‌های ویروسی در یک سلول‌های آلوده شده استفاده می‌شوند.
- عفونت لیتیک ویروسی شامل جذب، نفوذ، سنتز پروتئین‌های ویروسی و ژنوم (همانندسازی)، همایش ویریونهای جدید و آزادی صدها یا هزاران ویروس می‌باشد که منجر به مرگ سلول میزبان می‌شود (شکل ۴۶-۴ را ملاحظه کنید). آزادی ویروس‌های پوشش‌دار بوسیله جوانه‌زدن غشای سلول میزبان صورت می‌گیرد (شکل ۴۷-۴ را ملاحظه کنید).
- عفونت غیرلیتیک زمانی روی می‌دهد که ژنوم ویروسی به داخل DNA سلول میزبان وارد شده و در حالت کلی باعث مرگ سلولی نشود.
- رتروویروس‌ها ویروس‌های حیوانی پوشش دار هستند که حاوی ژنوم RNA تک‌رشته‌ای می‌باشند. بعد از ورود به سلول میزبان، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (آنزیم موجود در ویروس) ژنوم RNA ویروسی را به DNA دورشته‌ای تبدیل می‌کند که آن هم وارد DNA کروموزومی می‌شود (شکل ۴۹-۴ را ملاحظه کنید).
- برخلاف عفونت توسط سایر رتروویروس‌ها، عفونت با HIV به سرعت سلول‌ها را می‌کشد و باعث نقایص شدیدی در ویژگیهای سیستم ایمنی در AIDS می‌شود.
- ویروس‌های توموری که حاوی انکوژن‌ها هستند ممکن است دارای ژنوم RNAدار (مثل ویروسی لنفوتروفیک T سلول انسانی) یا ژنوم DNA دار (مثل پاپیلوماویروس

انسانی) باشند. در مورد این ویروس‌ها، ورود ژنوم ویروس به کروموزوم سلول میزبان می‌تواند سبب تبدیل سلول طبیعی به سلول توموری شود.

چشم‌اندازی به آینده

در این فصل ما ابتدا ساختار پایه‌ای DNA و RNA را مرور کردیم و سپس جنبه‌های اساسی رونویسی DNA توسط RNA پلیمرازها را بحث کردیم. RNA پلیمرازها، همچنین فاکتورهایی که برای شروع رونویسی در یوکاریوت‌ها لازم‌اند و نیز میانکنش‌های میان عوامل تنظیمی رونویسی که آغاز رونویسی را هم در سلول‌های باکتریایی و هم در سلول‌های یوکاریوتی کنترل می‌کنند با جزئیات بیشتری در فصل ۷ بررسی شده‌اند، سپس دربارهٔ رمز ژنتیکی و همکاری tRNA و ماشین سنتز پروتئین، یعنی ریبوزوم، در رمزگشایی اطلاعات mRNA، جهت صحت سنتز زنجیرهٔ پروتئینی بحث کردیم. مکانیسم‌هایی که سنتز پروتئین را تنظیم می‌کنند بعداً در فصل ۸ مورد بحث قرار خواهند گرفت. سپس جزئیات مولکولی صحت همانندسازی DNA که برای تقسیم سلولی لازم است. مورد توجه قرار گرفت. فصل ۲۰ در مورد مکانیسم‌های تنظیم همانندسازی DNA و هماهنگ کردن آن با فرآیند پیچیده میتوز، که DNAهای دختری را به‌طور مساوی به هر سلول دختری منتقل می‌کند صحبت می‌نماید. قسمت بعدی، مکانیسم‌های ترمیم DNA که شامل مکانیسم‌های نوترکیبی نیز می‌شود را مورد بحث قرار داد. مکانیسم‌های نوترکیبی، باعث ایجاد تنوع ژنتیکی در افراد یک گونه می‌شود. نوترکیبی ژنتیکی منجر به تنوع صفات می‌شود که این صفات در معرض انتخاب طبیعی، طی تکامل همزمان گونه‌ها، قرار می‌گیرند. در فصل ۲۰ مکانیسم‌هایی که کروموزوم‌ها را مجزا کرده و به سلول‌های زایندهٔ هاپلوئید انتقال می‌دهند مورد بحث قرار می‌گیرد. این فرآیند به نوترکیبی بین کروموزوم‌های مادری و پدری نیاز دارد. نهایتاً دربارهٔ ویروس‌ها صحبت کردیم، که انگل‌هایی برای سیستم ژنتیکی مولکولی سلول‌ها هستند و مدل‌های مناسبی برای مطالعهٔ جنبه‌های متعددی از زیست‌شناسی مولکولی سلول می‌باشند.

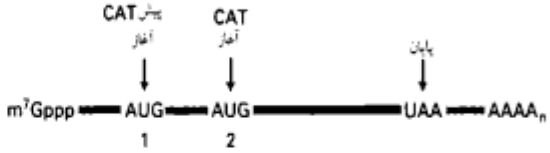
فرایندهای اساسی ژنتیک مولکولی، از مبنا تا زیست‌شناسی سلولی معاصر، در این فصل مورد بحث قرار گرفت. دانش اخیر ما دربارهٔ این فرایندها، بر مبنای نتایج تجربی با ارزشی به دست آمده و به نظر نمی‌رسد که تغییری در آنها ایجاد گردد. اما عمق دانش ما افزایش خواهد یافت، مثلاً در مورد جزئیات بیشتری از ساختارها و میانکنش‌های ماشین‌های ماکرومولکولی که در ارتباط هستند اما مورد بحث قرار نگرفتند. مشخص شدن ساختار سه‌بعدی RNA پلیمرازها، زیر واحدهای ریبوزوم و پروتئین‌های همانندسازی DNA، اخیراً به محققین اجازه داد تا با عمق بیشتری به مطالعهٔ چگونگی عملکرد این ماکرومولکول‌ها بپردازند. دانش ما دربارهٔ جزئیات بیشتر، می‌تواند به طراحی داروهای جدیدتر و مؤثرتر برای درمان بیماری‌های انسانی، گیاهی و جانوری بینجامد. به عنوان مثال، شناخت جدید ما دربارهٔ ساختار ریبوزوم‌ها، منجر به شناخت مکانیسم‌هایی شده که از طریق آنها، آنتی‌بیوتیک‌ها سنتز پروتئین‌های باکتریایی را بدون این‌که ریبوزوم‌های پستانداران را تحت تأثیر قرار دهند، مهار می‌کنند. این دانش جدید می‌تواند به طراحی آنتی‌بیوتیک‌های مؤثرتر نیز کمک کند. همچنین، شناخت جزئیات مکانیسم‌های تنظیم رونویسی ژن‌های خاص انسانی می‌تواند منجر به استراتژی‌های حیات‌بخشی شود که می‌توانند پاسخ‌های ایمنی نامناسب را کاهش داده و یا از بین ببرند. این پاسخ‌های نامناسب موجب بروز MS و آرتریت، تقسیم مهارناپذیر منجر به سرطان سلول‌ها و دیگر فرآیندهای بیماری‌زا می‌شوند.

تحقیقات اخیر زیادی بر کشف این‌که چگونه مکانیسم‌های مولکولی ظرفیت تصمیم‌گیری و ویژگی‌های مخصوص به سلول می‌بخشد معطوف شده است. به همین دلیل چندین فصل آینده به دانش اخیر ما در ارتباط با اینکه چگونه این چنین میانکنش‌های رونویسی و سنتز پروتئین را در موجودات پر سلولی تنظیم می‌کنند، و چگونه این تنظیم‌ها به سلول ظرفیت اختصاصی شدن و تبدیل شدن به اندام‌های پیچیده می‌بخشد، می‌پردازند. بقیهٔ فصل‌ها در ارتباط با این هستند که چگونه میانکنش‌های پروتئین - پروتئین، اساس شکل‌گیری اندامک‌های اختصاصی در سلول‌ها را تشکیل می‌دهد، و چگونه شکل سلول و حرکت آن را مشخص می‌کنند. پیشرفت‌های سریعی در زیست‌شناسی مولکولی سلول در سال‌های اخیر صورت گرفته و این نشان می‌دهد که در آیندهٔ نه چندان دوری به چگونگی تنظیم عملکردهای اختصاصی سلول، شکل سلول، تحرک همراه با تکثیر تنظیم شدهٔ سلول و مرگ سلولی (آپوپتوز) که منجر به رشد ارگانیسم‌های پیچیده مثل گیاهان گلدار و انسان‌ها می‌گردد، پی خواهیم برد.

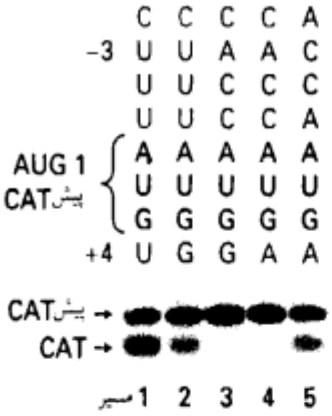
تجزیه و تحلیل داده‌ها

سنتز پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی، به‌طور طبیعی از کدون AUG در mRNA آغاز می‌شود. اما گاهی اوقات ریبوزوم، سنتز پروتئین را از اولین AUG آغاز نمی‌کند بلکه هنگام اسکن کردن

mRNA، آن را رد می‌کند و سنتز پروتئین از یک AUG در اواسط mRNA آغاز می‌گردد. برای دریافتن این‌که چه صفاتی از mRNA، آغاز پروتئین‌سازی از اولین AUG را تحت تأثیر قرار می‌دهند سنتز کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) مورد بررسی قرار گرفت. ترجمهٔ mRNA این آنزیم می‌تواند منجر به ایجاد پیش پروتئین CAT و یا یک پروتئین کوچک‌تر، یعنی CAT گردد. تفاوت این دو پروتئین در این است که CAT در انتهای آمین چند اسیدآمینه کمتر از پیش CAT دارد. CAT در اثر شکست پیش CAT ایجاد نمی‌شود بلکه در نتیجهٔ آغاز ترجمه از یک AUG داخلی پدید می‌آید:

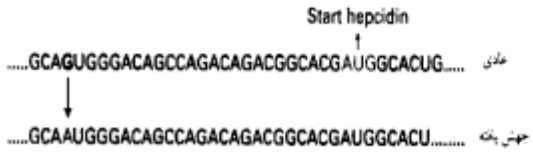


a) نتایج حاصل از تعدادی از مطالعات منجر به این نظریه شده که توالی (+4)ACC**AUGG**(-3) که حاوی کدون آغاز می‌باشد، یک زمینهٔ مطلوب برای آغاز سنتز پروتئین فراهم می‌کند و موجب می‌شود که ریبوزوم این AUG را رد نکند و ترجمه را از یک AUG در فرودست آن آغاز نکند. شماره‌گذاری این قطعهٔ نشان داده شده به این صورت است که A در AUG عدد ۱+ را دارد و بازهای سمت ′۵ این باز شماره‌های منفی و بازهای سمت ′۳ این باز شماره‌های مثبت را به خود اختصاص می‌دهند. برای اطمینان بر این نظریه که توالی ناحیهٔ آغازین (+4)ACC**AUGG**(-3) از آغاز ترجمه توسط ریبوزوم در نواحی دیگر جلوگیری می‌کند، توالی mRNA کلرامفنیکل استیل ترانسفراز را تغییر دادند و تأثیر آن را بر ترجمه بررسی کردند. در شکل زیر اطراف (قرمز) اولین کدون AUG (سیاه) که منجر به سنتز پیش CAT می‌شود در بالای ردیف ۳ نشان داده شده. تغییرات این mRNA در بالای ردیف‌های دیگر ژل نشان داده شده‌اند (نوکلئوتیدهای تغییر یافته به رنگ آبی هستند) و پروتئین‌های ایجاد شده از هر mRNA، باندهایی بر روی ژل SDS - پلی‌آکریل آمید پدید آورده‌اند که در پایین شکل نشان داده شده است. شدت هر باند نشان‌دهندهٔ میزان پروتئین سنتز شده است. تغییرات انجام گرفته بر روی توالی وحشی را آنالیز کنید و شرح دهید که چگونه این تغییرات، ترجمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. آیا موقعیت برخی از نوکلئوتیدها مهم‌تر از دیگران است؟ آیا اطلاعات نشان داده شده در این شکل این نظریه را که قطعهٔ حاوی نخستین AUG کارایی ترجمه از این قسمت را تحت تأثیر قرار می‌دهد، حمایت می‌کند یا خیر؟ آیا ACCAUGG یک زمینهٔ مطلوب برای آغاز است؟ (شکل رنگی)



b) چه تغییرات دیگری در این mRNA به جز آنچه در شکل نشان داده شد اتفاق می‌افتد که اهمیت توالی ACCAUGG را به عنوان زمینهٔ مطلوب برای سنتز پیش CAT به جای CAT بیان می‌کند؟ چگونه می‌توانید امتحان کنید که آیا A در موقعیت 3- و G در موقعیت 4+ مهم‌ترین نوکلئوتیدها برای فراهم کردن زمینهٔ AUG آغازین هستند؟

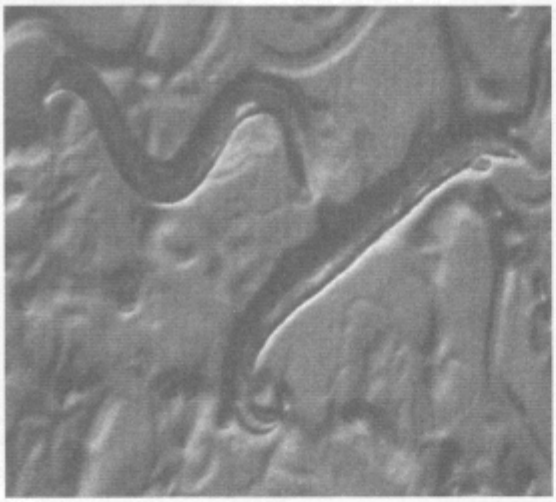
c) یک جهش که موجب پدید آمدن یک بیماری خونی شدید می‌شود در یک خانواده کشف شده است. این جهش با رنگ قرمز در شکل زیر نشان داده شده، که در ناحیهٔ غیرقابل ترجمه انتهای ′۵ ژن رمزهی کنندهٔ هپسیدین[1] واقع شده و نشان داده‌اند که mRNA این ژن را تغییر می‌دهد. نواحی سایه‌دار نشان‌دهندهٔ توالی رمزدهی کنندهٔ ژن‌های طبیعی و جهش یافته هستند. هپسیدین از mRNA تغییر یافته تولید نمی‌شود و کمبود هپسیدین موجب ایجاد آن بیماری می‌گردد. آیا می‌توانید یک توضیح خوب برای عدم سنتز هپسیدین در اعضای خانواده‌ای که این جهش را دارند بیان کنید؟ چه چیزی می‌توانید دربارهٔ اهمیت زمینهٔ حاوی کدون آغازین سنتز پروتئین در این مورد استنباط کنید؟



1- Hepcidin

فصل ۵

تکنیک‌های ژنتیک مولکولی



RNA مداخله گر (RNAi) می‌تواند برای خاموش کردن اغلب ژن‌ها در ژنوم کرم سی - الگانس استفاده شود. کرم ترانس ژنیک در طرف راست تصویر (توسط رنگ گزارشگر GFP در نورونهای سر، نشاندار شده است) RNA دورشته‌ای برای ژن ماهیچه‌ای unc-15 بیان می‌کند که نتیجه‌اش تجزیه قوی mRNA ژن unc-15 است و منجر به تکمیل کردن پارالیز (Paralysis) کرم می‌شود. برخلاف آن، کرم گونه وحشی در طرف چپ حرکت بدن سینوزوئیدی معمولی را نشان می‌دهد (Sinusoidal body).

رئوس مطالب

۵-۱. تجزیه و تحلیل ژنتیکی جهش‌ها به منظور شناسایی و مطالعه ژن‌ها

۵-۲. تعیین خصوصیت و کلون کردن DNA

۵-۳. استفاده از قطعات DNA کلون شده برای مطالعه بیان ژن

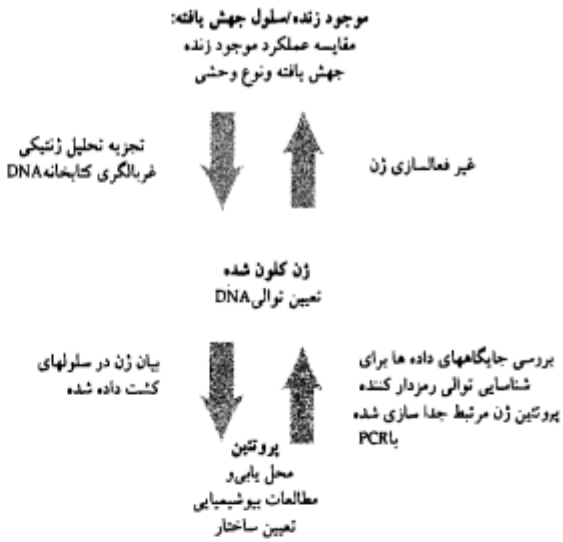
۵-۴. شناسایی و جایابی ژن‌های بیماری انسانی

۵-۵. غیر فعالسازی عملکرد ژن‌های خاص در یوکاریوت‌ها

در فصول قبل، تعدادی از کارهایی که پروتئین‌ها در سیستم‌های زیست شناختی انجام می‌دهند، آشنا شدیم. در حقیقت، بخش زیادی از زیست‌شناسی سلولی مولکولی، فهم مکانیسم مولکولی پروتئین‌های منفرد و اینکه چگونه گروه‌های پروتئینی با هم برای انجام دادن اعمال زیست شناختی‌شان همکاری می‌کنند، است. در بررسی یک پروتئین تازه یافت شده، زیست شناسان سلولی معمولاً سه سوال را در مورد آن مطرح می‌کنند. اول آنکه نقش آن چیست؟ دوماً در کجا قرار گرفته است و و در آخر اینکه ساختارش چیست؟ برای جواب دادن به این سوالات، محققان از سه ابزار کمک می‌گیرند، ژنی که پروتئین را رمزدار می‌کند، یک سلول جهش یافته یا موجود زنده جهش یافته که فاقد عملکرد پروتئین مورد نظر است و یک منبع پروتئین خالص سازی شده برای مطالعات بیوشیمیایی. در این فصل ما جنبه‌های مختلف دو استراتژی آزمایشگاهی پایه را برای به دست آوردن سه ابزار فوق مورد توجه قرار می‌دهیم (شکل ۱-۵).

استراتژی اول، اغلب بعنوان ژنتیک کلاسیک شناخته می‌شود و با جداسازی موجود جهش یافته که در چندین فرآیند مورد نظر نقص دارد، شروع می‌شود. سپس روش‌های ژنتیکی برای شناخت و جداسازی ژن معیوب به کار می‌رود. ژن جداسازی شده می‌تواند طوری دستکاری شود که مقادیر زیادی پروتئین برای آزمایش‌های بیوشیمی تولید کند و همچنین می‌تواند برای طراحی شناساگرها[1] به منظور مطالعه اینکه پروتئین رمزدار شده چه زمانی و در کجای یک موجود زنده بیان می‌شود، به کار رود. دوّمین استراتژی اساساً از همان مراحل راهکار کلاسیکی ولی در جهت عکس پیروی می‌کند و با جداسازی پروتئین مورد نظر یا شناسایی آن براساس تجزیه و تحلیل توالی ژنومی موجود زنده شروع می‌شود. وقتی که ژن مرتبط جداسازی شد، ژن می‌تواند تغییر داده شود و سپس دوباره وارد یک موجود زنده شود. در هر دو استراتژی، با ارزیابی

1- Probes



▲ **شکل ۱-۵ مروری بر دو استراتژی مرتبط کننده عملکرد، محل و ساختار محصول ژنی.** یک موجود زنده جهش یافته نقطه آغاز استراتژی ژنتیکی معکوس است. استراتژی عکس معمولاً با شناسایی توالی رمزدار کننده پروتئین توسط تجزیه و تحلیل داده‌های توالی ژنومی شروع می‌شود. در هر دو استراتژی، ژن اصلی یا از کتابخانه DNA و یا توسط تشدید اختصاصی یک توالی ژنی از DNA ژنومی جداسازی می‌شود. وقتی ژن کلون شده جداسازی شد، می‌تواند برای تولید پروتئین رمزدار شده در سیستم‌های بیانی باکتریایی یا یوکاریوتی مورد استفاده قرار گیرد و یا اینکه ژن کلون شده می‌تواند توسط یک یا چندین تکنیک غیرفعال شود و برای تولید سلول‌های موجودات زنده جهش یافته مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نتایج فنوتیپی جهش‌ها که یک ژن خاص را غیرفعال می‌سازند، متخصصین ژنتیک قادر می‌شوند دانسته هایشان را در مورد توالی، ساختار و فعالیت بیوشیمیایی پروتئین رمزدار شده به عملکرد آن در یک سلول زنده یا موجود زنده پرسلولی تعمیم دهند.

یک موضوع مهم در هر دو استراتژی برای مطالعه یک پروتئین و عملکرد زیست شناختی آن، جداسازی ژن مرتبط با آن است. بنابراین ما تکنیک‌هایی راکه توسط آن‌ها، محققان می‌توانند نواحی خاصی از DNAی یک موجود زنده را جداسازی، تعیین توالی و دستکاری کنند توضیح می‌دهیم و سپس با تعدادی از تکنیک‌هایی آشنا می‌شویم که به طور معمول برای تجزیه تحلیل اینکه یک ژن خاص کجا و در چه زمانی یک ژن خاص بیان می‌شود و اینکه پروتئین آن در کجای سلول قرار می‌گیرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در برخی حالات، دانش در مورد عملکرد پروتئین منجر به پیشرفت‌های پزشکی می‌گردد و اولین مرحله در توسعه درمان‌هایی برای بیماری ارثی شناخت و جداسازی ژن معیوب است که در این بخش توضیح می‌دهیم. سرانجام ما تکنیک‌هایی را توضیح می‌دهیم که عملکرد پروتئین طبیعی را به منظور برآورد نقش پروتئین در سلول از بین ببرد.

۱-۵ تجزیه و تحلیل ژنتیکی جهش‌ها برای شناسایی و مطالعه ژن‌ها:

چنانچه در فصل ۴ توضیح داده شد، اطلاعات رمزدار شده‌در توالی DNAی ژن‌ها، توالی (بنابراین ساختار و عملکرد) هر مولکول پروتئین را در یک سلول تعیین می‌کند. قدرت ژنتیک بعنوان ابزاری برای مطالعه سلول‌ها و موجودات زنده در سایه توانایی محققان برای تغییر انتخابی هر نسخه از یک نوع پروتئین در یک سلول توسط ایجاد تغییرات ژنی برای آن پروتئین، قرار می‌گیرد. تجزیه تحلیل‌های ژنتیکی موجودات جهش یافته که در یک فرآیند خاص دچار نقص هستند می‌تواند (الف) ژن‌های جدید لازم برای اینکه آن فرآیند اتفاق بیفتد (ب) ترتیبی را که محصولات ژنی در آن فرآیند عمل می‌کنند، (ج) و اینکه آیا پروتئین‌های رمزدار شده توسط ژن‌های مختلف با یکدیگر میانکش می‌دهند را آشکار کند. قبل از اینکه ببینیم چگونه مطالعات ژنتیکی از این نوع می‌تواند دیدی را نسبت به مکانیسم فرآیند سلولی پیچیده یا تکوینی به وجود آورد، ابتدا ما برخی واژه‌های ژنتیک پایه را که در کل بحث ما استفاده خواهد شد توضیح می‌دهیم.

انواع مختلف (یا واریانت‌هایی) یک ژن بعنوان **آلل‌ها**[1] اطلاق می‌گردد. ژنتیک دانان معمولاً به تعدادی از واریانت‌های ژنتیکی که به طور طبیعی در جمعیت وجود دارند، مخصوصا در جمعیت‌های انسانی بعنوان آلل‌ها اطلاق می‌کنند. واژه **جهش**[2] برای نمونه‌هایی که در آن یک آلل به تازگی تشکیل شده است، اطلاق می‌شود. مثلا بعد از تیمار یک موجود آزمایشگاهی با یک **ماده جهش زا**[3]، یعنی عاملی که باعث تغییر قابل توارث در توالی DNA می‌گردد.

عده خاصی از آلل‌ها برای همه ژن‌ها که توسط یک فرد حمل می‌شود، **ژنوتیپ**[4] آن فرد است. به هر حال، این واژه در اصطلاح بسیار محدود شده به منظور اشاره به آلل‌هایی از یک ژن یا ژن‌های خاص تحت بررسی نیز به کار می‌رود. برای موجودات آزمایشگاهی، واژه **نوع وحشی** اغلب برای طرح یک ژنوتیپ استاندارد به منظور

1-Alleles 2-Mutation
3-Mutagen 4-Genatype

استفاده بعنوان مرجع در آزمایش‌های اصلاح[۱] استفاده می‌شود. بنابراین آلل طبیعی و جهش نیافته معمولاً بعنوان نوع وحشی در نظر گرفته می‌شود. به خاطر تنوع آللی که به طور طبیعی زیاد در جمعیت‌های انسانی زیاد موجود است واژه آلل وحشی معمولاً اشاره به آللی دارد که فراوانی خیلی بیشتر از گزینه‌های ممکن دیگر دارد.

ژنتیکدان‌ها تمایز مهمی را بین ژنوتیپ و **فنوتیپ**[۲] یک موجود زنده قائل می‌شوند. فنوتیپ اشاره به همه صفت‌های فیزیکی و نشانه‌های یک فرد دارد که نتیجه یک ژنوتیپ هستند. در عمل، واژه فنوتیپ اغلب برای اشاره به نتایج فیزیکی حاصل از آللهایی که تحت بررسی آزمایشگاهی هستند، استفاده می‌شود. مشخصه‌های فنوتیپی به راحتی قابل مشاهده بوده و در تجزیه تحلیل‌های ژنتیکی جهش‌ها، اساسی هستند.

آلل‌های جهش یافته و غالب و مغلوب عموما اثرات متضاد روی عملکرد ژن دارند.

اختلاف ژنتیکی اساسی بین موجودات زنده آزمایشگاهی این است که آیا سلول‌های آنها حامل تعداد منفرد از کروموزوم‌ها هستند یا دو نسخه از هر دو کروموزوم را دارند، که به اولی **هاپلوئید**[۳] و به دومی دیپلوئید[۴] اطلاق می‌شود. موجودات پرسلولی پیچیده (مگس‌های سرکه، موش‌ها، انسان‌ها) دیپلوئید هستند، در صورتیکه بسیاری از موجودات تک سلولی ساده، هاپلوئید هستند. برخی از موجودات زنده، مخصوصاً ساکارومایسس سرویزیه[۵] در هر دو حالت هاپلوئید و دیپلوئید وجود دارند. بسیاری از سلول‌های سرطانی و سلول‌های طبیعی برخی موجودات زنده، هم در گیاهان و هم در حیوانات بیشتر از دو نسخه از هر کروموزوم را در خود حمل می‌کنند. به هر حال، بحث ما از تکنیک‌ها و تجزیه تحلیل‌های ژنتیکی مربوط به موجودات دیپلوئید از قبیل مخمر دیپلوئید است.

اگرچه بسیاری از آللهای مختلف یک ژن ممکن است در افراد مختلف یک جمعیت موجود باشند، هر فرد دیپلوئید دو نسخه از هر ژن را حمل خواهد کرد و بنابراین اغلب می‌تواند دو آلل متفاوت داشته باشد. یک فرد با دو آلل متفاوت **هتروزیگوت**[۶] برای یک ژن است، در صورتیکه فردی که دو آلل مشابه را حمل می‌کند برای یک ژن **هوموزیگوت**[۷] است. آلل جهش یافته **مغلوب**[۸]، آللی است که در آن هر دو آلل به منظور اینکه فنوتیپ جهش یافته مشاهده شود بایستی جهش یابند. در این مورد فرد بایستی برای آن آلل جهش یافته به منظور نشان دادن فنوتیپ جهش یافته، هوموزیگوت باشد. در مقابل، نتایج فنوتیپی آلل جهش یافته غالب[۹] می‌تواند در یک فرد هتروزیگوت که یک آلل جهش یافته و یک آلل نوع وحشی را حمل می‌کند، مشاهده شود (شکل ۲-۵).

این مسئله که آیا آلل جهش یافته مغلوب یا غالب است، اطلاعات با ارزشی درباره عملکرد ژن متاثر و طبیعت جهش ایجاد شده فراهم می‌آورد. آللهای مغلوب معمولاً نتیجه جهشی هستند که ژن متاثر را غیرفعال می‌سازند که منجر به فقدان جزئی یا کامل عملکرد ژن می‌گردد. چنین جهش‌های مغلوب امکان دارد قسمتی یا تمام ژن را از کروموزوم بردارند و باعث از بین رفتن بیان ژن شوند، یا ساختار پروتئین رمزدار شده را تغییر دهند و بدین ترتیب عملکرد آن را تغییر دهند. برخلاف آن، آللهای غالب اغلب باعث می‌شوند تعدادی عملکرد کسب شود. جهش‌های غالب ممکن است فعالیت پروتئین رمزدار شده را تغییر دهند و عملکرد جدیدی را به آن بدهند و یا منجر به الگوی نامناسب بیان آن گردند. جهش‌های غالب در ژن‌های خاص، با فقدان عملکرد همراه هستند. برای مثال، برخی ژن‌ها ناکافی به لحاظ هاپلو[۱۰] هستند به این معنی که هر دو آلل برای عملکرد طبیعی آن لازم هستند. حذف یا غیرفعال سازی یک آلل منفرد در چنین ژنی منجر به فنوتیپ جهش یافته می‌شود. در نمونه‌های نادر دیگر یک جهش غالب در یک آلل ممکن است منجر به تغییر ساختاری در پروتئینی شود که با عملکرد پروتئین نوع وحشی که توسط آلل دیگر رمزدار می‌شود تداخل ایجاد کند. به این نوع جهش، جهش غالب منفی[۱۱] اطلاق می‌گردد که یک فنوتیپ شبیه به فنوتیپی که از جهش فقدان عملکردی حاصل می‌شود را ایجاد می‌کند.

برخی آللها می‌توانند هم خصوصیات غالب و هم مغلوب را نشان دهند. در چنین حالاتی وقتی صحبت درباره این می‌شود که آیا آلل غالب است یا مغلوب، بایستی فنوتیپ مشخص شود. برای مثال، آلل ژن هموگلوبین در انسان‌ها که Hb^s است بیش از یک نتیجه فنوتیپی دارد. افرادی که برای این آلل هموزیگوت هستند (Hb^s/Hb^s) بیماری کم خونی سلول داسی شکل[۱۲] ایجاد می‌شود، ولی افراد هتروزیگوت (Hb^s/Ha) بیمار

1- Breedin
2-Phenotype
3- Haploid
4- Diploid
5- Sacchoromyces cerevisiae
6-Heterozygous
7-Homozygous
8-Recessive
9-Dominant
10-Hoplo insufficient
11-Dominant-negative
12-Sicle-cellanemia

نمی‌شوند. از طرف دیگر، افراد هتروزیگوت (Hb^s/Hb) مقاوم‌تر از افراد هوموزیگوت (Hb^a/H^a) نسبت به مالاریا هستند که مشخص می‌سازد که Hb^s اغلب نشانه مقاومت به مالاریا است.

ماده‌ای که معمولاً برای ایجاد جهش (جهش زایی) در موجودات آزمایشگاهی استفاده می‌شود اتیل متان سولفونات است (EMS). اگر چه این مادهٔ جهش زا می‌تواند توالی DNA را به چندین طریق تغییر دهد، ولی یکی از بیشترین اثرات معمولش، تغییر شیمیایی بازهای گوانین در DNA است که سرانجام منجر به تبدیل جفت باز G.C به جفت باز A.T می‌شود. چنین تغییری در توالی یک ژن که فقط یک جفت باز را دربرمی‌گیرد بعنوان **جهش نقطه‌ای**[1] شناخته می‌شود. یک جهش نقطه‌ای خاموش تغییری را در توالی اسید آمینه‌ای یا فعالیت پروتئین رمزدار شده ایجاد نمی‌کند. به هر حال نتایج فنوتیپی قابل مشاهده در راستای تغییر در فعالیت یک پروتئین می‌تواند حاصل جهش‌های نقطه‌ای باشد که در نتیجه جابجایی یک اسید آمینه با اسید آمینه دیگر (جهش معنی‌دار)[2] قرار دادن یک رمز پایان (جهش بی معنی)[3] یا تغییر در خواندن قطعه‌ای از ژن (جهش تغییر در قالب خواندن)[4] باشد. به خاطر اینکه تغییرات در توالی DNA که منجر به کاهش فعالیت پروتئین می‌شود به نظر می‌رسد بسیار بیشتر از تغییراتی است که منجر به افزایش یا تغییر کیفی در فعالیت پروتئین می‌شود، جهش زایی معمولاً باعث جهش‌های مغلوب بیش‌تر از جهش‌های غالب می‌شود.

تقسیم جهش‌ها در آزمایش‌های زایشی (نسل‌گیری) اثر غالب یا مغلوب آنها را آشکار می‌کند

ژنتیک دانان از چرخه زیستی طبیعی یک موجود زنده برای آزمایش غالب بودن یا مغلوب بودن آلل‌ها، استفاده می‌کنند. برای دیدن اینکه این امر چگونه انجام می‌گیرد، در ابتدا نیاز داریم، نوع تقسیم سلولی را که باعث ایجاد **گامت** می‌شود را مرور کنیم (سلول‌های تخم و اسپرم در گیاهان عالی و جانوران). با اینکه سلول‌های بدنی (سوماتیک) اغلب موجودات زنده پرسلولی توسط **میتوز** تقسیم می‌شوند، **سلول‌های زایا** که باعث ایجاد گامت می‌شوند، متحمل **میوز** می‌شوند. سلول‌های سوماتیک، (سلول‌های زایای قبل از میوز) دیپلوئید هستند و دارای دو همتا از هر نوع مورفولوژیکی از کروموزوم هستند. آن دو همتا باعث ایجاد کروموزوم‌های همتا می‌شوند که از دو والد به ارث می‌رسد و بنابراین ژن‌های آنها ممکن است در انواع آللی مختلف باشند. شکل ۳-۵ وقایع اصلی را که در تقسیم سلولی به طریق میوز و میتوز اتفاق می‌افتد نشان می‌دهد. در میتوز بعد از همانندسازی DNA همیشه تقسیم سلولی به وقوع می‌پیوندد و باعث ایجاد دو سلول دختری دیپلوئید می‌شود. در میوز به دنبال یک دور از همانندسازی DNA، دو تقسیم سلولی اتفاق می‌افتد و چهار سلول هاپلوئید (In) که حاوی فقط یک کروموزوم از هر جفت همتا است، حاصل می‌شود. تسهیم یا تقسیم کروموزوم‌های هومولوگ به سلول‌های دختر در طی اولین تقسیم میوزی تصادفی است. به این صورت که همتاهای حاصل از کروموزوم‌های پدری و مادری به طور مستقل تقسیم می‌شوند و باعث ایجاد سلول‌های دختری با ترکیبات مختلف از کروموزوم‌های پدری و مادری می‌شوند.

برای اجتناب از پیچیدگی ناخواسته، ژنتیکدان‌ها معمولاً سعی می‌کنند با آزمایش‌های جفت‌گیری انتخابی سوش‌هایی که برای ژن‌های تحت بررسی هتروزیگوت هستند، شروع کنند. در این حالت، هر فردی آلل مشابه از هر دو والد کسب خواهد کرد و بنابراین ترکیب آلل‌ها از یک نسل به نسل دیگر تغییر نخواهد کرد. وقتی یک موش جهش یافته اصلاح شده حقیقی[5] با موش نوع وحشی اصلاح شده حقیقی جفت‌گیری کند، همه زاده‌های نسل اول (F_1) هتروزیگوت خواهند بود (شکل ۴-۵). اگر زاده F_1 خصوصیت جهش یافته را نشان دهد، آلل جهش یافته غالب است. اگر زاده F_1 نشانه نوع وحشی را نشان دهد، آلل جهش یافته، مغلوب است. آمیزش بیشتر بین افراد F_1، الگوهای مختلفی از وراثت براساس اینکه جهش غالب یا مغلوب است آشکار خواهد کرد. وقتی افراد F_1 که برای یک آلل غالب هتروزیگوت هستند با خودشان آمیزش داده شوند، سه چهارم از زاده‌های حاصل F_2 خصوصیت جهش یافته را نشان خواهند داد. برعکس، وقتی افراد F_1 که برای آلل مغلوب هتروزیگوت هستند با هم آمیزش داده شوند، فقط یک چهارم زاده‌های F_2 حاصل، خصوصیت جهش یافته را نشان خواهند داد.

چنانچه قبلا اشاره شد، مخمر ساکارومایسس سرویزیه، یک موجود آزمایشگاهی مهم است که می‌تواند هم به صورت هاپلوئید و یا به صورت دیپلوئید موجود باشد. در این یوکاریوت‌های تک سلولی، آمیزش بین سلول‌های هاپلوئید می‌تواند این امر را که آیا آلل جهش یافته غالب هست یا مغلوب، تعیین کند. سلول‌های مخمری هاپلوئید که فقط یک نسخه از هر کروموزوم را حمل می‌کنند، می‌تواند نوع جفت گیرنده متفاوت داشته باشد که به دو صورت a و α شناخته می‌شوند.

1- Point Mutation
2- Missense Mutation
3- Missense Mutation
4- Missense Mutation
5- True- breeding

▲ **شکل ۲-۵ اثرات آلل‌های جهش یافته غالب و مغلوب بر روی فنوتیپ در موجودات زنده دیپلوئید.** یک نسخه منفرد از یک آلل غالب برای تولید یک فنوتیپ جهش یافته کافی است، در صورتیکه دو نسخه از آلل مغلوب بایستی وجود داشته باشند. تا باعث ایجاد فنوتیپ جهش یافته شوند. جهش‌های مغلوب معمولاً باعث عدم عملکرد می‌شود. جهش‌های غالب معمولاً باعث کسب یک عملکرد یا یک عملکرد تغییر یافته می‌شوند.

سلول‌های هاپلوئید از نوع جفت گیرنده مخالف می‌توانند برای تولید دیپلوئیدهای a/α جفت شوند که دو نسخه از هر کروموزوم را حمل می‌کنند. اگر یک جهش تازه با یک فنوتیپ قابل مشاهده در یک سوش هاپلوئید جداسازی شود، سوش جهش یافته می‌تواند با سوش نوع وحشی از نوع جفت گیرنده مخالف برای ایجاد دیپلوئید a/α که برای آلل جهش یافته هتروزیگوت هستند، آمیزش داده شود. اگر این سلول‌های دیپلوئید خصوصیت جهش یافته را نشان دهند، آلل جهش یافته، غالب است ولی اگر دیپلوئیدها خصوصیت نوع وحشی را نشان دهند، آلل جهش یافته مغلوب است. وقتی دیپلوئیدهای a/α در شرایط گرسنگی قرار گیرند، سلول‌ها متحمل میوز می‌شوند و باعث ایجاد یک تتراد از چهار هاگ هاپلوئید می‌شود، دو عدد نوع a و دو عدد نوع α هستند. هاگ سازی یک سلول دیپلوئید هتروزیگوت دو هاگ دارای آلل جهش یافته و دو هاگ دارای آلل نوع وحشی ایجاد می‌کند (شکل ۵-۵). تحت شرایط مناسب هاگ مخمر تولید مثل می‌کنند و تولید سوش‌های هاپلوئید رویشی از هر دو نوع جفت گیرنده را می‌کند.

جهش‌های شرطی[1] می‌تواند برای مطالعه ژن‌های اصلی در مخمر استفاده شود.

روش‌های برای شناسایی و جداسازی موجودات جهش یافته، که غربال‌های ژنتیکی[2] اطلاق می‌گردد به هاپلوئید یا دیپلوئید بودن و یا اینکه غالب یا مغلوب بودن جهش در موجود زنده بستگی دارد. ژن‌هایی که پروتئین‌های ضروری برای زیست را رمزدار می‌کنند برای مطالعه و بررسی مورد توجه و بسیار با اهمیت هستند. از این جهت که بیان فنوتیپی جهش‌ها در ژن‌های ضروری منجر به مرگ موجود زنده می‌گردد، غربال‌های ژنتیکی مبتکرانه برای جداسازی و نگه داری موجودات زنده با جهش کشنده مورد نیاز هستند.

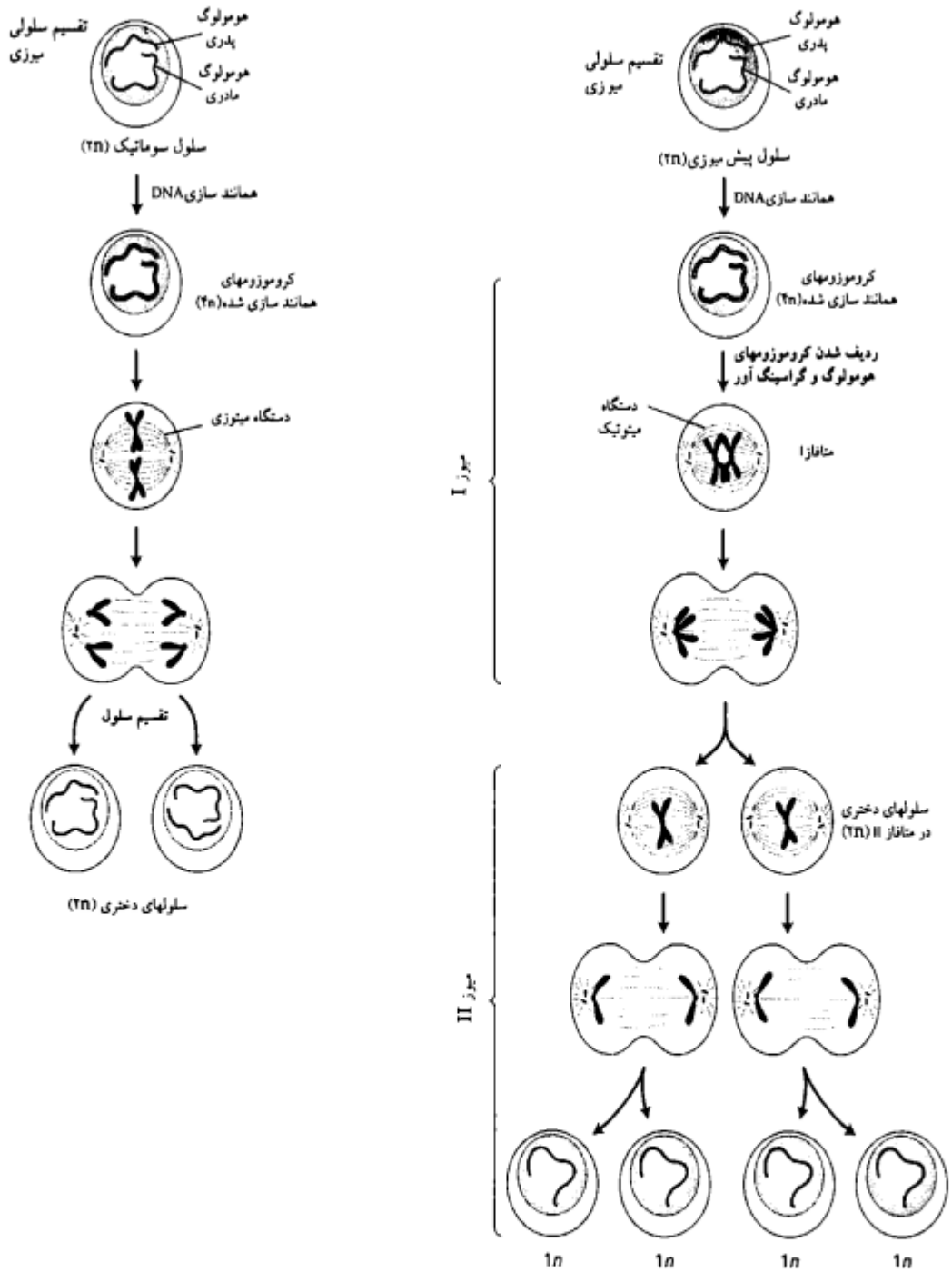
در سلول‌های مخمری هاپلوئید، ژن‌های ضروری می‌تواند از طریق استفاده از جهش‌های شرطی مورد مطالعه قرار گیرد. معمولترین جهش‌های شرطی، **جهش‌های حساس به دما** هستند، که می‌تواند در باکتری‌ها و یوکاریوت‌های پست‌تر ولی نه در یوکاریوت‌های خونگرم جداسازی شوند. برای مثال، یک جهش معنی دار منفرد ممکن است باعث ایجاد پروتئین جهش یافته‌ای شود که پایداری حرارتی کمی دارد. چنانکه پروتئین در یک دما کاملاً عمل می‌کند (مثلا ۲۳°C) ولی در دمای دیگری دناتوره و غیرفعال می‌شود (مثلا در ۳۶°C) در حالی که ممکن است که پروتئین طبیعی در هر دو دما کاملا دارای عملکرد و فعال باشد. درجه حرارتی که در آن فنوتیپ جهش یافته مشاهده می‌شود، دمای غیرمجاز نامیده می‌شود. دمای مجاز، دمایی است که در آن فنوتیپ جهش یافته حتی با وجود آلل جهش یافته، مشاهده نمی‌شود. بنابراین سوش‌های جهش یافته می‌توانند در دمای مجاز نگهداری شوند و سپس در دمای غیرمجاز برای تجزیه و تحلیل فنوتیپ جهش یافته کشت داده شود.

یک مثال از غربال اختصاصی مهم برای مخمرهای ساکارومایسس سرویزیه جهش یافته حساس به دما از کارهای ال.اچ هارت ول[3] و همکارانش در اواخر دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۷۰ حاصل شد. آنها ژن‌های مهم در تنظیم **چرخه سلولی** را که در طی آن سلول پروتئین‌ها را سنتز می‌کند و DNA خود را همانندسازی می‌کند، سپس متحمل تقسیم سلولی میتوزی می‌شود و هر سلول دختری یک نسخه از هر کروموزوم دریافت می‌کند، را شناسایی کردند. رشد توانی یک مخمر منفرد در حدود ۳۰-۲۰ تقسیم سلولی تشکیل یک کلونی مخمری را بر روی محیط کشت آگار جامد می‌دهد. از این جهت سلول‌های جهش یافته که چرخه سلولی آنها به طور کامل بلوکه شده است قادر نخواهند بود که یک کلونی تشکیل دهند، جهش‌های‌شرطی برای مطالعه جهش‌هایی که این فرآیند اولیه

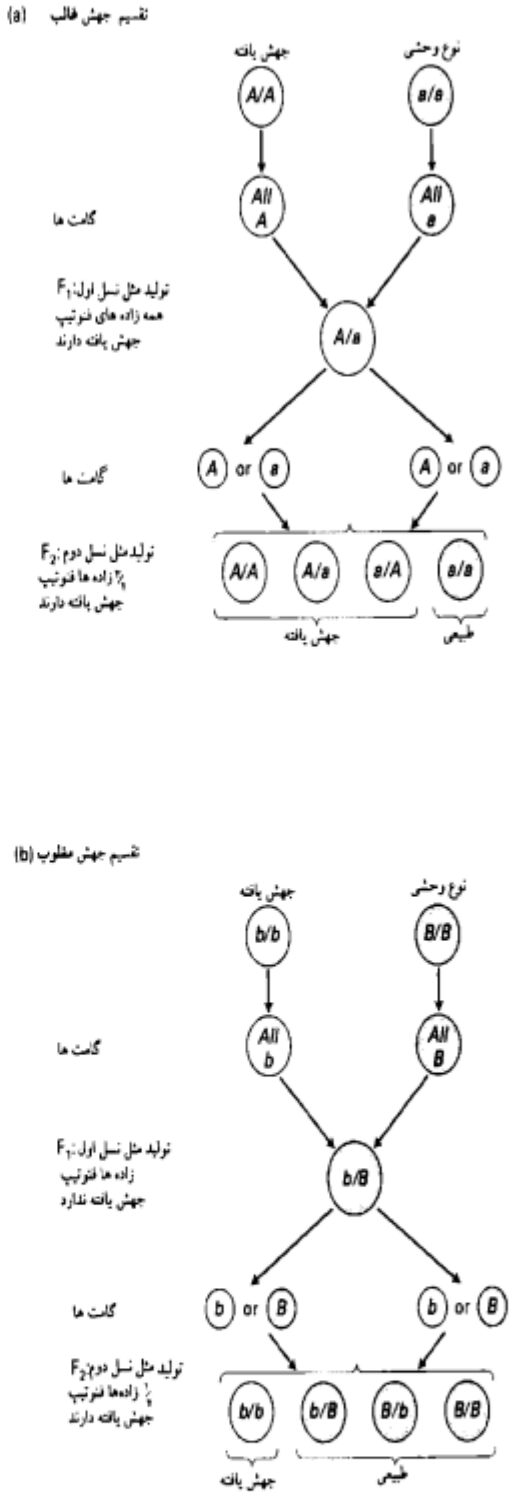
1- Conditional mutations

2-Genetic screens

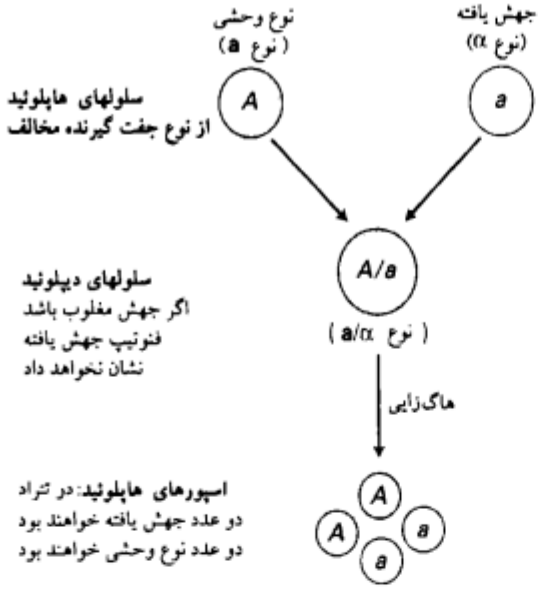
3- L.H.Hortwell



▲ **شکل ۳-۵ مقایسه میتوز و میوز.** هم سلول‌های سوماتیک و هم سلول‌های زایای پیش میوزی دو نسخه از هر کروموزوم دارند (۲n)، یک نسخه مادری و یک نسخه پدری. در میتوز، کروموزوم‌های همانندسازی کرده، هر کدام از دو کروماتید خواهر تشکیل شده‌اند، و در مرکز سلول چنان قرار می‌گیرند که هر دو سلول دختر یک همتای پدری و مادری از هر دو نوع مورفولوژیکی کروموزوم دریافت می‌کنند. به هر حال در طی اولین تقسیم میوزی، هر کروموزوم همانندسازی شده با همتایش در مرکز سلول جفت می‌شود. به این جفت شدن سیناپس اطلاق می‌گردد، و در این مرحله کراسینگ آور بین کروموزوم‌های همتا به وجود می‌آید. یک کروموزوم همانندسازی شده از هر نوع مورفولوژیکی به طرف هر دو سلول دختر می‌رود. سلول‌های حاصل متحمل دوّمین تقسیم بدون همانندسازی DNA می‌شوند و هر کروماتید خواهری از هر نوع مورفولوژیکی بین سلول‌های دختر تقسیم می‌شود. در تقسیم میوزی دوم، ردیف شدن کروماتیدها و تقسیم مساوی آنها به سلول‌های دختر شبیه تقسیم میتوزی است. ردیف شدن جفت کروموزوم‌های همتا در متافاز I با توجه به سایر جفت کروموزوم‌ها تصادفی است که نتیجه‌اش ترکیب مختلف کروموزوم‌های پدری و مادری در هر سلول دختر است.



▲ **شکل ۴-۵ الگوی تقسیم جهش‌های غالب و مغلوب در آمیزش بین سوش‌های اصلاح شده حقیقی از موجودات زنده دیپلوئید.** همه زاده‌ها در اولین تولید مثل (F_1) هتروزیگوت هستند. اگر آلل جهش یافته غالب باشد، زاده F_1 فنوتیپ جهش یافته را نشان خواهد داد، چنانچه در بخش (a) است. اگر آلل جهش یافته مغلوب باشد، زاده F_1 فنوتیپ نوع وحشی را نشان خواهد داد، چنانچه در قسمت (b) آمده است. آمیزش هتروزیگوت‌های F_1 با خودشان نسبت‌های مختلفی برای آلل‌های جهش یافته غالب و مغلوب در تولید مثل F_2 نشان خواهد داد.



▲ **شکل ۵-۵ تقسیم آلل‌ها در مخمر.** سلول‌های ساکارومایسس هاپلوئید از نوع جفت گیرنده مخالف (یک جفت گیرنده از نوع α و یک جفت گیرنده از نوع a) می‌تواند جفت شوند و تولید یک دیپلوئید a/α را بدهند. اگر یک هاپلوئید حامل دارای یک آلل نوع وحشی غالب باشد و دیگری حامل آلل جهش یافته مغلوب از همان ژن باشد، دیپلوئید هتروزیگوت حاصل خصوصیت غالب را بیان خواهد کرد. تحت شرایط خاصی، یک سلول دیپلوئید تشکیل یک تتراد از چهار هاگ هاپلوئید را خواهد داد. دو تا از هاگ در تتراد (چهار تایی) خصوصیت مغلوب را نشان می‌دهند و دو تا خصوصیت غالب را نشان می‌دهند.

سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، لازم هستند. برای غربالگری چنین موجودات جهش یافته‌ای، محققان در ابتدا، سلول‌های مخمری را که جهش داده شده بودند و می‌توانستند به طور طبیعی در ۲۳ درجه رشد کنند ولی وقتی که در دمای ۳۶ درجه قرار می‌گرفتند نمی‌توانستند رشد کنند را شناسایی کردند (شکل ۶-۵).

وقتی که مخمرهای جهش یافته جداسازی شدند، تجزیه تحلیل‌های بیشتر آشکار کرد که برخی از آنها در تقسیم سلولی دارای نقص هستند. در ساکارومایسس سرویزیه، تقسیم سلول از طریق فرآیند جوانه زنی اتفاق می‌افتد و اندازه جوانه که به راحتی در زیر میکروسکوپ نوری دیده می‌شود نشان دهنده موقعیت سلول در چرخه سلولی است. هر یک از مخمرهای جهش یافته که در دمای ۳۶°C می‌توانستند رشد کنند، بعد از چندین ساعت قرار گرفتن در دمای غیرمجاز، مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی تعداد زیادی از مخمرهای جهش یافته حساس به دما آشکار ساخت که در حدود یک درصد از آنها بلوکه شدن متفاوتی در چرخه سلولی را نشان می‌دهند.

این مخمرهای جهش یافته، جهش یافته‌های cdc (چرخه تقسیم سلولی)[1] بودند. مهمتر اینکه این مخمرهای جهش یافته به طور ساده کاهش در رشد نداشتند، مگر اینکه آنها دارای جهشی بودند که متابولیسم سلولی عمومی را تحت تاثیر قرار می‌داد در دمای غیرمجاز، مخمرهای جهش یافته مورد نظر بطور طبیعی در قسمتی از چرخه سلولی رشد کردند ولی سپس در یک مرحله خاص از چرخه سلولی متوقف شدند. چنانکه بسیاری از سلول‌ها در این مرحله دیده می‌شدند (شکل ۶-۵). بیشتر جهش‌های cdc در مخمر وقتی مغلوب هستند که سوش‌های cdc هاپلوئید با هاپلوئیدهای نوع وحشی آمیزش داده می‌شوند. دیپلوئیدهای هتروزیگوت حاصل نه حساس به دما هستند و نه در تقسیم سلولی نقص دارند.

جهش‌های کشنده مغلوب در دیپلوئیدها می‌توانند توسط درون‌زاد آوری[2] شناسایی شوند و به صورت هتروزیگوت حفظ شوند.

در موجودات زنده دیپلوئید، فنوتیپ‌های حاصل از جهش‌های مغلوب تنها می‌توانند در افراد هموزیگوت برای آلل‌های جهش یافته مشاهده شوند. از این رو که جهش زایی در یک موجود زنده دیپلوئید معمولاً تنها یک آلل از یک ژن را تغییر می‌دهد و موجودات جهش یافته هتروزیگوت حاصل می‌شوند، غربال‌های ژنتیکی بایستی شامل مراحل آمیزش درونی به منظور تولید زاده‌هایی که برای آلل‌های جهش یافته هتروزیگوت هستند، باشد. ژنتیکدانی به نام اچ-مولر روش عمومی و موثری برای انجام چنین آزمایش‌های درون زاد آوری در مگس سرکه دروزفیلا گسترش داد. جهش‌های کشنده مغلوب در دروزوفیلا و سایر موجودات زنده دیپلوئید می‌توانند در افراد هتروزیگوت حفظ شوند و نتایج فنوتیپی آنها می‌تواند در موجودات هموزیگوت مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرد.

روش مولر با اثر زیاد توسط نوسلین - ولهارد[3] و یی-ویشوس[4] (به طور سیستماتیکی جهش‌های کشنده مغلوب را که جنین‌زایی را در دروزوفیلا تحت تاثیر قرار می‌دادند را غربال کرد) استفاده شد. جنین‌های هموزیگوت مرده حامل جهش‌های کشنده مغلوب بودند که توسط این غربال زیر میکروسکوپ برای نقص‌های مورفولوژیکی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. درک فعلی از مکانیسم‌های مولکولی تکوین موجودات زنده پرسلولی تا حدی بر پایه تصویر جزئی از تکوین جنینی استوار است که توسط تعیین خصوصیت این جهش یافته‌های دروزوفیلا به دست آمده است. ما برخی از آن یافته‌های اساسی را که بر اساس مطالعات ژنتیکی است در فصل ۲۲ توضیح خواهیم داد.

آزمایش‌های مکمل‌سازی تعیین می‌کنند که آیا جهش‌های مغلوب مختلف در همان ژن اتفاق می‌افتند.

در روش ژنتیکی به منظور مطالعه فرآیند سلولی خاص، اغلب اوقات محققان جهش‌های مغلوب چندگانه‌ای را که همان فنوتیپ را ایجاد می‌کنند، جداسازی می‌کنند. یک آزمایش معمول برای تعیین اینکه آیا این جهش‌ها در همان ژن یا در ژن‌های متفاوت هستند، استفاده از مکمل‌سازی ژنتیکی[5] است، که بازیابی فنوتیپ نوع وحشی در نتیجه آمیزش هر دو موجود جهش یافته متفاوت است. اگر دو جهش مغلوب a و b در روی یک ژن باشند، موجود زنده دیپلوئید هتروزیگوت برای هر دو جهش (یعنی، حامل یک آلل a و یک آلل b) فنوتیپ موجود جهش یافته را نشان خواهد داد، به این دلیل که هیچ کدام از آلل‌ها، تولید نسخه عملکردی از ژن را نمی‌کنند. برخلاف آن، اگر جهش a و b در ژن‌های جدا از هم باشد موجودات هتروزیگوت حامل یک نسخه منفرد از هر آلل جهش یافته خواهند بود و فنوتیپ موجود جهش یافته را نشان نخواهند داد، به این دلیل که یک آلل نوع وحشی از هر ژن نیز موجود خواهد بود. در این حالت گفته می‌شود که جهش‌ها، مکمل همدیگر هستند. تجزیه تحلیل مکمل سازی نمی‌تواند روی موجودات جهش یافته غالب انجام گیرد چون فنوتیپ حاصل توسط آلل جهش یافته حتی در حضور آلل نوع وحشی از آن ژن بروز می‌کند.

تجزیه تحلیل مکمل سازی از یک عده از موجودات جهش یافته که یک فنوتیپ را نشان می‌دهند، می‌تواند ژن‌های انفرادی را از یک عده ژن‌های دارای عملکرد مرتبط تشخیص دهد، هر کدام از آنها بایستی تولید یک مشخصه فنوتیپی داده شده را بکند. برای مثال، غربال جهش‌های cdc در ساکارومایسس که قبلا توضیح داده شد، مخمرهای جهش یافته حساس به دمای زیادی را ایجاد کرد که نشان دادند که در یک مرحله یکسان از چرخه سلولی متوقف شده‌اند. برای تعیین کردن اینکه چگونه ژن‌های زیادی توسط این جهش‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند، هارت ول و همکارانش آزمایش‌های مکمل سازی از جفت ترکیبات مخمرهای جهش یافته cdc به دنبال استفاده از پروتوکل عمومی آورده شده در شکل ۷-۵ انجام دادند. این

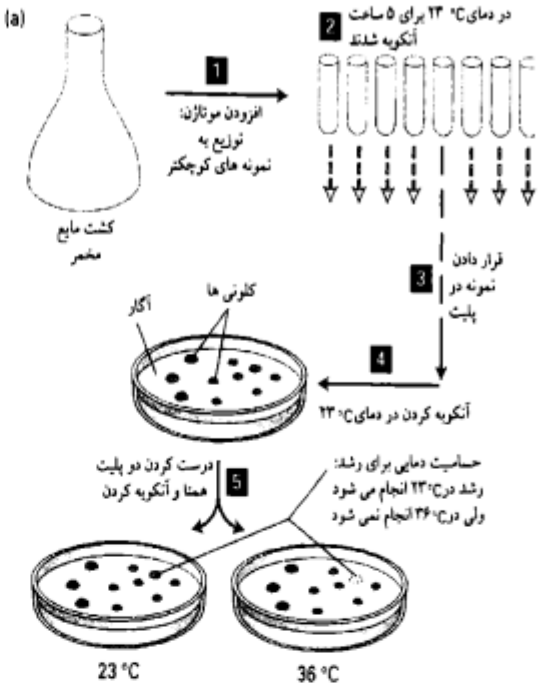
1- Cell- division cgcle (cdc)

2-Inbreeding

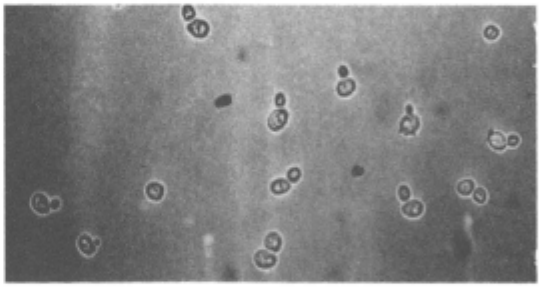
3- Nusslein- volhard

4- E.Wieschaus

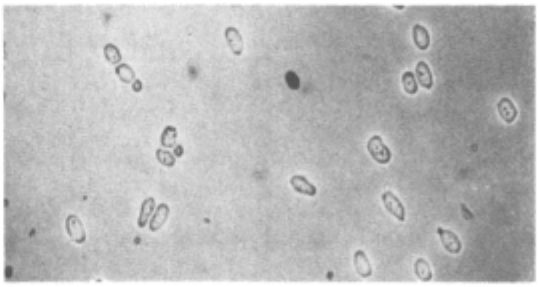
5-Genetic complementation



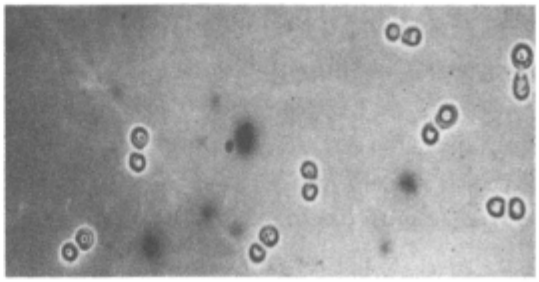
(b)
نوع وحشی



مخمرهای جهش یافته cdc28



مخمرهای جهش یافته cdc7



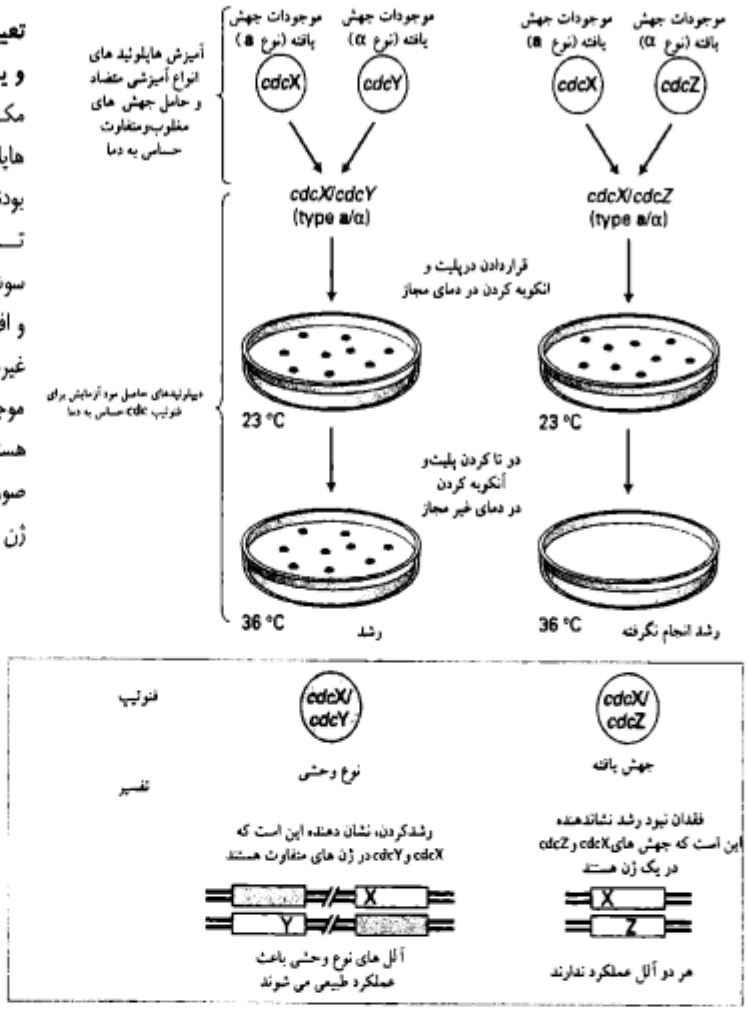
◀ شکل تجربی ۶-۵ مخمرهای هاپلوئید دارای جهش‌های کشنده حساس به دما در دمای مجاز نگهداری می‌شوند و در دمای غیرمجاز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. (a) غربال ژنتیکی مخمرهای جهش یافته در چرخه تقسیم سلولی (cdc) حساس به دما. مخمرهایی که در دمای ۲۳°C رشد و تشکیل کلونی می‌دهند (دمای مجاز) ولی در ۳۶°C تشکیل کلونی نمی‌دهند (دمای غیرمجاز) ممکن است حامل جهش کشنده‌ای باشند که تقسیم سلولی را بلوکه می‌کند. (b) ارزیابی کلونی‌های حساس به دما برای بلوکه شده‌های در مراحل خاص در چرخه سلولی. در اینجا میکروگراف‌های مخمر نوع وحشی و دو نوع متفاوت جهش یافته حساس به دما بعد از انکوبه کردن به مدت ۶ ساعت در دمای غیرمجاز نشان داده شده است. سلول‌های نوع وحشی که به رشد ادامه می‌دهند، با اندازه‌های مختلف از جوانه‌ها دیده می‌شوند که نشان‌دهنده مراحل مختلف از چرخه سلولی می‌باشد. برخلاف آن، سلول‌های موجود در دو میکروگراف پائین‌تر در یک مرحله خاص از چرخه سلولی بلوکه شده‌اند. مخمرهای جهش یافته cdc28 در نقطه‌ای قبل از ظهور جوانه جدید متوقف می‌شوند و بنابراین بصورت سلول‌های بدون جوانه دیده می‌شوند. مخمرهای جهش یافته cdc7 که فقط قبل از جدا شدن از سلول مادر توقف حاصل می‌کنند و جوانه می‌زنند (سلول‌های دختر در حال ایجاد) بصورت سلول‌هایی با جوانه‌های بزرگ دیده می‌شوند.

آزمایش‌های بیش از ۲۰ ژن مختلف از CDC را شناسایی کرد. تعیین ویژگی مولکولی بعدی ژن‌های CDC و پروتئین‌های رمزدار شده توسط آنها، همچنانکه به تفسیر در فصل ۲۰ توضیح داده شده است، چارچوبی را برای درک اینکه چگونه تقسیم سلولی در موجودات زنده از مخمر تا انسان تنظیم می‌شود، فراهم می‌کند.

موجودات جهش یافته دوگانه[1] در ارزیابی ترتیبی که در آن پروتئین‌ها عمل می‌کنند مفید هستند.

براساس تجزیه تحلیل فنوتیپ‌های جهش یافته مرتبط با فرآیند سلولی خاص، اغلب اوقات محققان می‌توانند نظمی را که در آن یک عده از ژن‌ها و محصولات پروتئینی آنها عمل می‌کنند را پیدا کنند. دو نوع کلی از این فرآیندها که برای چنین تجزیه تحلیلی قابل اعتماد هستند عبارتند از: (الف) مسیر بیوسنتزی که در آن یک ماده پیش سازاز طریق یک یا چند حدواسط به محصول نهایی تبدیل می‌شود و (ب) مسیر پیام رسانی که سایر فرآیندها را تنظیم می‌کند و شامل

1-Double mutants



◀ **شکل تجربی ۷-۵ تجزیه تحلیل مکمل سازی تعیین می‌کند که آیا جهش‌های مغلوب در یک ژن و یا در ژن‌های مختلف هستند یا نه.** آزمایش‌های مکمل سازی در مخمر توسط آمیزش سلول‌های هایلوئید a و α که حامل جهش‌های مغلوب متفاوت بودند به منظور تولید سلول‌های دیپلوئید انجام شد. در تجزیه تحلیل جهش‌های cdc، جفت‌هایی از سوش‌های cdc حساس به دما با هم آمیزش داده شدند و افراد دیپلوئید حاصل برای رشد در دمای مجاز و غیرمجاز مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مثال فرضی، موجودات جهش یافته cdcX و cdcY مکمل همدیگر هستند و بنابراین در ژن‌های متفاوت جهش دارند، در صورتیکه موجودات جهش یافته cdcX و cdcZ در یک ژن جهش دارند.

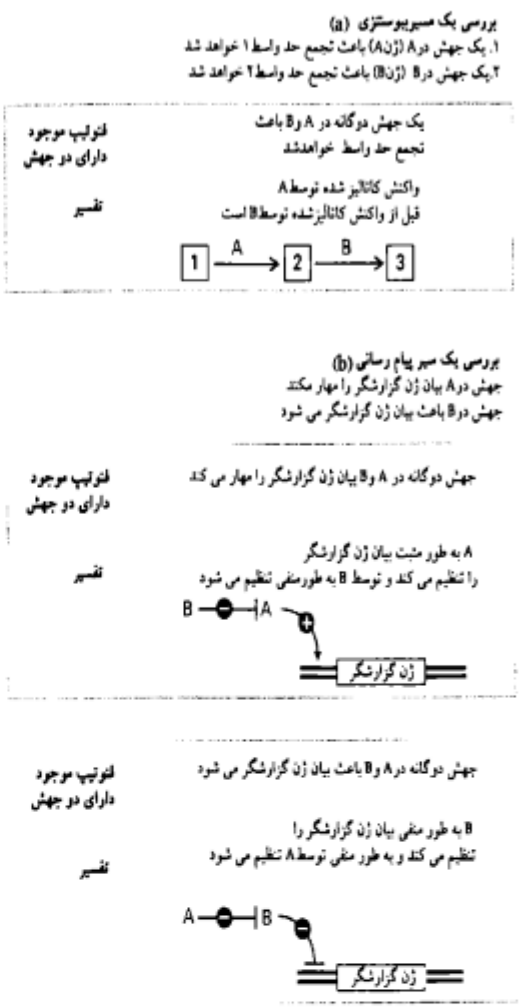
جریانی از اطلاعات به جای جریانی از حدواسط‌های شیمیایی است.

مرتب کردن مسیرهای بیوسنتزی. یک مثال ساده از اولین نوع فرآیند ، بیوسنتز متابولیتی مانند اسید آمینه تریپتوفان در باکتری‌ها است. در این حالت هر یک از آنزیم‌های مورد نیاز برای ساخت تریپتوفان در مسیر سنتز تبدیل حدواسطها را به حد واسط دیگری کاتالیز می‌کنند. در E.Coli ژن‌هایی که این آنزیم‌ها را رمزدار می‌کنند در ژنوم در کنار همدیگر قرار گرفته‌اند که اپرون تریپتوفان[1] را ایجاد می‌کنند (شکل ۱۳-۴ را ملاحظه کنید). ترتیب عمل ژن‌های مختلف برای این آنزیم‌ها و همچنین ترتیب واکنش‌های بیوشیمیایی در این مسیر، در ابتدا از نوع ترکیبات حدواسط که در هر کدام از موجود جهش یافته تجمع حاصل کرده بودند، به دست آمد. در مورد مسیرهای سنتزی پیچیده، تجزیه تحلیل فنوتیپی موجودات جهش یافته دارای نقص در یک مرحله منفرد ممکن است نتایج مبهمی بدهد که اجازه ترتیب بندی آن مراحل را ندهد. موجودات جهش یافته دوگانه ناقص در دو مرحله از مسیر در ترتیب بندی چنین مسیرهایی مفید هستند (شکل ۸a-۵).

در فصل ۱۴ ما استفاده کلاسیکی از استراتژی موجود جهش یافته دوگانه را برای کمک به روشن کردن مسیر ترشحی توضیح خواهیم داد. در این مسیر پروتئین‌های ترشح شده از سلول از مکان سنتزشان در روی شبکه آندوپلاسمی زبر به مجموعه گلژی، سپس به کیسه‌های ترشحی و در آخر به سطح سلول می‌روند.

ترتیب‌بندی مسیر پیام رسانی چنانکه در فصول بعدی یاد می‌گیریم بیان بسیاری از ژن‌های یوکاریوتی توسط مسیر پیام رسانی تنظیم می‌شود که توسط هورمون‌ها، فاکتورهای رشد یا سایر علائم شروع می‌شوند. چنین مسیرهای پیام‌رسانی ممکن است شامل چندین ترکیب باشد و تجزیه تحلیل موجود جهش یافته دوگانه اغلب اوقات می‌تواند نگرشی بر عملکردها و میانکنش‌های این ترکیبات، فراهم

1- Trp operon



▲ **شکل ۸-۵ تجزیه‌تحلیل جهش یافته‌های دوگانه اغلب ترتیب مراحل درمسیرهای پیام‌رسانی‌یابیوسنتزی را می‌توانند مشخص کند.** وقتی جهش‌ها در دو ژن متفاوت باشند یک فرآیند سلولی را تحت تاثیر قرار خواهند داد ولی فنوتیپ‌های متفاوتی خواهند داشت. فنوتیپ یک موجود جهش یافته اغلب می‌تواند ترتیبی را که در آن دو ژن بایستی عمل کنند را نمایان کند. (a) در مورد جهش‌هایی که مسیر بیوسنتزی همسان را تحت تاثیر قرار می‌دهند، در موجود جهش یافته حدواسط مرحله‌ای که پروتئین در نوع وحشی بر روی آنها عمل کاتالیز انجام می‌داد، تجمع خواهند یافت. (b) بررسی جهش یافته دوگانه یک مسیر پیام رسانی اگر دو جهش اثرات مخالف روی بیان یک ژن گزارشگر داشته باشند، امکان‌پذیر است. در این حالت، فنوتیپ مشاهده شده موجود جهش یافته دوگانه (موجود دارای دو جهش) اطلاعاتی را درباره ترتیبی که پروتئین‌ها عمل می‌کنند و اینکه آیا آنها تنظیم کننده‌های منفی هستند یا مثبت، فراهم می‌آورد.

کند. لازمه به دست آوردن اطلاعات مفید از این نوع تجزیه تحلیل آن است که دو جهش بایستی اثرات مخالف روی خروجی همان مسیر تنظیم شده داشته باشند. معمولاً، یک جهش، بیان یک ژن گزارشگر[1] خاص حتی وقتی که پیام موجود است را سرکوب می‌کند، در حالیکه جهش دیگر باعث بیان ژن گزارشگر می‌شود حتی وقتی که پیامی وجود ندارد (مانند بیان دائمی). همانطور که در شکل ۸-۵ مشخص است، دو مکانیسم تنظیمی ساده با چنین موجودات جهش یافته منفرد، سازگار است ولی فنوتیپ جهش یافته دوگانه می‌تواند بین آنها تمایز ایجاد کند. این راهکار عمومی ژنتیکدان‌ها را قادر ساخته است که بسیاری از مراحل کلیدی را در برخی مسیرهای تنظیمی مختلف طراحی کنند و آن مرحله را برای سنجش‌های بیوشیمیایی اختصاصی تنظیم کنند.

توجه داشته باشید که این تکنیک متفاوت از تجزیه تحلیل مکمل سازی است که در آن وقتی که دو جهش مغلوب مورد آزمایش هستند، (جهش یافته دوگانه ایجاد شده برای هر دو جهش هموزیگوت است). بعلاوه، جهش یافته‌های غالب می‌توانند مورد تجزیه تحلیل جهش دوگانه قرار گیرند.

سرکوب ژنی و مرگ آوری سنتتیک[2] می‌توانند پروتئین‌های میانکش دهنده یا کاهش یافته را نمایان کنند

دو نوع دیگر از تجزیه تحلیل ژنتیکی می‌تواند راهنمایی بیشتری در مورد اینکه پروتئین‌هایی که در یک فرآیند سلولی عمل می‌کنند چگونه با یکدیگر در سلول زنده ممکن است میانکش دهند را فراهم می‌آورد. هر دو این روش‌ها (که در بیشتر موجودات آزمایشگاهی قابل اجرا هستند)، شامل استفاده از موجودات دارای دو جهش است که در آن‌ها اثرات فنوتیپی یک جهش توسط وجود جهش دیگر تغییر داده می‌شود.

جهش‌های سرکوبگر: اولین نوع از بررسی بر پایه سرکوب ژنتیکی است. برای درک این پدیده، فرض کنید که جهش‌های نقطه‌ای منجر به تغییرات ساختاری در یک پروتئین (A) می‌شود که توانایی پروتئین را برای ارتباط با پروتئین (B) از بین می‌برد که در همان فرآیند سلولی نقش دارد. جهش‌های پروتئین B منجر به تغییرات ساختاری می‌شود که توانایی آن برای میانکش با پروتئین (A) را مهار می‌کند. فرض کنید که عملکرد طبیعی پروتئین‌های A و B به میانکنش آنها وابسته است. از لحاظ نظری، یک تغییر ساختاری ویژه در پروتئین A امکان دارد توسط تغییر جبران شده در پروتئین B سرکوب شود که به پروتئین‌های جهش یافته اجازه میانکش با

1-Reportergene 2-Synthetic lethal

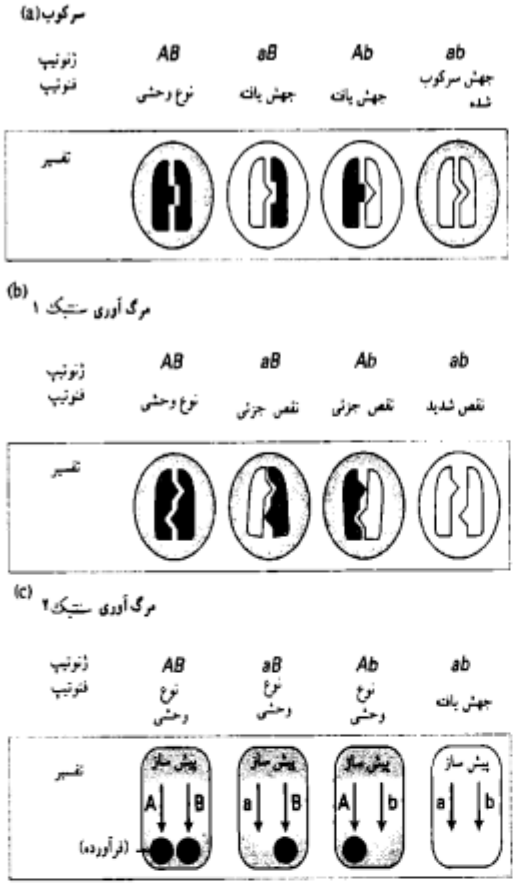
یکدیگر را می‌دهد. در حالات نادر که چنین جهش‌های سرکوبگر اتفاق می‌افتند، سوش‌های حامل هر دو آلل جهش یافته طبیعی خواهند بود، در صورتیکه سوش‌هایی که فقط در یکی از آلل‌ها جهش یافته هستند، فنوتیپ جهش یافته را خواهند داشت.

مشاهده سرکوب ژنتیکی در سوش‌های مخمری که حامل یک آلل اکتین جهش یافته (act-1) و یک جهش ثانویه (Sac6) در یک ژن دیگر هستند مدارک اولیه‌ای را مبتنی بر میانکش مستقیم در داخل موجود زنده (in vivo) بین این دو پروتئین که توسط دو ژن رمزدار می‌شوند را فراهم آورد. مطالعات بیوشیمیایی بعدی نشان داد که این دو پروتئین (Act-1 و Sac6) در ساخت ساختارهای اکتین کارآمد در داخل سلول نقش دارند.

جهش‌های مرگ آور سنتتیک: پدیده دیگر، **مرگ آوری سنتتیک**، نامیده می‌شود که اثر فنوتیپی مخالف با سرکوب را تولید می‌کند. در این حالت اثر مضر یک جهش توسط جهش دوم در یک ژن مرتبط بسیار شدیدتر می‌شود (به جای اینکه سرکوب شود). حالتی که در آن چنین جهش‌های مرگ آور سنتتیک می‌توانند اتفاق بیفتد در شکل ۹-۵ آورده شده است. در این مثال، یک پروتئین هترودیمر به طور جزئی توسط جهش‌هایی در هر یک از زیرواحدهای ناهمسان غیرفعال شده است. به هر حال، در موجودات دارای دو جهش که جهش‌های خاصی را در ژن‌های رمزدار کننده هر دو زیرواحد حمل می‌کنند، میانکنش کمی بین زیرواحدها وجود دارد که نتیجه اثرات فنوتیپی شدید است. جهش‌های مرگ آور سنتتیک همچنین ژن‌های غیرلازم را که در مسیرهای کاهش یافته برای تولید یک ترکیب سلولی اساسی را رمزدار می‌کنند می‌تواند نمایان کند. چنانچه در شکل ۹-۵ ترسیم شده است، اگر هر مسیر به تنهایی توسط یک جهش غیرفعال شود، مسیر دیگر قادر به تأمین محصول مورد نیاز خواهد بود. به هر حال، اگر هر دو مسیر در یک زمان غیرفعال شوند، محصول لازم نمی‌تواند سنتز شود و بدین ترتیب موجودات دارای دو جهش، قابلیت زیست نخواهند داشت.

ژن‌ها توسط نقشه مکانی شان بر روی کروموزوم می‌توانند شناسایی شوند

مباحث قبلی از تجزیه تحلیل ژنتیکی توضیح داد که یک ژنتیکدان چگونه می‌تواند دیدی نسبت به عملکرد ژن توسط مشاهده اثرات فنوتیپی تولید شده توسط الحاق ترکیبات مختلف از آلل‌های جهش یافته به همدیگر در سلول یا موجود زنده به دست آورد. برای مثال، ترکیبات آلل‌های مختلف از یک ژن در یک موجود دیپلوئید می‌تواند



▲ **شکل ۹-۵ جهش‌هایی که نتیجه‌اش سرکوب ژنتیکی یا مرگ آوری سنتتیک است پروتئین‌های کاهش یافته یا میانکش دهنده را نمایان خواهد کرد.** (a) مشاهده اینکه موجود دارای دو جهش با پروتئین‌های معیوب (B,A) فنوتیپ موجود نوع وحشی را دارند، و همچنین مشاهده اینکه موجودات دارای یک جهش یک فنوتیپ جهش یافته را می‌دهند حاکی از این است که عملکرد هر دو پروتئین به میانکش آنها با یکدیگر بستگی دارد. (b) مشاهده اینکه موجودات دارای دو جهش نقص فنوتیپی بسیار شدیدتری از موجودات دارای یک جهش دارند گواه بر این است که دو پروتئین (مثلا زیرواحدهای یک هترودیمر) برای داشتن عملکرد طبیعی باید با هم میانکش بدهند. (c) مشاهده اینکه موجود دارای دو جهش نمی‌تواند زنده بماند ولی موجودات دارای یک جهش فنوتیپ نوع وحشی را دارند نشان دهنده این است که دو پروتئین در مسیرهایی عمل می‌کنند که یک محصول اساسی را تولید می‌کنند.

برای تعیین اینکه آیا یک جهش غالب است یا مغلوب و یا اینکه دو جهش مغلوب متفاوت روی همان ژن هستند یا نه، استفاده شود. بعلاوه، ترکیب جهش‌ها در ژن‌های مختلف می‌تواند برای تعیین ترتیب عملکرد ژنی در یک مسیر یا برای شناسایی ارتباطات

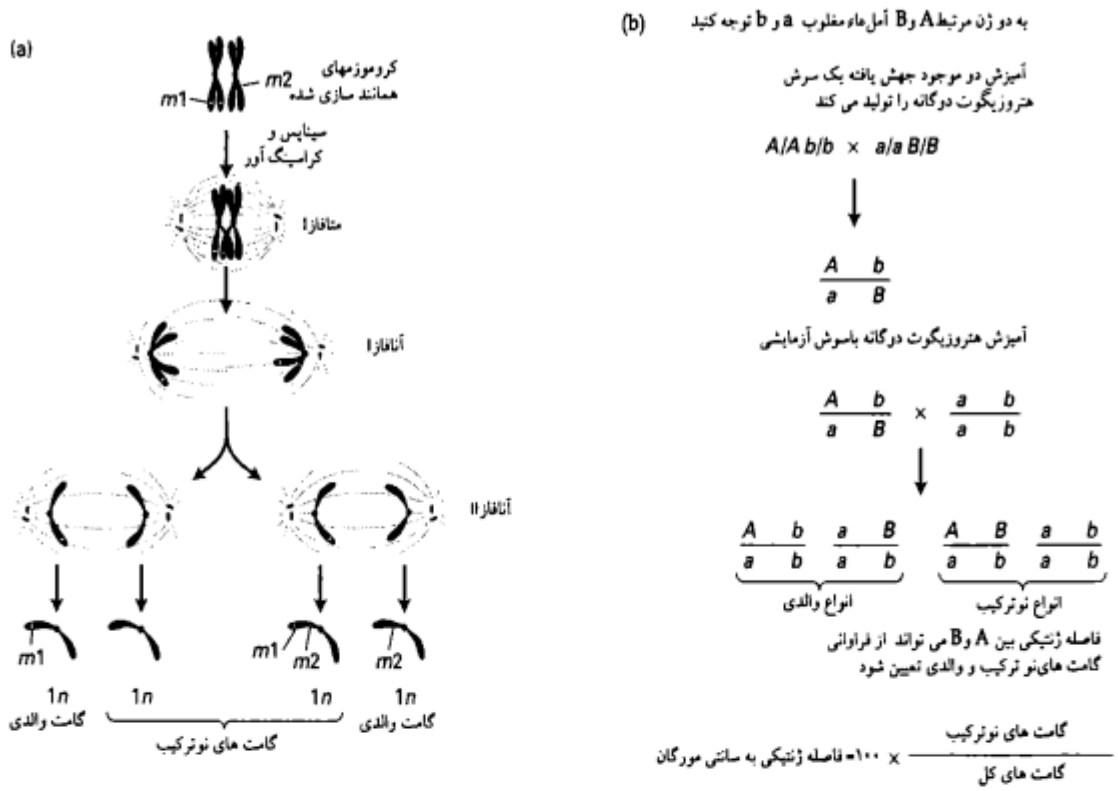
عملکردی بین ژن‌ها مانند سرکوب و افزایش سنتز، استفاده شود. همه این روش‌ها می‌توانند بعنوان آزمایشهای تحلیلی بر پایه **عملکرد ژن** مورد نظر قرار گیرند. اکنون ما یک نوع کاملا متفاوت از تجزیه تحلیل ژنتیکی راکه بر اساس مکان ژن بر روی یک کروموزوم است، مورد توجه قرار خواهیم داد. مطالعات طراحی شده به منظور تعیین موقعیت یک ژن روی یک کروموزوم، اغلب اوقات مطالعات **نقشه برداری ژنتیکی** نامیده می‌شود و می‌تواند برای شناسایی ژن تحت تاثیر قرار گرفته توسط یک جهش خاص یا برای تعیین اینکه آیا دو جهش در روی یک ژن هستند یا نه مورد استفاده قرار گیرد. در بسیاری از موجودات زنده، مطالعات نقشه برداری ژنتیکی تکیه بر تبادلات اطلاعات ژنتیکی دارد که در طی میوز اتفاق می‌افتد. دارد. چنانکه در فصل ۴ توضیح داده شده و در شکل ۱۰-۵ نشان داده شده است، نوترکیبی ژنتیکی می‌تواند قبل از اولین تقسیم میوزی در سلول‌های زایا اتفاق بیفتد. یعنی وقتی که کروموزوم‌های همانندسازی شده از هر جفت هومولوگ با همدیگر در یک ردیف قرار بگیرند. در این زمان توالی‌های DNAی هومولوگ روی کروماتیدهای مادری و پدری می‌توانند با همدیگر مبادله شوند که این فرآیند را کراسینگ آور می‌گویند. ما اکنون می‌دانیم که کراسینگ‌آورهای حاصل بین کروموزوم‌های هومولوگ ارتباط‌های ساختاری به وجود می‌آورد که برای جدایی صحیح جفت کروماتیدهای هومولوگ به طرف قطبین سلول در طی اولین تقسیم میوزی مهم هستند.

به دو جهش متفاوت توجه کنید، که هر یک از هر والد به ارث رسیده است، و نزدیک یکدیگر روی همان کروموزوم واقع شده‌اند، دو نوع گامت متفاوت می‌تواند برطبق اینکه کراسینگ‌آور بین جهش‌ها در طی میوز اتفاق بیفتد، ایجاد شود. اگر کراسینگ‌آور بین آنها اتفاق نیفتد، گامت‌هایی که انواع والدی نامیده می‌شوند، و دارای یک جهش و یا جهش دیگر هستند، ایجاد خواهند شد. برخلاف آن، اگر کراسینگ‌آور بین دو جهش اتفاق بیفتد، گامت‌هایی که بعنوان انواع نوترکیب شناخته می‌شوند، ایجاد خواهند شد. در این مثال کروموزوم‌های نوترکیب دارای هر دو جهش و یا فاقد هر دوی آنها خواهند بود. این جایگاههای نوترکیبی بیشتر یا کمتر بصورت تصادفی، در طول کروموزوم وجود دارند. هر اندازه دو ژن به هم نزدیک‌تر باشند، نوترکیبی که بین آنها در طی میوز اتفاق می‌افتد کمتر است. بعبارت دیگر، نوترکیبی با فراوانی کمتری بین دو ژن بر روی همان کروموزوم اتفاق می‌افتد به خاطر اینکه آنها بطور محکمی با هم مرتبط بوده و به هم نزدیکتر هستند. دو ژن که به طور کافی به همدیگر نزدیک هستند چنانکه گامت‌های نوترکیب ایجاد شده کمتری نسبت به گامت‌های والدی دارند، به نظر می‌رسد که از لحاظ ژنتیکی به هم متصل هستند.

تکنیک نقشه برداری نوترکیبی در سال ۱۹۱۱ توسط اِی.استورتوانت[1] در حالیکه او در آزمایشگاه تی.اچ.مورگان[2] کار می‌کرد در دانشگاه کلمبیا ارائه داده شد. این تکنیک در ابتدا بر روی مگس سرکه استفاده شد و اکنون برای ارزیابی فاصله بین دو جایگاه ژنی بر روی یک کروموزوم در بسیاری از موجودات آزمایشگاهی استفاده می‌شود. یک آزمایش معمول طراحی شده برای تعیین نقشه فاصله بین دو موقعیت ژنتیکی شامل دو مرحله خواهد بود. در اولین مرحله، یک سوش ایجاد می‌شود که حامل یک جهش متفاوت در هر موقعیت یا لوکوس است. در مرحله دوم زاده‌های این سوش برای تعیین فراوانی نسبی توارث از انواع والدی و نوترکیبی، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. یک روش معمول برای تعیین فراوانی نوترکیبی بین دو ژن، آمیزش دادن یک والد هتروزیگوت دیپلوئید در هر مکان ژنی با والد دیگر هوموزیگوت برای هر ژن است. در چنین آمیزشی، نسبت زاده‌های نوترکیب به آسانی تعیین می‌شود، به این خاطر که فنوتیپ‌های نوترکیب از فنوتیپ‌های والدی فرق خواهند داشت. برحسب توافق، یک واحد نقشه ژنتیکی به عنوان فاصله بین دو مکان در طول یک کروموزوم است که نتیجه‌اش یک فرد نوترکیب در بین ۱۰۰ زاده است. فاصله مرتبط با این فراوانی یک درصد، یک **سانتی مورگان** (cM) برای احترام به استاد استورتونت یعنی مورگان نامیده می‌شود. (شکل ۱۰b-۵ را ملاحظه کنید).

توضیح کامل از روش‌های آزمایش‌های نقشه برداری ژنتیکی فراتر از این توضیح اولیه وجود دارد: به هر حال، دو ویژگی از اندازه‌گیری فاصله توسط نقشه برداری نوترکیبی نیاز به بررسی جزئی دارد. اول، فراوانی تبادل ژنتیکی بین دو جایگاه که منحصراً متناسب با فاصله فیزیکی در جفت بازهای جداکننده آنها تنها برای جایگاه‌هایی است که نسبتا نزدیک به همدیگر هستند (گفته می‌شود، کمتر از حدود ۱۰ سانتی مورگان). برای جایگاه‌هایی که فاصله بیشتر از این اندازه دارند، فاصله اندازه گرفته شده توسط فراوانی تبادل ژنتیکی در تخمین فاصله خطا ایجاد می‌کند به این خاطر که امکان دارد دو یا چند کراسینگ‌آور در این فاصله اتفاق بیفتد. در این حالت محدودکننده که در آن تعداد انواع نوترکیب با تعداد انواع والدی مساوی خواهند بود، دو جایگاه تحت بررسی می‌توانند جدا از هم روی همان کروموزوم یا

1- A.Sturtevant 2- T.H.Morgan



▲ **شکل ۱۰-۵ (شکل رنگی) • نوترکیبی در طی میوز می‌تواند برای نقشه برداری موقعیت ژن‌ها به کار رود.** (a) فردی حامل دو جهش m_1 و m_2 (سبز) که روی قسمت‌های مادری و پدری همان کروموزوم هستند، نشان داده شده است. اگر کراسینگ‌آور در فاصله بین m_1 و m_2 قبل از اولین تقسیم میوزی اتفاق بیفتد دو گامت نوترکیب ایجاد می‌شوند که یکی حامل m_1 و دیگری حامل m_2 است در صورتیکه بقیه گامت‌ها هیچکدام از آنها را ندارند. با بیشتر شدن فاصله بین دو جهش روی یک کروماتید، به نظر می‌رسد که آنها توسط نوترکیبی جدا شده‌اند و نسبت بیشتری از گامت‌های نوترکیبی تولید شده‌اند. (b) در آزمایش نقشه برداری معمول، یک سوش که برای دو ژن متفاوت هتروزیگوت است ایجاد شد. فراوانی گامت‌های والدی و نوترکیب ایجاد شده توسط این سوش می‌تواند از فنوتیپ‌های زاده‌ها در آمیزش آزمایشی با سوش مغلوب هوموزیگوت تعیین شود. فاصله نقشه ژنتیکی سانتی مورگان (cM) بصورت درصد گامت‌های نوترکیب نشان داده می‌شود.

می‌توانند روی کروموزوم‌های متفاوت باشند و در چنین حالاتی جایگاه مورد بررسی **غیرمرتبط** به نظر می‌رسد.

دومین مفهوم مهم که برای تفسیر آزمایش‌های نقشه برداری ژنتیکی در انواع مختلفی از موجودات زنده لازم است، این است که اگرچه فاصله ژنتیکی به همان طریق برای موجودات مختلف تعیین می‌شود ولی رابطه بین فراوانی نوترکیبی (فاصله نقشه ژنتیکی از این قبیل) و فاصله فیزیکی بین موجودات فرق می‌کند. برای مثال، فراوانی نوترکیبی یک درصد (مثلا، یک فاصله ژنتیکی از یک سانتی مورگان cM) حاکی از فاصله نزدیکی در حدود ۲/۸ کیلوباز در مخمر و در حدود ۴۰۰ کیلوباز در مگس سرکه دروزوفیلا و در حدود ۷۸۰ کیلوباز در انسان است.

یکی از استفاده‌های عمده از مطالعات نقشه برداری، مکان‌یابی ژنی است که توسط یک جهش مورد نظر تحت تاثیر قرار گرفته است. وجود مشخصه‌های ژنتیکی نقشه برداری شده از قبل موجودبسیار متفاوت یا نشانگرهای ژنتیکی[1]، که در طول کروموزوم توزیع شده‌اند و اجازه می‌دهند که موقعیت و مکان یک جهش نقشه برداری نشده توسط ارزیابی جدایی آن با توجه به ژن‌های نشانگر در طی میوز، تعیین شود. بنابراین هرچه نشانگرهای بیشتری در دسترس باشند، یک جهش دقیق‌تر می‌تواند نقشه برداری شود. در قسمت ۵-۴ ما می‌بینیم که چگونه ژن‌های تحت تاثیر قرار گرفته در بیماریهای ارثی انسان می‌توانند با استفاده از این روش شناسایی شوند. دومین استفاده عمومی از آزمایش‌های نقشه برداری تعیین این است که آیا دو جهش متفاوت در روی یک ژن هستند یا نه، اگر دو جهش در روی یک ژن باشند، آنها ارتباط محکمی را در آزمایش‌های

1-Genetic markers

نقشه برداری نشان خواهند داد ولی اگر آنها در ژن‌های متفاوت باشند، آنها معمولاً به هم مرتبط نیستند و یا ارتباط ضعیفی را نشان می‌دهند.

نکات کلیدی بخش ۱-۵

بررسی ژنتیک جهش‌ها جهت شناسایی و مطالعه ژن‌ها

- موجودات دیپلوئید دو نسخه (آلل) از هر ژن و موجودات هاپلوئید یک نسخه از آن را دارا می‌باشند.
- جهش‌های مغلوب منجر به فقدان عملکرد می‌شود. اما اگر آلل طبیعی ژن موجود باشد، اثر جهت مغلوب پوشش داده می‌شود. برای بروز فنوتیپ جهش یافته بایستی هر دو آلل جهش یابند.
- جهش‌های غالب منجر به ایجاد فنوتیپ جهش یافته در حضور آلل طبیعی از ژن می‌شوند. فنوتیپ‌های مرتبط با جهش‌های غالب اغلب کسب عملکرد را نشان می‌دهند اما در مورد بعضی از ژن‌ها در نتیجه فقدان عملکرد هستند.
- در میوز سلول دیپلوئید، DNA یکبار همانندسازی کرده و دو بار تقسیم سلولی رخ داده و باعث ایجاد چهار سلول هاپلوئید می‌شود. در این سلول‌های ایجادشده آلل‌های پدری و مادری بطور تصادفی توزیع می‌شوند (شکل ۳-۵ را ملاحظه کنید).
- جهش‌های غالب و مغلوب الگوی تفکیک خاصی درآمیزش‌های ژنتیکی دارند (شکل ۴-۵ را ملاحظه کنید).
- در مخمر هاپلوئید جهش‌های حساس به حرارت کاربرد خاصی برای تشخیص و مطالعه ژن‌های ضروری برای بقاء دارند.
- تعداد ژن‌های مرتبط از لحاظ عملکرد در یک فرآیند را می‌توان با بررسی‌های مکمل‌سازی تعیین نمود (شکل ۷-۵ را ملاحظه کنید).
- ترتیبی که در آن ژن‌ها در مسیر پیام‌رسانی عمل می‌کنند را می‌توان از فنوتیپ جهش‌یافته‌های دوگانه‌ای که در آن دو مرحله در فرآیند پیام‌رسانی معیوب شده‌اند بررسی نمود.
- میانکنش‌های مهم از لحاظ عملکردی بین پروتئین‌ها را می‌توان از تاثیرات فنوتیپی جهش‌های خاموش کننده ویژه آلل یا جهش‌های کشنده ساختگی بررسی نمود.
- آزمایش‌های نقشه ژنتیکی از کراسینگ‌اور بین کروموزوم‌های هومولوگ طی میوز برای اندازه‌گیری فاصله بین دو جهش متفاوت روی یک کروموزوم استفاده می‌کند.

۵-۲ تعیین خصوصیت و کلون کردن DNA

مطالعات جزئی ساختار و عملکرد یک ژن در سطح مولکولی نیاز به مقادیر زیادی ژن به صورت خالص دارد. تعدادی از تکنیک‌ها که غالبا تکنولوژی DNA نوترکیب نامیده می‌شوند برای **کلونینگ DNA** مورد استفاده قرار می‌گیرند و به محققان اجازه می‌دهند که تعداد زیادی از مولکول‌های DNAی مشابه را تهیه کنند. **DNAی نوترکیب** بطور ساده هر مولکول تشکیل شده از توالی‌های حاصل از منابع مختلف است.

کلید کلونینگ یک قطعه DNA مورد نظر ارتباط دادن آن با مولکول DNAی **حامل**[1] است که می‌تواند داخل سلول میزبان همانندسازی شود. بعد از اینکه یک مولکول DNAی نوترکیب متشکل از حامل بعلاوه یک قطعه DNAی وارد شده به آن به داخل سلول میزبان وارد شد، DNAی وارد شده همراه با حامل همانندسازی شده و تعداد زیادی از مولکول‌های DNA را تولید خواهد کرد.

طرح پایه می‌تواند به صورت زیر خلاصه شود:

قطعه DNA + حامل

↓

DNA نوترکیب

↓

همانندسازی DNA نوترکیب در داخل سلول‌های میزبان

↓

جداسازی، تعیین توالی و دستکاری قطعه DNA خالص سازی شده

اگرچه محققان تعدادی تغییرات تجربی در این طرح داده‌اند، دیاگرام فعلی حاکی از مراحل اساسی کلونینگ DNA است. در این قسمت، ما ابتدا روش‌هایی را برای جداسازی توالی خاص در DNA از دریایی از توالی‌های DNA توضیح می‌دهیم. اغلب این فرآیند شامل برش دادن ژنوم به قطعات کوچکتر و قرار دادن هر قطعه در یک حامل است، چنانکه مجموعه کامل می‌تواند بعنوان مولکول‌های نوترکیب در سلول‌های میزبان جدا از هم زیاد شود. در حالی که انواع مختلفی از حامل‌ها وجود دارند، بحث ما عمدتاً بر روی پلاسمیدهای حامل در سلول‌های میزبان E.Coli خواهد بود که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند. تکنیک‌های متعددی می‌توانند برای شناسایی توالی مورد نظر از مجموعه قطعات DNA که به صورت کتابخانه DNA شناخته می‌شود به کار روند. زمانی که یک قطعه DNA خالص

1- Vector

جداسازی می‌شود، معمولاً با تعیین توالی دقیق نوکلئوتیدها در مولکول شناسایی میشود. ما بحث را با PCR به پایان می‌رسانیم. این تکنیک قدرتمند و قابل استفاده می‌تواند به طرق مختلف برای تولید مقادیر زیادی از توالی خاص و بعبارت دیگر DNAی دستکاری شده در آزمایشگاه به کار رود. استفاده‌های متعدد از قطعات DNAی کلون شده در بخش‌های بعدی توضیح داده شده‌اند.

آنزیم‌های محدودگر و DNA لیگازها اجازه ورود قطعات DNA به داخل حامل‌های کلونینگ را می‌دهند

موضوع مهم کلونینگ DNA کسب نواحی کوچک و مجزایی از DNA موجود زنده است که دارای ژن‌های خاص است. بعلاوه، فقط مولکول‌های DNAی کوچک می‌توانند در هر یک از حامل‌های موجود کلون شوند. به این دلایل، مولکول‌های DNA بزرگ که ژنوم موجود زنده را تشکیل می‌دهند بایستی به قطعاتی که می‌توانند در DNAی حامل وارد شوند، شکسته شوند. دو آنزیم (**آنزیم‌های محدودگر و DNA لیگازها**) تولید چنین مولکول‌های DNA نوترکیب را تسهیل می‌کنند.

برش دادن مولکول‌های DNA به قطعات کوچک آنزیم‌های محدودگر آندونوکلئازهایی هستند که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند و به طور عمومی توالی‌های ۸-۴ جفت بازی ویژه را شناسایی می‌کنند که **جایگاههای محدودگر**[1] نامیده می‌شوند و سپس هر دو رشته DNA را در این جایگاه می‌شکنند. جایگاه‌های محدودگر معمولاً توالی‌های **پالیندرومی**[2] کوتاهی هستند که توالی جایگاه محدود است که بر روی هر رشته DNA وقتی که از جهت ۳′→۵′ خوانده می‌شود، همان توالی را دارد (شکل ۱۱-۵).

برای هر آنزیم محدودگر، باکتری‌ها یک آنزیم **تغییر دهنده** دارند که DNA باکتری را از شکست توسط تغییر DNA در جایگاه شکست یا نزدیک به این جایگاه حمایت می‌کند. آنزیم تغییر دهنده، یک گروه متیل به یک یا دو باز اضافه می‌کند که معمولاً در داخل جایگاه محدودگر هستند. وقتی یک گروه متیل در آنجا موجود باشد، جلوی آندونوکلئاز محدود کننده برای برش دادن DNA گرفته می‌شود. همراه با آندونوکلئاز محدود کننده، آنزیم متیله کننده سیستم تغییر محدودگر[3] را تشکیل می‌دهد که DNA میزبان را حمایت می‌کند در حالی که DNA خارجی وارد شده را، (مثلا، DNA باکتریوفاژ یا DNA جذب شده در طی دریافت ژن) در همه جایگاههای محدود کننده در DNA شکسته و از بین می‌برد.

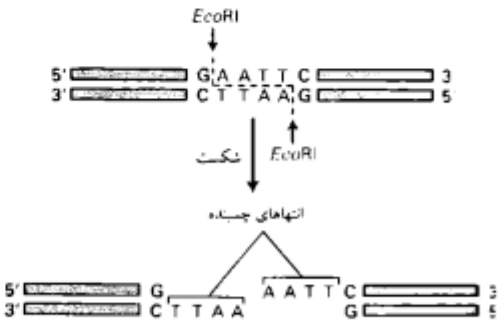
بیشتر آنزیم‌های محدود کننده برش‌های متناوب در دو رشته DNA در جایگاه شناخت‌شان ایجاد می‌کنند و قطعاتی را تولید می‌کنند که دارای دنباله تک رشته‌ای در هر دو انتها هستند (انتهاهای چسبنده) (شکل ۱۱-۵ را ملاحظه کنید). دنباله‌ها بر روی قطعات تولید شده در جایگاه محدود شده حاصل، مکمل آنهایی هستند که بر روی تمام قطعات تولید شده توسط همان آنزیم محدود کننده است. در دمای اتاق، این نواحی تک رشته‌ای می‌توانند با قطعات DNAی تولید شده توسط همان آنزیم محدود کننده به طور موقت جفت باز تشکیل بدهند. تعدادی از آنزیم‌های محدودگر، از قبیل AluI و SmaI هر دو رشته DNA را در همان نقطه داخل جایگاه محدود کننده می‌شکنند و قطعاتی با انتهاهای کند ایجاد می‌کنند که در آن همه نوکلئوتیدها در انتهاهای قطعه با نوکلئوتیدهای رشته مکمل جفت باز ایجاد کرده‌اند. DNAی جداسازی شده از یک موجود زنده توالی ویژه‌ای دارد که به طور شانسی دارای یک عده جایگاههای محدود کننده ویژه خواهد بود. بنابراین یک آنزیم محدودگر DNA از یک منبع خاص را به یک عده قطعات قابل تجزیه که **قطعات محدود شده** نامیده می‌شوند، برش خواهد داد. فرکانسی که آنزیم محدودگر DNA را برش می‌دهد و همچنین اندازه میانگین قطعات محدودشده حاصل، به طور عمده به اندازه جایگاه شناسایی بستگی خواهد داشت. برای مثال، آنزیم محدودگری که یک توالی ۴ جفت بازی را شناسایی می‌کند DNA را با میانگین 4^4 یا ۲۵۶، جفت باز یک بار می‌شکند، در صورتیکه آنزیمی که یک توالی ۸ جفت بازی را می‌شناسد هر 4^8 جفت باز (۶۵ کیلوباز) یک بار شکست ایجاد خواهد کرد. آنزیم‌های محدودگر از چندین صد گونه مختلف از باکتری‌ها خالص سازی شده‌اند و به مولکول‌های DNA اجازه دهند که در تعداد زیادی از توالی‌های مختلف مرتبط با جایگاههای شناخت این آنزیم‌ها برش داده شوند.

وارد کردن قطعات DNA به داخل حامل‌ها: قطعات DNA هم با انتهاهای چسبنده و هم با انتهاهای غیرچسبنده می‌توانند با کمک آنزیم‌های DNA لیگاز به داخل یک حامل DNA وارد شوند. در طی همانندسازی طبیعی DNA، DNA لیگاز عمل اتصال انتهای به انتها قطعات کوتاه DNA را که **قطعات اوکازاکی** نامیده می‌شوند، انجام می‌دهد. به منظور کلونینگ DNA، DNA لیگاز خالص سازی شده به منظور اتصال کووالان انتهاهای یک قطعه محدود شده و DNAی حامل استفاده می‌شود که انتهاهای مکمل دارند (شکل ۱۲-۵). DNAی حامل و قطعه محدود شده از طریق

1-Restriction sites 2-Palinromic sequences
3- Restriction- modification system

جدول ۱-۵ آنزیم های محدودگر منتخب و توالی های شناسایی آنها

آنزیم	منبع میکروارگانیسمی	جایگاه شناسایی	انتهاهای تولید شده
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑	Sticky
*Sau*3A	*Staphylococcus aureus*	↓ -G-A-T-C- -C-T-A-G- ↑	Sticky
*Eco*RI	*Escherichia coli*	↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G ↑	Sticky
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↑	Sticky
*Sma*I	*Serratia marcescens*	↓ -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- ↑	Blunt
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	↓ -G-C-G-G-C-C-G-C- -C-G-C-C-G-G-C-G- ↑	Sticky



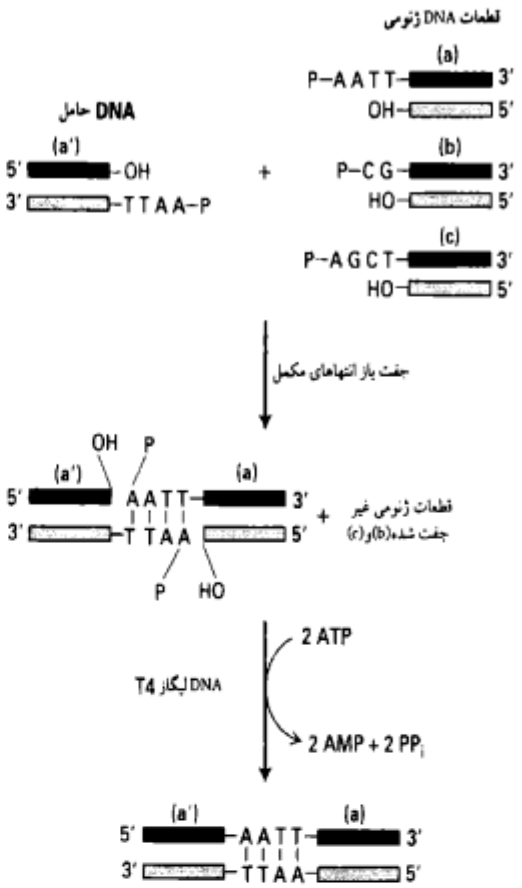
▶ شکل ۱۱-۵ شکست DNA توسط آنزیم محدودکننده EcoRI.
این آنزیم محدودکننده از *E.Coli* برشهای متناوب در توالی پالیندرومی ۶ جفت بازی خاص نشان داده شده، ایجاد می‌کند و قطعاتی با انتهاهای چسبنده مکمل تک رشته‌ای را ایجاد می‌کنند. بسیاری از آنزیم‌های محدودکننده دیگر نیز قطعاتی با انتهاهای چسبنده ایجاد می‌کنند.

پیوندی فسفودی استر ′۵→′۳ استاندارد DNA به هم متصل می‌شوند. علاوه بر اتصال انتهاهای چسبنده مکمل، آنزیم DNA لیگاز باکتریوفاژ T_4 می‌تواند DNA هر دو انتهای غیرچسبنده را به هم متصل کند. به هر حال اتصال انتهای غیرچسبنده به طور ذاتی کمتر است و نیاز به غلظت بالاتر DNA و DNA لیگاز نسبت به متصل کردن انتهای چسبنده دارد.

حامل‌های پلاسمیدی E.Coli برای کلونینگ قطعات DNAی جداسازی شده مناسب هستند

پلاسمیدها[1] مولکول‌های DNA کروی، و دو رشته‌ای هستند که جدا از DNA کروموزومی سلول هستند. این DNAهای خارج کروموزومی به طور طبیعی در باکتری‌ها و در سلول‌های یوکاریوتی

1-Plasmids



▲ **شکل ۱۲-۵ اتصال قطعات محدود شده با انتهاهای چسبنده مکمل.** در این مثال، DNA حامل بریده شده با EcoRI با یک نمونه دارای قطعات محدود شده ایجاد شده با شکست DNA ژنومی دارای چندین آنزیم محدودگر متفاوت، مخلوط گردید. توالی‌های بازی کوتاه تشکیل دهنده انتهاهای چسبنده از هر نوع قطعه نشان داده شده‌اند. انتهای چسبنده روی جفت بازهای DNA(a′) حامل بریده شده فقط با انتهاهای چسبنده بر روی قطعه حاصل از عمل ECoRI(a) جفت باز تشکیل می‌دهد. هیدروکسل ′۳ مجاور و گروه فسفات ′۵ بر روی قطعات جفت بازی توسط DNA لیگاز T_4 به طور کووالان به هم متصل می‌شوند.

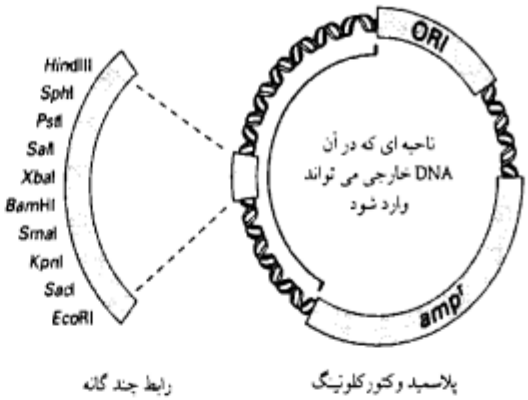
پست‌تر (از قبیل مخمر) وجود دارند و با سلول میزبانشان ارتباط انگلی یا همزیستی دارند. مانند DNAی کروموزومی سلول میزبان، DNAی پلاسمید قبل از هر تقسیم سلولی دو برابر می‌شود. در طی تقسیم سلول، نسخه‌های DNA پلاسمید به سلول‌های دختر تقسیم می‌شوند و ازدیاد متداوم پلاسمید را از طریق تولید مثل پی در پی سلول میزبان تضمین می‌کنند.

پلاسمیدهایی که اغلب در تکنولوژی DNA نوترکیب استفاده می‌شوند، آنهایی هستند که در *E.Coli* همانندسازی می‌کنند. محققان این پلاسمیدها را به منظور بهینه کردن استفاده از آنها بعنوان حامل‌هایی در کلونینگ DNA، مهندسی کرده‌اند. برای مثال، برداشت قسمت‌های غیرلازم از پلاسمیدهای *E.Coli* موجود طبیعی، حامل‌های پلاسمیدی با اندازه‌ای در حدود ۳-۱/۲ کیلوباز ایجاد می‌کند که دارای سه ناحیه اساسی برای کلونینگ DNA است: یک مبدأ همانندسازی، یک نشانگر که اجازه انتخاب را می‌دهد که معمولاً یک ژن مقاوم به دارو هست و ناحیه‌ای که در آن قطعات DNAی خارجی می‌توانند وارد شوند (شکل ۱۳-۵). آنزیم‌های سلول میزبان که پلاسمید را همانندسازی می‌کنند از مبدأ همانندسازی شروع می‌کنند (ORI) که یک توالی ویژه دارای ۱۰۰-۵۰ جفت باز است. زمانیکه همانندسازی DNA در ORI شروع شود، در طول پلاسمید کروی بدون توجه به توالی نوکلئوتیدی آن ادامه می‌یابد. بنابراین هر توالی DNA وارد شده به چنین پلاسمیدی، همراه با بقیه DNAی پلاسمید همانندسازی می‌شود.

شکل ۱۴-۵ روش عمومی برای کلون کردن یک قطعه DNAیی با استفاده از حامل‌های پلاسمیدی E.Coli را آورده است. وقتی که E.Coli با حامل DNAیی تحت شرایط‌خاص مخلوط شد، تعداد کمی از سلول‌ها پلاسمید را جذب خواهند کرد که به این فرآیند **تغییر شکل**[1] گفته می‌شود. معمولاً از هر ۱۰/۰۰۰ سلول یک سلول، مولکول DNA پلاسمیدی را وارد ژنوم خود می‌کند و بنابراین تغییر شکل می‌دهد. بعد از اینکه حامل‌های پلاسمیدی با E.Coli انکوبه شدند، سلول‌هایی که پلاسمید را جذب می‌کنند می‌توانند از سایر سلول‌ها انتخاب شوند. برای مثال، اگر پلاسمید ژنی را حمل کند که مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین دارد، سلول‌های تغییر شکل‌داده می‌توانند توسط رشد دادن آنها در یک محیط کشت دارای آمپی سیلین انتخاب شوند.

قطعات DNA از حدود چند جفت باز تا ۱۰ کیلوباز معمولاً وارد حامل‌های پلاسمیدی می‌شوند. وقتی که پلاسمید نوترکیب با یک قطعه DNA وارد شده در آن یک سلول E.Coli را تغییر شکل دهد، همه سلول‌های حاصل شده مقاوم به آنتی بیوتیک که از سلول تغییر شکل داده اولیه حاصل شده‌اند، دارای پلاسمیدهایی با همان DNA وارد شده خواهند بود. همگام با این که کلونی رشد می‌کند، DNA وارد شده همراه با DNAی پلاسمیدی همانندسازی کرده و به سلول‌های دختر تقسیم می‌شود. در این روش، قطعه ابتدایی DNA در کلونی سلولی به تعداد زیادی از نسخه‌های مشابه همانندسازی

1- Transformation



▲ **شکل ۱۳-۵ اجزاء اصلی یک حامل کلونینگ پلاسمیدی که می‌تواند در درون یک سلول E.Coli همانندسازی شود.** حامل‌های پلاسمیدی دارای یک ژن قابل انتخاب مانند amp^r هستند که آنزیم بتالاکتاماز را رمزدار می‌کند و مقاومت به آمپی سیلین را القا می‌کند. DNAی خارجی می‌تواند به داخل ناحیه مشخص شده با کروشه بدون ایجاد مزاحمت در توانایی پلاسمیدی برای همانندسازی با بیان ژن amp^r وارد شود. حامل‌های پلاسمیدی همچنین دارای یک توالی مبدأ همانندسازی (ORI) هستند که در آنجا همانندسازی DNA توسط آنزیم‌های سلول میزبان شروع می‌شود. ورود یک رابط چندگانه دارای توالی‌های مورد شناسایی برای چندین آنزیم محدودکننده متفاوت، قابلیت استفاده از یک حامل پلاسمیدی را افزایش می‌دهد. حامل چنان طراحی می‌شود که هر مکان برش در رابط چندگانه بر روی پلاسمید منحصر به فرد باشد.

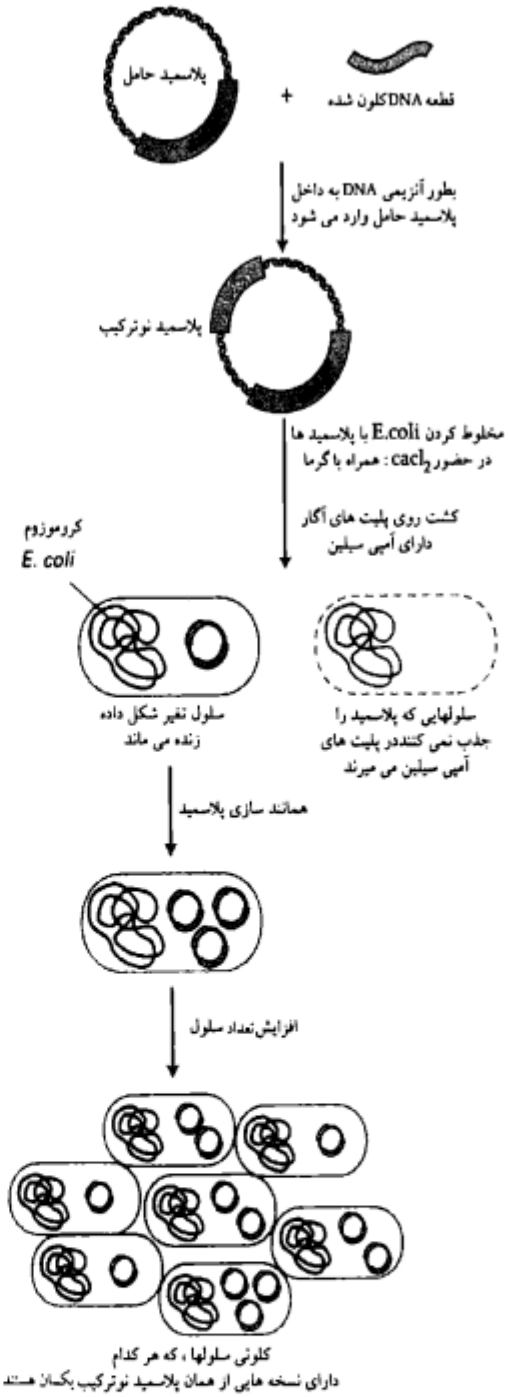
می‌کند. چون که سلول‌هایی که در یک کلونی هستند از یک سلول والدی تغییر شکل داده حاصل شده‌اند، یک **کلون**[1] از سلول‌ها را به وجود می‌آورند و قطعه ابتدایی DNA وارد شده به پلاسمید والدی بعنوان DNAی کلون شده یا یک کلون DNAیی اطلاق می‌گردد. قابلیت استفاده از حامل پلاسمیدی E.Coli با افزایش رابط چندگانه[2] که یک توالی مصنوعی دارای یک نسخه از چندین جایگاه محدود شده متفاوت است که جای دیگر از توالی پلاسمید وجود ندارند، افزایش می‌یابد (شکل ۱۳-۵ را ملاحظه کنید). زمانیکه چنین حاملی با آنزیم محدودکننده تیمار شود یک جایگاه محدود شده را در رابط چندگانه شناسایی می‌کند. حامل فقط یک بار آن هم در داخل رابط چندگانه برش داده می‌شود. سپس هر قطعه DNA با طول مناسب تولید شده با همان آنزیم محدودکننده می‌تواند با DNA لیگاز به پلاسمید وارد شود. پلاسمیدهای دارای رابط چندگانه به محقق اجازه می‌دهند که همان حامل پلاسمیدی را وقتی که قطعات DNA برای کلون کردن با آنزیم‌های محدودکننده مختلف تولید شده‌اند به کار رود که این امر روش‌های آزمایشگاهی را تسهیل می‌کند.

برای برخی اهداف، از قبیل جداسازی و دستکاری قطعات بزرگ ژنوم انسان، قطعات DNA بزرگتر از چندین مگاباز مورد نظر است (۱ مگاباز (Mb)= یک میلیون نوکلئوتید). برای این منظور حامل‌های پلاسمیدی ویژه‌ای که BAC (کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی) نامیده می‌شوند، گسترش داده شده‌اند. یک نوع BAC از یک مبدأ همانندسازی حاصل از یک پلاسمید درون زای E.Coli که بعنوان فاکتور F شناخته می‌شود، استفاده می‌کند. فاکتور F و حامل‌های کلونینگ منتج از آن، می‌تواند بطور ثابتی در یک نسخه بر هر سلول E.Coli حفظ شود حتی وقتی که آنها دارای توالی‌های وارد شده بیش از حدود ۲ مگاباز (Mb) باشند. ایجاد کتابخانه‌های BAC نیاز به روش‌های خاصی برای جداسازی، اتصال و انتقال قطعات بزرگ DNA دارد، زیرا قطعات DNAی بزرگ‌تر از حدود ۲۰ کیلوباز به شکست مکانیکی حتی با دستکاریهای استاندارد از قبیل پی‌پت کردن بسیار آسیب‌پذیر هستند.

کتابخانه‌های cDNAیی توالی‌های ژن‌های رمزدار کننده پروتئین‌ها را نشان می‌دهند.

یک مجموعه از مولکول‌های DNA که هر کدام داخل یک مولکول حامل کلون شده است بعنوان یک **کتابخانه DNA**[3]**یی** شناخته می‌شوند. وقتی DNA ژنومی از یک موجود زنده خاص منبع DNA می‌شود، عده‌ای از کلون‌ها که مجموعا تمام توالی‌های DNA را در ژنوم بروز می‌دهند بعنوان یک کتابخانه ژنومی شناخته می‌شوند. چنین کتابخانه‌های ژنومی برای نشان دادن محتوی ژنتیکی موجودات زنده نسبتا ساده مانند باکتری‌ها یا مخمر مناسب هستند، ولی سختی‌های آزمایشگاهی خاصی را برای یوکاریوت‌های عالی‌تر نشان می‌دهند. اولاً، ژن‌های چنین موجودات زنده‌ای معمولاً mRNA از یک نوع سلول و بافت مورد نظر است. به خاطر وجود دم پلی آدنین در mRNAها، آنها به راحتی از rRNAها و tRNAهای موجود در سلول با استفاده از زنجیره کوتاهی از تیمیدیلات (الیگو dT) متصل به بستر ستون کروماتوگرافی دارای توالی اینترونی زیادی هستند و بنابراین برای اینکه به صورت دست نخورده وارد پلاسمیدهای حامل شوند، بزرگ هستند. در نتیجه، توالی‌های ژن‌های منفرد شکسته شده و به بیشتر از یک کلون متصل

1-Clone 2- Poly linker
3- DNA library



▲ **شکل تجربی ۱۴-۵ کلونینگ DNA در یک حامل پلاسمیدی اجازه ازدیاد یک قطعه DNAیی را می‌دهد.** یک قطعه DNAی کلون شده در ابتدا وارد حامل پلاسمیدی دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین (amp^r) می‌شود، همانند شکل ۱۳-۵، فقط تعداد کمی از سلول‌های تغییر شکل داده با مولکول پلاسمید وارد شده به آنها در محیط کشت حاوی آمپی سیلین زنده خواهند ماند. در سلول‌های تغییر شکل داده DNAی پلاسمیدی همانندسازی کرده و بین سلول‌های دختری تقسیم می‌شود که نتیجه‌اش تشکیل یک کلونی مقاوم به آمپی سیلین است.

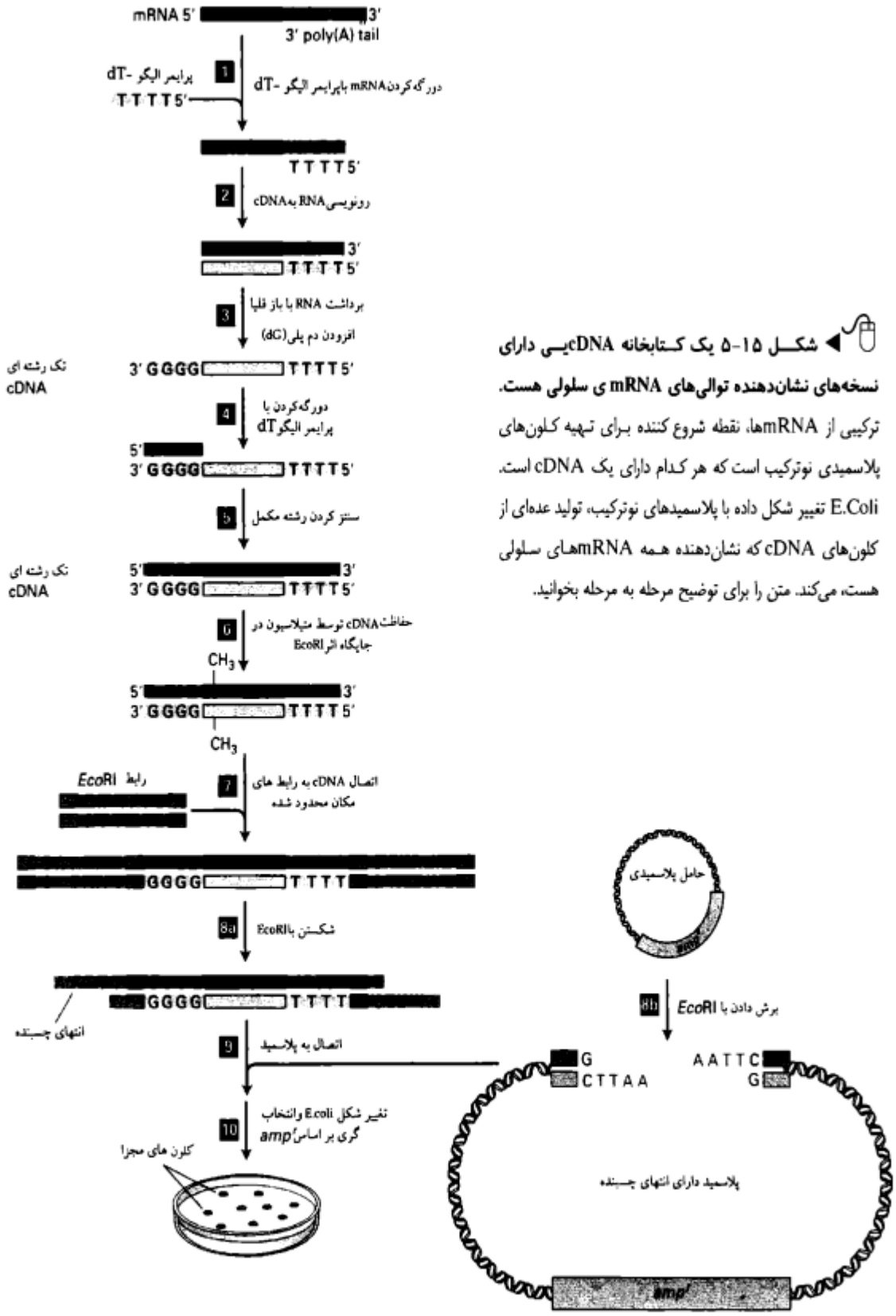
می‌شوند، علاوه بر این، وجود اینترون‌ها و نواحی درون ژنی بزرگ در DNAی ژنومی اغلب اوقات شناسایی قسمت‌های مهم یک ژن را که توالی‌های پروتئینی را رمزدار می‌کنند، مشکل می‌سازند. برای مثال، فقط در حدود ۱/۵ درصد از ژنوم انسان توالی‌های ژنی رمز کننده پروتئین دارد. بنابراین در بسیاری از مطالعات، mRNAهای سلولی که فاقد نواحی غیررمز کننده در DNAی ژنومی هستند، ماده شروع کننده بسیار مفیدی برای تولید یک کتابخانه DNAیی هستند. در این روش، نسخه‌های DNA از mRNA که **DNAهای مکمل**[1] (cDNA) نامیده می‌شوند، سنتز شده و داخل حامل‌های پلاسمیدی قرار می‌گیرند. یک مجموعه بزرگی از کلون‌های cDNAی حاصل، همه mRNAهای بیان شده در یک نوع سلولی را نشان می‌دهند، که کتابخانه cDNA نامیده می‌شود.

cDNAهای تهیه شده توسط رونویسی معکوس از mRNAهای سلولی می‌توانند برای تولید کتابخانه‌های cDNA کلون شوند.

اولین مرحله در تهیه یک کتابخانه cDNAیی، جداسازی mRNAی کل از یک نوع سلول و بافت مورد نظر است. به خاطر وجود دُم پلی آدنین در mRNAها، آنها به راحتی از rRNAها و tRNAهای موجود در سلول با استفاده از زنجیره کوتاهی از تیمیدیلات (الیگو dT) متصل به بسترستون کروماتوگرافی جداسازی می‌شوند. روش معمول برای تهیه یک کتابخانه cDNA از mRNAی کل در شکل ۱۵-۵ آورده شده است. آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، که در رتروویروس‌ها یافت می‌شود، برای ساختن یک رشته DNAی مکمل برای هر مولکول mRNA به کار می‌رود که نقطه شروعش پرایمر الیگو dT است. (مراحل ۱ و۲). مولکول‌های دورگه DNA-mRNA حاصل در چندین مرحله به مولکول‌های cDNAی دورشته‌ای متناسب با همه مولکول‌های mRNA در محلول اولی تبدیل می‌شوند (مراحل ۵-۳). هر cDNAی دورشته‌ای دارای یک ناحیه دورشته‌ای الیگو dG، الیگو dC در یک انتها و یک ناحیه دورشته‌ای الیگو dT، الیگو dA در انتهای دیگر است. متیله شدن cDNA آن را از شکست آنزیمی توسط آنزیمهای محدودکننده حمایت می‌کند (مرحله ۶).

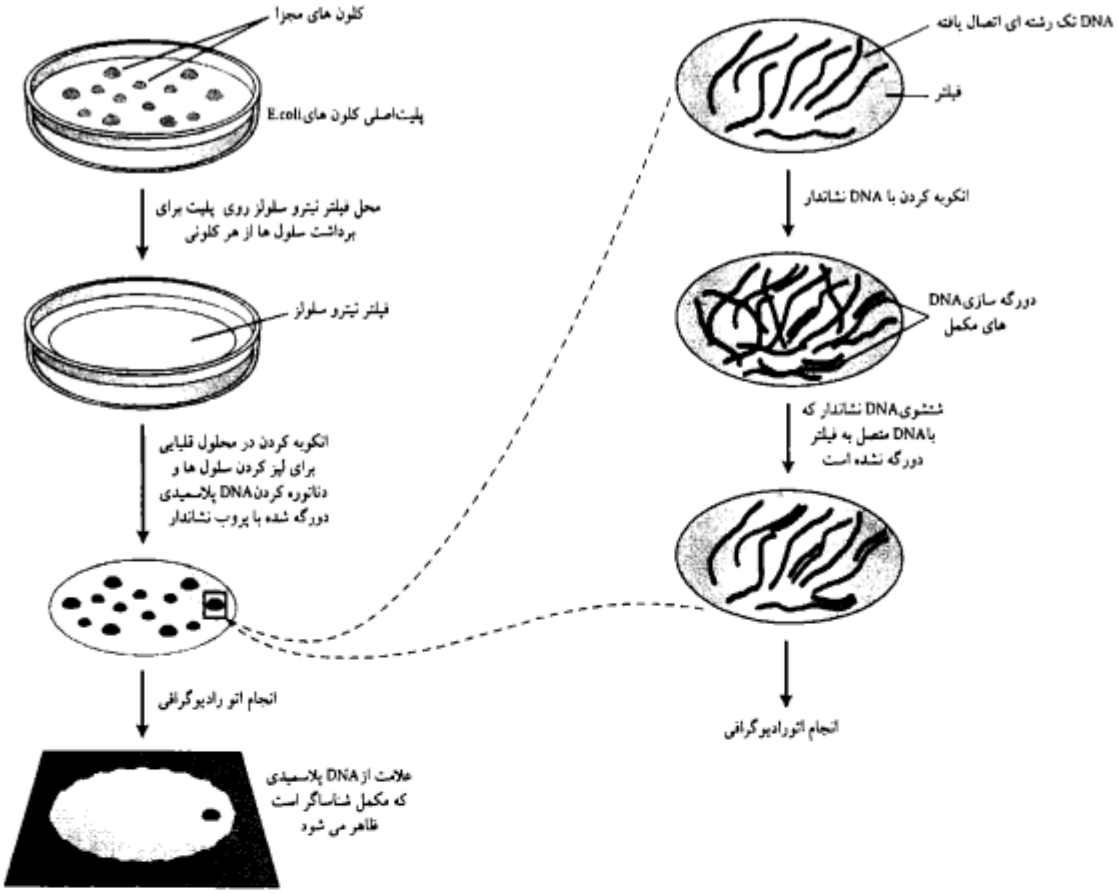
برای تهیه cDNAهای دورشته‌ای به منظور کلون کردن، مولکول‌های DNAی دورشته‌ای کوتاه دارای جایگاه شناسایی برای یک آنزیم محدوکننده خاص به هر دو انتهای cDNAها با استفاده از

1-Complementary DNAs(cDNAs)



شکل ۱۵-۵ یک کتابخانه cDNAیی دارای نسخه‌های نشان‌دهنده توالی‌های mRNA ی سلولی هست. ترکیبی از mRNAها، نقطه شروع کننده برای تهیه کلون‌های پلاسمیدی نوترکیب است که هر کدام دارای یک cDNA است. E.Coli تغییر شکل داده با پلاسمیدهای نوترکیب، تولید عده‌ای از کلون‌های cDNA که نشان‌دهنده همه mRNAهای سلولی هست، می‌کند. متن را برای توضیح مرحله به مرحله بخوانید.

DNA لیگاز از منبع باکتریوفاژ T_4، متصل شدند (شکل ۱۵-۵ مرحله ۷). چنانکه قبلا مورد توجه قرار گرفت، این لیگاز می‌تواند انتهاهای کند یا غیرچسبنده در مولکول‌های DNAی دورشته‌ای فاقد انتهاهای چسبنده را به هم متصل کند. مولکول‌های حاصل سپس با آنزیم محدودکننده ویژه برای رابط اتصال یافته تیمار داده می‌شوند تا مولکول‌های cDNAی با انتهاهای چسبنده در هر دو انتها تولید نمایند (مرحله ۸). در یک روش جداگانه، DNA پلاسمیدی در ابتدا با همان آنزیم محدوکننده برای تولید انتهاهای



▲ **شکل تجربی ۱۶-۵ کتابخانه‌های cDNA می‌توانند با پروب نشاندار با رادیواکتیو برای شناسایی کلون مورد نظر غربال شوند.** ظهور یک لکه بر روی اتورادیوگرام نشان دهنده یک کلون نوترکیب دارای DNA مکمل برای پروب است. موقعیت لکه بر روی اتورادیوگرام تصویر آینه‌ای موقعیت کلونی موردنظر بر روی پتری رویش است، اگر چه برای راحتی مقایسه در این جا معکوس نشان داده نشده است. با در یک ردیف قرار دادن اتورادیوگرام با پتری دیش اصلی کلون مرتبط از سلول‌های E.Coli می‌تواند بازیابی شود.

چسبنده مناسب مورد تیمار قرار می‌گیرد. مرحله ۸ حامل و مجموعه cDNAها، که دارای انتهاهای چسبنده هستند، با هم مخلوط شده و به طور کووالان توسط آنزیم DNA لیگاز به هم متصل شدند (شکل ۵-۵، مرحله ۹). مولکول‌های DNA ی حاصل برای تولید کلون‌های مجزا به سلول‌های E.coli انتقال داده شدند؛ هر کلون یک cDNA به دست آمده از یک mRNA منفرد را حمل می‌کند. به خاطر اینکه ژن‌های مختلف در سرعت‌های متفاوت رونویسی می‌شوند، کلون‌های cDNAی مرتبط با ژن‌هایی که به طور زیاد رونویسی شده‌اند چندین بار در یک کتابخانه cDNA وجود خواهند داشت در صورتیکه cDNAی مرتبط با ژن‌هایی که کم رونویسی شده‌اند به طور خیلی کمی موجود خواهند بود یا در کل وجود نخواهند داشت. این خصوصیت یک مزیت است، اگر یک محقق به یک ژنی که در مقدار زیاد در یک نوع سلول خاص رونویسی می‌شود، علاقه‌مند باشد، در این حالت، (کتابخانه cDNAیی تهیه شده از mRNAهایی از نوع سلولی که از cDNAی، موردنظر در آن زیاد است) جداسازی کلون‌های حامل آن cDNA را از کتابخانه تسهیل می‌کند. به هر حال، برای داشتن شانس منطقی برای کلون‌های دارای ژن‌هایی که آهسته رونویسی می‌شوند، کتابخانه‌های cDNAی پستانداران بایستی حاوی 10^{6}-10^{7} کلون نوترکیب مجزا باشند.

کتابخانه‌های DNA می‌توانند توسط دورگه سازی با یک پروب الیگونوکلئوتیدی غربال شوند

هم کتابخانه‌های ژنومی و هم کتابخانه‌های cDNAیی موجودات زنده گوناگون حاوی صدها و هزاران و حتی بیش از یک میلیون کلون مجزا در مورد یوکاریوت‌های عالی‌تر هستند. دو روش معمول برای غربالگری کتابخانه‌ها به منظور شناسایی کلون‌های حامل یک ژن یا

ناحیه DNAیی مورد نظر دیگر وجود دارد: (۱) شناسایی با پروب که به کلون مورد نظر متصل می‌شود و (۲) شناسایی براساس بیان پروتئین رمزدار شده. ما روش اول را توضیح می‌دهیم و یک مثال از روش دوم در قسمت بعدی آورده شده است.

اساس غربالگری با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی، **هیبریداسیون**[۱] است (توانایی مولکول‌های RNA یا DNA تک رشته‌ای مکمل برای ارتباط یافتن اختصاصی با همدیگر از طریق جفت شدن بازی)، همچنانکه در فصل ۴ توضیح داده شد. DNAی دورشته‌ای می‌تواند توسط گرم کردن در یک محلول نمکی رقیق به زنجیره‌های تک رشته‌ای دناتوره شود. اگر دما پائین آورده شود و غلظت یونی افزایش داده شود، رشته‌های منفرد مکمل برای تشکیل زنجیره دوتایی به هم متصل خواهند شد. در مخلوطی از اسیدهای نوکلئیک فقط زنجیره‌های تک رشته‌ای مکمل یا دارای‌نواحی مکمل به هم متصل خواهند شد. بعلاوه، میزان اتصال آنها با حضور زنجیره‌های غیرمکمل، تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. چنانچه بعداً در این فصل خواهیم دید، توانایی شناسایی یک توالی RNA یا DNAی خاص در درون یک ترکیب خیلی پیچیده از مولکول‌ها از طریق هیبریداسیون اسید نوکلئیکی، اساس بسیاری از تکنیک‌های به کار رفته برای بررسی بیان ژن است.

مراحل دخیل در غربالگری یک کتابخانه cDNAی پلاسمید E.Coli در شکل ۱۶-۵ ترسیم شده است. در ابتدا، DNAی غربال شده بایستی به یک پایه جامد متصل شود. یک رپلیکا از پتری دیش دارای تعداد زیادی از کلون‌های E.Coli مجزا بر روی سطح غشا نیتروسلولز تولید می‌شوند. DNAی موجود بر روی غشا دناتوره می‌شود و سپس غشا در محلول حاوی یک پروب نشاندار شده با رادیواکتیو مختص DNA نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر انکوبه می‌شود. در شرایط هیبریداسیون (pH نزدیک خنثی، دمای ۴۰-۶۵°C، ۰/۳-۰/۶M-NACL) این پروب نشاندار شده با هر زنجیره اسید نوکلئیک مکمل متصل به غشا هیبرید می‌شود. هر پروب اضافی که دورگه نشده است شسته می‌شود و هیبریدهای نشاندار شده توسط اتورادیوگرافی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. این روش می‌تواند برای غربال کردن هر دو کتابخانه cDNA و ژنومی مورد استفاده قرار گیرد، ولی معمولاً بیشتر برای جداسازی cDNAهای خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد.

به وضوح، شناسایی کلون‌های اختصاصی توسط تکنیک هیبریداسیون غشایی به دسترس‌پذیربودن پروب‌های نشاندار شده با رادیواکتیو مکمل، وابسته است. برای اینکه یک الیگونوکلئوتید به عنوان پروب مفید واقع شود، بایستی به اندازه کافی برای اینکه توالی آن فقط در کلون مورد نظر باشد و در کلون‌های دیگر نباشد، طویل باشد. برای بیشتر اهداف، این وضعیت توسط الیگونوکلئوتیدها در حدود ۲۰ نوکلئوتید قابل قبول است، زیرا یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی ویژه، فقط هر 4^{20}(~10^{12}) نوکلئوتید یک بار وجود دارد. از این جهت همه ژنوم‌ها بسیار کوچکتر (تقریباً 3×10^{9} نوکلئوتید برای انسان) از مقداری هستند که یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی خاص در ژنوم معمولاً فقط یک بار موجود باشد. با دستگاه‌های خودکار که امروزه در دسترس هستند، محققان می‌توانند سنتز شیمیایی الیگونوکلئوتیدهای توالی خاص بیشتر از ۱۰۰ نوکلئوتید را برنامه‌ریزی کنند. پروب‌های طویل‌تر می‌توانند توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۲] (PCR) تهیه شوند، تکنیکی که بطور گسترده برای ازدیاد توالی‌های DNAیی خاص که بعدا شرح داده خواهد شد، استفاده می‌شود.

چگونه بایستی یک محقق یک پروب الیگونوکلئوتیدی برای شناسایی یک کلونی رمزدار کننده یک پروتئین خاص طراحی کند؟ اگر همه یا قسمتی از توالی اسید آمینه‌ای پروتئین شناخته شده باشد، می‌تواند کمک کننده باشد. با در دسترس بودن توالی ژنومی کامل انسان‌ها و برخی از موجودات مدل با اهمیتی مانند موش، مگس سرکه، و کرم حلقوی کانورابدیتیس الگانس[۳]، یک محقق می‌تواند برنامه کامپیوتری مناسب جهت جستجوی داده‌های توالی ژنومی برای توالی رمزدار کننده مرتبط با توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین در حال مطالعه، استفاده کند. اگر یک مکمل پیدا شد، DNA پروب خاص براساس توالی ژنومی شناخته شده به طور کامل با کلون رمزدار کننده پروتئین مورد نظر هیبرید خواهد شد.

کتابخانه‌های ژنومی مخمر می‌تواند با حامل‌های شاتل ساخته شود و توسط مکمل‌سازی عملکردی غربالگری شوند.

در برخی حالات یک کتابخانه DNA می‌تواند براساس توانایی بیان یک پروتئین عملکردی که یک جهش مغلوب را تکمیل می‌کند، غربال شود. چنین استراتژی غربالگری، روش موثری برای جداسازی ژن کلون شده مرتبط با یک جهش مغلوب شناخته شده در یک موجود زنده آزمایشگاهی است. برای توضیح این روش، که به آن **مکمل‌سازی عملکردی**[۴] اطلاق می‌شود، ما توضیح می‌دهیم که

1- Hybridization

2-Polymerase chain reaction

3- Caenorhabditis elegans

4- Funetional complementation

چگونه ژن‌های مخمر می‌توانند در پلاسمیدهای اختصاصی E.Coli به سلول‌های مخمر، جهش یافته به منظور شناسایی ژن نوع وحشی که در سوش جهش یافته معیوب است، منتقل شوند.

کتابخانه‌های ایجاد شده به منظور غربالگری در بین توالی‌های ژنی مخمر معمولاً از DNA ژنومی بیشتر از cDNA استفاده می‌کنند. به خاطر اینکه ژن‌های ساکارومایسس دارای اینترون‌های زیادی نیستند به طور کافی متراکم هستند، توالی کامل یک ژن می‌تواند در یک قطعه DNA ژنومی وارد شده و در حامل پلاسمیدی قرار گیرد. به منظور ایجاد کتابخانه ژنومی پلاسمیدی که توسط مکمل‌سازی عملکردی در سلول‌های مخمر غربال می‌شود، حامل پلاسمیدی بایستی قادر به همانندسازی هم در سلول‌های E.Coli و هم در سلول‌های مخمری باشد. این نوع از حامل که توانایی ازدیاد در میزبان‌های مختلف را دارد **حامل شاتل**[1] نامیده می‌شود. ساختار یک حامل شاتل مخمری در شکل ۱۷-۵ نشان داده شده است. این حامل دارای اجزا اصلی است که اجازه کلون سازی قطعات DNA را در E.Coli می‌دهد. بعلاوه، حامل شاتل دارای یک توالی خودهمانندسازی است (ARS) که بعنوان منشا همانندسازی DNA در مخمر عمل می‌کند؛ یک سانترومر مخمری (که CEN نامیده می‌شود)، که اجازه تقسیم صحیح پلاسمید را در طی تقسیم سلولی مخمر می‌دهد و یک ژن مخمری رمز کننده آنزیمی برای سنتز اوراسیل (URA3) که بعنوان نشانگر انتخاب‌پذیری در یک مخمر جهش یافته مناسب به کار می‌رود.

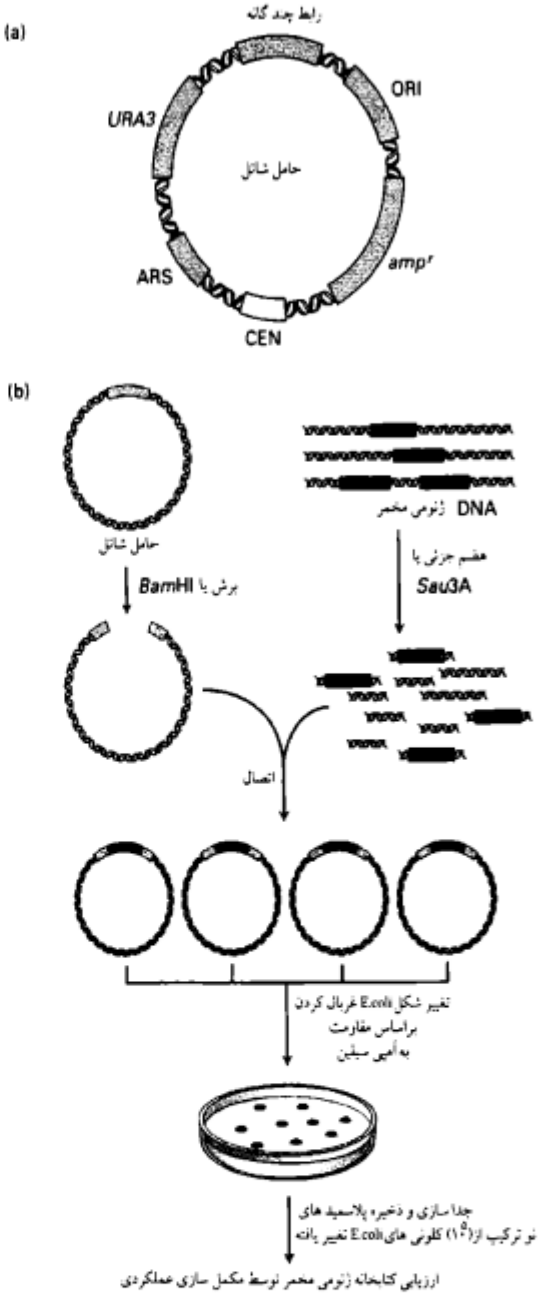
برای افزایش احتمال اینکه همه نواحی ژنوم مخمر به طور موفق‌آمیز کلون شوند و در کتابخانه پلاسمیدی وجود داشته باشند، DNAی ژنومی معمولاً به طور جزئی برای ایجاد قطعات محدود شده هم‌پوشان دارای ۱۰ کیلوباز، تجزیه می‌شود. سپس این قطعات به حامل شاتل متصل می‌شوند که در آن رابط چندگانه با یک آنزیم محدودگر که انتهاهای چسبنده مکمل با انتهاهای قطعات DNAی مخمری تولید می‌کند، شکسته می‌شوند (شکل ۱۷-۵). به خاطر اینکه قطعات محدود شده ۱۰ کیلوبازی روی DNAی مخمری به طور تصادفی به حامل‌های شاتل ملحق می‌شوند، (حداقل 10^5 کلون E.Coli) هر کدام شامل یک حامل شاتل نوترکیب خاص است، اطمینان از اینکه هر ناحیه از DNAی مخمری احتمال زیادی داشته باشد که در یک کتابخانه حداقل یک مرتبه موجود باشد، لازم است. شکل ۱۸-۵ نشان داده است که چگونه چنین کتابخانه ژنومی مخمر می‌تواند برای جداسازی ژن نوع وحشی مرتبط با جهش‌های cdc حساس به دما غربال شود، که قبلا در این فصل بیان شده است، سوش مخمری شروع کننده یک جهش یافته دوگانه است که برای رشد به علت جهش در ژن ura3 نیاز به اوراسیل دارد و به خاطر جهش در cdc28 حساس به دما است و توسط فنوتیپش شناخته می‌شود. (شکل ۶-۵ را ملاحظه کنید). پلاسمیدهای نوترکیب جداسازی شده از کتابخانه ژنومی مخمر با سلول‌های مخمر در شرایطی که تغییر شکل سلول‌ها را با DNA خارجی ایجاد می‌کرد، مخلوط شدند. به دلیل اینکه مخمرهای تغییرشکل یافته حامل یک نسخه پلاسمیدی از ژن URA3 هستند. توسط توانایی‌شان به رشد در غیاب اوراسیل می‌توانند انتخاب شوند. در حدود ۲۰ پتری دیش، هر کدام حاوی حدود ۵۰۰ مخمر تغییرشکل یافته است، که برای بیان ژنوم مخمری کامل، کافی هستند. این مجموعه از مخمرهای تغییر یافته می‌توانند در $23^\circ C$ نگهداری شوند (دمای مجاز برای رشد جهش یافته‌های cdc28). سپس مجموعه کامل روی ۲۰ پلیت به پلیت‌های رپلیکا منتقل می‌شوند و در دمای $36^\circ C$ قرار می‌گیرند (دمای غیرمجاز برای رشد مخمرهای جهش یافته در cdc). کلونی‌های مخمری که حامل پلاسمیدهای بیان کننده نسخه نوع وحشی از ژن CDC28 هستند، قادر به رشد در دمای $36^\circ C$ خواهند بود. زمانیکه کلونی‌های مخمری حساس به دما شناسایی شدند، DNAی پلاسمیدی می‌تواند از سلول‌های مخمری کشت داده شده استخراج شود و توسط زیرکلون سازی[2] و تعیین توالی DNA مورد ارزیابی قرار گیرد، مباحثی که بعدا شرح خواهیم داد.

الکتروفورز ژل اجازه جداسازی DNAی حامل از قطعات کلون شده را می‌دهد.

به منظور دستکاری یا تعیین توالی یک قطعه DNAی کلون شده، برخی اوقات آن بایستی از DNA حامل جدا شود. این امر می‌تواند توسط برش کلون DNA نوترکیب با همان آنزیم محدودکننده استفاده شده برای تولید حامل‌های نوترکیب انجام شود. سپس DNAی کلون شده و DNAی حامل مورد **الکتروفورز** قرار می‌گیرند که روش قدرتمندی برای جداسازی مولکول‌های DNA با اندازه‌های مختلف است (شکل ۱۹-۵).

در pH نزدیک به خنثی، مولکول‌های DNA دارای بار منفی زیادی هستند و بنابراین در طی الکتروفورز به طرف الکترود مثبت حرکت می‌کنند. به خاطر اینکه بستر ژلی جلوی انتشار تصادفی را می‌گیرد، مولکول‌های با اندازه مشابه با همدیگر بصورت یک باند درمی‌آیند که

1- Shuttle Vectors 2- Subcloning



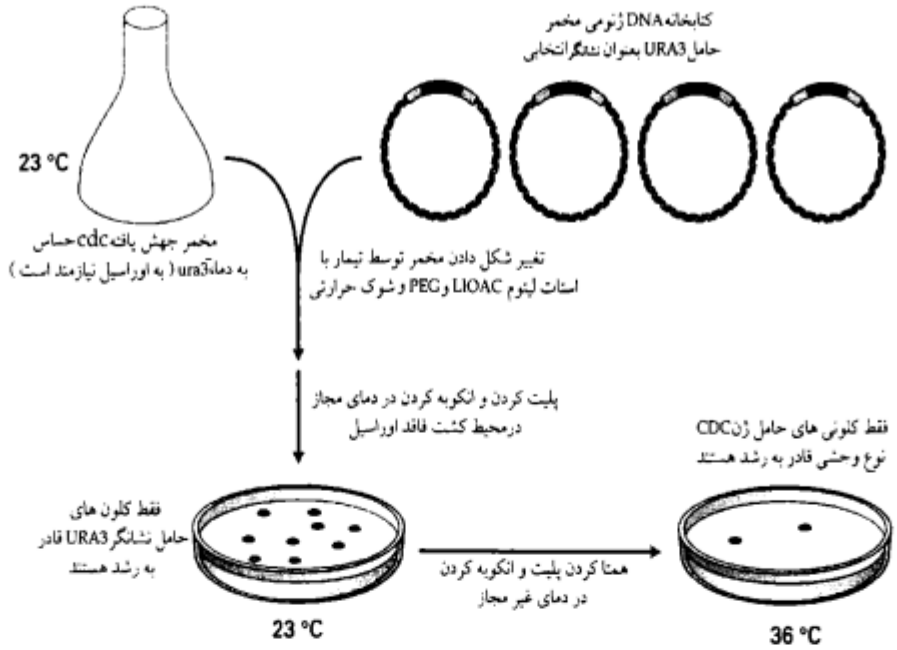
◀ شکل تجربی ۱۷-۵ یک کتابخانه ژنومی مخمر در یک حامل شاتل پلاسمیدی که می‌تواند در مخمر و E.Coli همانندسازی کنند، می‌تواند ساخته شود. (a) اجزا یک حامل شاتل پلاسمیدی برای کلون کردن ژن‌های ساکارومیسس وجود یک ناحیه مخمری همانندسازی (ARS)DNA و یک سانترومر مخمری (CEN) اجازه همانندسازی مداوم و تقسیم را در مخمر می‌دهد. همچنین در مخمر نشانگر انتخاب‌پذیر مانند URA3 وجود دارد که اجازه می‌دهد که یک مخمر جهش یافته ura3 در محیط فاقد یوراسیل رشد کند. سرانجام، حامل دارای ترادف‌هایی برای همانندسازی و انتخاب‌پذیری در E.Coli (amp^r , ORI) و یک رابط چندگانه برای ورود راحت قطعات DNA مخمری است. (b) پروتوکل معمول برای ساخت یک کتابخانه ژنومی مخمر. هضم جزئی DNA ژنومی کل مخمر با Sau3A که قطعاتی در حدود ۱۰ کیلو باز تولید می‌کند، حامل به منظور پذیرش قطعات ژنومی توسط هضم کردن با $BamH_1$ که انتهاهای چسبنده همانند Sau3A تولید می‌کند، تهیه شد. هر کلون تغییر یافته E.Coli که بعد از انتخاب برای مقاومت به آمپی سیلین رشد می‌کند، دارای یک نوع منفرد از قطعه DNA مخمر است.

عرض آنها مساوی عرض ترکیب DNA ابتدایی است که در شروع الکتروفورز قرار داده شده بود. مولکول‌های کوچکتر از وسط بستر ژل بسیار سریع‌تر از مولکول‌های بزرگتر حرکت می‌کنند، بنابراین مولکول‌ها با اندازه‌های مختلف بصورت باندهای مجزایی حرکت می‌کنند. مولکول‌های کوچکتر در حدود ۱۰ الی ۲۰۰۰ نوکلئوتید می‌توانند توسط الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید جداسازی شوند و مولکول‌های بزرگتر در حدود ۲۰۰ الی بیشتر از ۲۰ کیلوباز روی ژل آگارز می‌توانند جداسازی شوند.

یک روش معمول برای مشاهده باندهای DNA جداشده روی یک ژل، انکوبه کردن ژل در محلول حاوی رنگ فلورسانت اتیدیوم بروماید است. این مولکول مسطح به توسط قرارگیری در وسط جفت بازها DNA متصل می‌شود. این عمل، اتیدیوم بروماید را در DNA قرار می‌دهد و همچنین فلورسانس ذاتی را افزایش می‌دهد. در نتیجه، وقتی که به ژل نور ماورای بنفش (UV) تابانده می‌شود، نواحی از ژل که دارای DNA هستند روشنایی خیلی بیشتری نسبت به نواحی بدون DNA دارند.

زمانیکه قطعه DNAی کلون شده از DNAی حامل جدا می‌شود، اغلب با چندین آنزیم محدودکننده برای ایجاد قطعات کوچکتر تیمار می‌شود. بعد از جداسازی توسط الکتروفورز ژلی، همه یا برخی از آن قطعات کوچکتر می‌توانند به طور مجزا به داخل یک حامل پلاسمیدی متصل شوند و در E.Coli توسط روش معمول کلون شوند. این فرآیندها تحت عنوان **زیرکلون سازی**[1] شناخته می‌شوند که مرحله مهّی در بازآرایی اجزای ژن‌ها به ساختارهای جدید قابل استفاده است. بعنوان مثال، محققی می‌خواهد شرایطی که تحت آن یک ژن بیان می‌شود را تغییر دهد، ممکن است از زیرکلون سازی به منظور جایگزینی پروموتر طبیعی مرتبط با یک ژن کلون شده یا یک قطعه DNA دارای پروموتر متفاوت استفاده کند. زیرکلون سازی

1- subcloning



▲ **شکل تجربی ۱۸-۵ غربالگری کتابخانه ژنومی مخمر توسط مکمل‌سازی عملکردی، می‌تواند کلون‌های حامل نوع طبیعی از یک ژن مخمری جهش یافته را شناسایی کند.** در این مثال، ژن CDC نوع وحشی توسط مکمل سازی مخمر جهش یافته در cdc جداسازی شده است. سوش ساکارومایسس برای غربالگری کتابخانه مخمری استفاده می‌شود که ura^{3-} است و جهش cdc حساس به دما را حمل می‌کند. این سوش جهش یافته در دمای مجاز (۲۳°C) رشد و نگهداری می‌شود. پلاسمیدهای نوترکیب ذخیره شده بصورتی که در شکل ۱۷-۵ نشان داده شده است تهیه شده و با سلول‌های مخمری جهش یافته تحت شرایطی که تغییر شکل را شروع می‌کنند، انکوبه شدند. سلول‌های مخمری تغییرشکل یافته نسبتا کم، که دارای DNAی پلاسمیدی نوترکیب هستند، می‌توانند در غیاب اوراسیل در دمای ۲۳ درجه رشد کنند. وقتی که کلونی‌های مخمری تغییرشکل یافته و در پلیت‌های ریلیکا قرار بگیرند و در دمای ۳۶ درجه واقع شود (دمای غیرمجاز)، فقط کلونی‌های حامل پلاسمید کتابخانه‌ای دارای نسخه نوع وحشی از ژن CDC، زنده خواهند ماند. LiOAC= استات لیتیوم، PEG=پلی اتیلن گلیکول

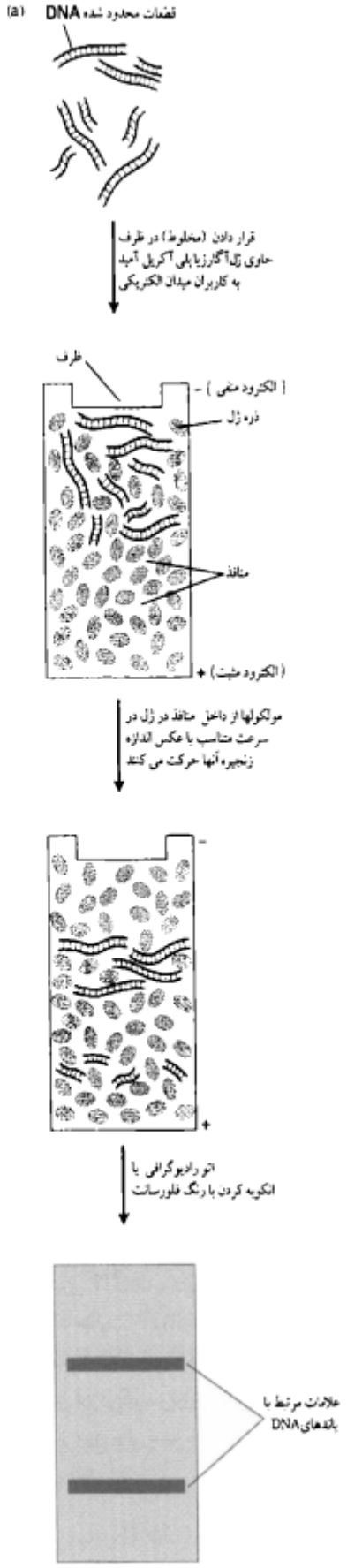
همچنین می‌تواند برای ایجاد قطعات DNAی کلون شده استفاده شود که طول مناسبی برای تعیین توالی نوکلئوتیدی دارند.

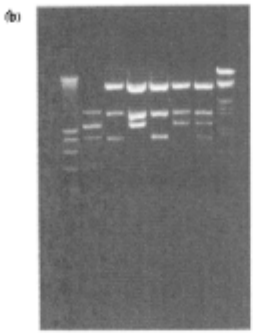
مولکول‌های DNAی کلون شده به سرعت توسط روش خاتمه دادن به زنجیره دی دئوکسی تعیین توالی می‌شوند.

شناسایی کامل هر قطعه DNA کلون شده نیاز به تعیین توالی نوکلئوتیدی آن دارد. راف.سانجرر و همکارانش روشی را ابداع کردند که امروزه برای تعیین توالی نوکلئوتیدی دقیق قطعات DNA دارای طول بیشتر از ۵۰۰ نوکلئوتید مورد استفاده قرار می‌گیرد. نظریه اولیه این روش سنتز کردن قطعه DNA تعیین توالی شده از یک تعدادی زنجیره‌های دختری است که در یک انتها نشاندار شده‌اند و طول‌شان یک نوکلئوتید با هم متفاوت است. جداسازی زنجیره‌های دختری ناتمام توسط الکتروفورز ژلی می‌تواند توالی نوکلئوتیدی قطعه DNAی ابتدایی را تعیین کند.

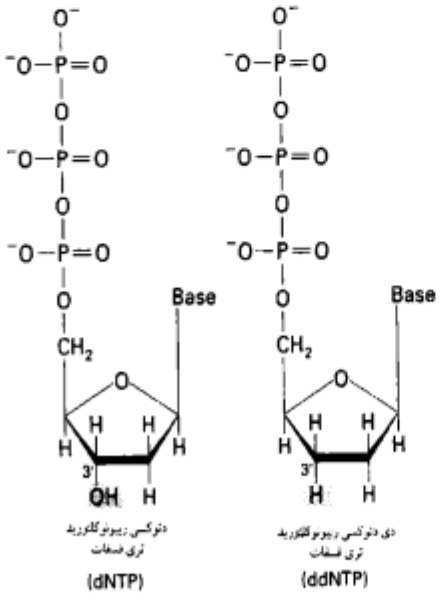
سنتز زنجیره‌های دختری ناتمام با استفاده از ′۲ و ′۳ دی دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات‌ها (ddNTP) انجام می‌گیرد. این مولکول‌ها برخلاف دئوکسی ریبونوکلئوتیدهای طبیعی (ddNTP)، فاقد گروه هیدروکسیل ′۳ هستند (شکل ۲۰-۵). گرچه dolNTPها می‌توانند به توسط آنزیم DNA پلیمراز زنجیره در حال رشد DNA افزوده شوند ولی وقتی که افزوده شدند نمی‌توانند پیوند فسفودی استر با نوکلئوزیدتری فسفات دیگر تشکیل بدهند. بنابراین افزودن یک ddNTP سنتز زنجیره را خاتمه می‌دهد و نتیجه‌اش یک زنجیره دختری ناتمام در موقعیت‌های خاص مرتبط با باز مکمل ddNTP افزوده شده بر روی زنجیره الگو است.

تعیین توالی با استفاده از روش خاتمه زنجیره دی دئوکسی سانجر معمولاً با استفاده از یک ماشین تعیین توالی کننده DNA خودکار انجام می‌گیرد. واکنش با دناتوره کردن یک قطعه DNAی دورشته‌ای برای تولید زنجیره‌های الگو به منظور سنتز DNA در invitro شروع می‌شود. از یک الیگودئوکسی نوکلئوتید مصنوعی بعنوان پرایمر برای واکنش پلیمریزه شدن استفاده می‌کنند که دارای

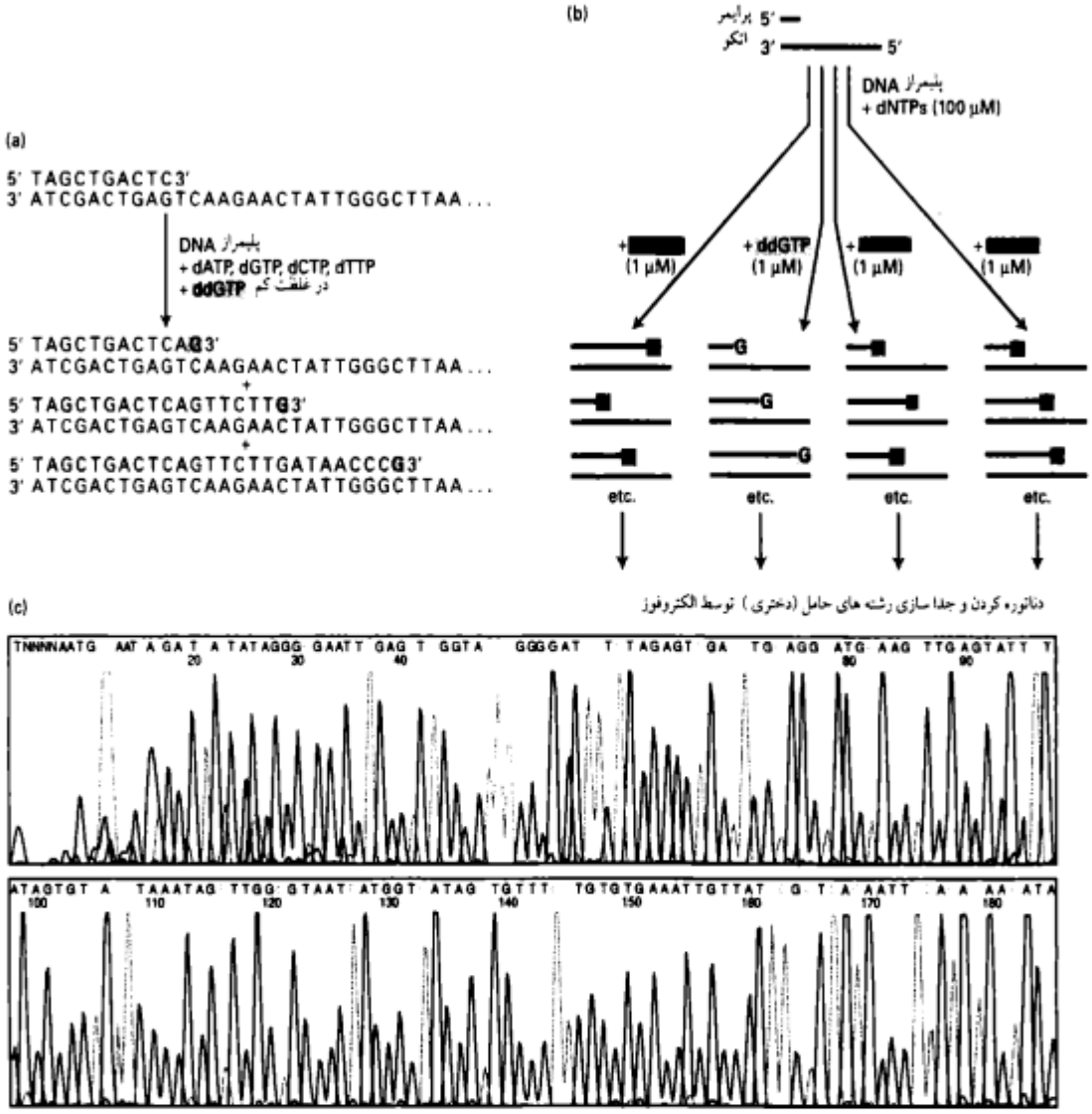




▲ شکل تجربی ۱۹-۵ الکتروفورز ژلی مولکول‌های DNA با اندازه‌های مختلف را جدا می‌کند. (a) یک ژل توسط ریختن مایع حاوی آگارز ذوب شده یا آکریل آمید پلیمریزه نشده بین دو پلیت شیشه‌ای که چند میلی متر از هم فاصله دارند، تهیه می‌شود. همچنانکه آگارز جامد می‌شود یا آکریل آمید به پلی آکریل آمید پلیمریزه می‌شود، بستر ژلی تشکیل می‌شود که شامل زنجیره‌های بلند و به هم پیچیده‌ای از پلیمرها است. ابعاد کانال‌های مرتبط به هم یا منفذها بستگی به غلظت آگارز یا آکریل آمید استفاده شده برای تشکیل ژل دارد. باندهای جداشده می‌توانند توسط اتورادیوگرافی (اگر قطعات از لحاظ رادیواکتیو نشاندار باشند) یا توسط افزودن یک رنگ فلورسانت (مانند اتیدیوم برماید) که به DNA متصل می‌شود، دیده شوند. (b) عکس یک ژل رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (EtBr). EtBr به DNA متصل می‌شود و زیر نور UV فلورسانس می‌شود. باندهای موجود در سمت چپ و سمت راست بعنوان DNAی نردبانی شکل (Ladder) شناخته می‌شوند - قطعات DNA با اندازه معلوم که بعنوان مرجعی برای تعیین اندازه قطعات DNA در نمونه آزمایشگاهی به کار می‌رود.



▲ شکل ۲۰-۵ ساختار دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات (dNTP) و دی دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات (ddNTP)
الحاق یک رزیدوی ddNTP به یک رشته DNAی در حال تشکیل، جلوی طویل شدن آن را در آن نقطه می‌گیرد.



▲ **شکل تجربی (شکل رنگی) ۲۱-۵ DNAهای کلون شده می‌توانند توسط روش سانجر، با استفاده از دی دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات‌های فلورسانت (ddNTP) تعیین توالی شوند** (a) رشته (الگو) منفرد DNA تعیین توالی شده (حروف آبی) با پرایمر دئوکسی ریبونوکلئوتید مصنوعی (حروف سیاه) هیبرید می‌شود. پرایمر در مخلوط واکنش دارای چهار باز دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات طبیعی بعلاوه مقدار نسبتاً کم از یکی از چهار دی دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات، طویل می‌شود. در این مثال، ddGTP (زرد رنگ) وجود دارد. به خاطر غلظت نسبتاً کم ddGTP، الحاق یک ddGTP و بنابراین خاتمه زنجیره، در یک موقعیت در ترادف فقط در حدود یک درصد از زمان اتفاق می‌افتد. سرانجام ترکیب واکنش حاوی ترکیبی از قطعات دختری (بریده شده) هست که به طور ناتمامی خاتمه یافته‌اند و با قرارگیری ddGTP به انتها رسیده‌اند. (b) برای بدست آوردن توالی کامل یک DNAی الگو، چهار واکنش جداگانه هر یک با دی دئوکسی ریبونوکلئوزیدتری فسفات متفاوت (ddNTP) انجام می‌شود. ddNTP که هر قطعه ناتمام را خاتمه می‌دهد می‌تواند با استفاده از ddNTPهای نشاندار شده با چهار رنگ فلورسانت مختلف (توسط رنگ‌های روشن نشان داده شده است) شناسایی شوند. (c) در یک دستگاه تعیین توالی خودکار، چهار ترکیب واکنش مورد الکتروفورز ژلی قرار می‌گیرند و ترتیب ظهور هر یک از چهار رنگ فلورسانت مختلف در انتهای ژل ثبت می‌شود. مثال نشان داده شده در این شکل نمونه‌ای از نتیجه حاصل از تعیین توالی‌کننده خودکار از توالی DNAی الگو اصلی است که می‌تواند از روی توالی رشته سنتز شده به دست آید. N=نوکلئوتیدی که نمی‌توانسته تعیین شود.

▲ **شکل ۲۲-۵ دو استراتژی برای جمع‌بندی توالی کامل ژنوم.** یک روش برای جداسازی و جمع کردن یک عده از قطعات DNAی کلون شده بستگی به این دارد که کل ژنوم را دربرگیرند. این عمل می‌تواند توسط جفت کردن قطعات کلون شده توسط هیبریدسازی یا توسط ردیف کردن نقشه جایگاههای محدود شده انجام شود. سپس توالی DNAیی کلون‌های مرتب شده می‌تواند به یک توالی ژنومی کامل جمع بندی شود. روش جایگزین به سهولت نسبی تعیین توالی خودکار DNA بستگی دارد و مرحله آزمایشگاهی مرتب کردن کتابخانه را رفع می‌کند. با تعیین توالی کلون‌های کتابخانه‌ای به طور تصادفی چنانچه هر قطعه ژنوم از ۳ الی ۱۰ بار بیان می‌شود و امکان از نوسازی ترادف ژنومی توسط ردیف سازی کامپیوتری قطعات توالی با تعداد خیلی زیاد وجود دارد.

غلظت پائینی از هر چهار تا باز ddNTP بعلاوه غلظت‌های بالایی از dNTPهای طبیعی است. ddNTPها بطور تصادفی در محلهای مرتبط با dNTP قرار می‌گیرند، باعث خاتمه پلیمریزه شدن در آن محل‌ها در توالی می‌شوند (شکل ۲۱-۵). وارد کردن نشان‌های فلورسانت با رنگ‌های متفاوت در هر چهار تا ddNTP اجازه می‌دهد که هر تعداد از قطعات دختری ناتمام با توجه به نشانه فلورسانت مرتبطشان شناسایی شوند (شکل ۲۱-۵). برای مثال بدون توجه به اندازه، همه قطعات ناتمام که به یک باز G ختم می‌شوند با یک رنگ فلورسانس خواهند شد (مثلاً رنگ زرد) و آنهایی که با باز A خاتمه می‌یابند با رنگ دیگر فلورسانس خواهند شد (مثلاً رنگ قرمز). ترکیب قطعات دختری ناتمام از هر چهار واکنش روی ژل‌های پلی آکریل آمید مخصوصی که مولکول‌های DNA تک رشته‌ای که فقط یک نوکلئوتید با هم فرق دارند را می‌تواند جدا بکند، مورد الکتروفورز قرار می‌گیرند. یک شناساگر فلورسانسی که می‌تواند چهار رنگ فلورسانت را شناسایی کند، در انتهای ژل قرار گرفته است. توالی رشته الگو DNA اولیه می‌تواند از ترتیب قطعات نشاندار شده که به شناساگر فلورسانسی می‌رسند، تعیین شود.

به منظور تعیین توالی ناحیه طولانی از DNAی ژنومی یا حتی ژنوم کامل یک موجود زنده، معمولاً محققان یکی از استراتژی‌های آورده شده در شکل ۲۲-۵ را به کار می‌برند. اولین روش نیاز به جداسازی مجموعه‌ای از قطعات DNAی کلون شده دارد که توالی آنها با هم همپوشانی دارد. زمانیکه توالی یکی از آن قطعات تعیین شد، الیگونوکلئوتیدهایی براساس توالی آن می‌توانند به طریق شیمیایی برای استفاده بصورت پرایمر در تعیین توالی قطعات همپوشان کناری سنتز شوند. در این روش، توالی هر زنجیره بزرگ DNA توسط تعیین توالی قطعات کلون شده همپوشانی که آن را تشکیل می‌دهند، تعیین می‌شود. روش دوم، که **تعیین توالی تصادفی کل ژنومی** نامیده می‌شود و مرحله زمان‌گیر، جداسازی یک مجموعه منظم از قطعات DNA را که ژنوم را دربرمی‌گیرد ندارد. این روش شامل تعیین توالی‌ساده از کلون‌های تصادفی از یک کتابخانه ژنومی است. تعداد کل کلون‌های انتخاب شده برای تعیین توالی چنان است که میانگین هر قطعه ژنومی تعیین توالی شده ۱۰ بار است. این درجه از پوشش تضمین می‌کند که هر قطعه ژنومی تعیین توالی شده بیشتر از یک عدد باشد. توالی کامل ژنومی اغلب با استفاده از یک الگوریتم کامپیوتری که همه آن توالی‌ها را با استفاده از نواحی همپوشانی‌شان در یک ردیف قرار می‌دهد جمع می‌شود. تعیین توالی تصادفی کل ژنوم روشی سریع و از لحاظ هزینه برای تعیین توالی اندازه‌های طولانی از DNA مناسب است و بیشتر ژنوم‌ها، مانند ژنوم انسان توسط این روش تعیین توالی شده‌اند.

◀ شکل تجربی ۲۳-۵ (شکل رنگی) واکنش زنجیره‌ای (PCR) به طور وسیعی برای ازدیاد نواحی DNA با توالی‌های شناخته شده به کار می‌رود. به منظور ازدیاد یک ناحیه خاص از DNA، یک محقق به طریق شیمیایی دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی مکمل متفاوت را برای توالی‌های در حدود ۱۸ بازی برای اطراف ناحیه دلخواه را سنتز خواهد کرد (با نوارهای آبی روشن و تیره نشان داده شده است). واکنش کامل از یک ترکیب پیچیده از DNAی دورشته‌ای، (معمولاً DNAی ژنومی که حاوی توالی هدف دلخواه است)، مقدار زیادی از هر دو پرایمر، چهار دئوکسی نوکلئوزیدتری فسفات، DNA پلیمراز پایدار به گرما که بصورت Taq پلیمراز شناخته می‌شود است. در طی هر چرخه PCR، ابتدا ترکیب واکنش برای جداکردن رشته‌های DNA گرم می‌شود و سپس به منظور اجازه دادن به پرایمرها برای اتصال به توالی‌های مکمل‌شان که در اطراف ناحیه‌ای که ازدیاد انجام می‌شود، سرد می‌شود. سپس Taq پلیمراز هر دو پرایمر را از انتهاهای ′۳ آن امتداد می‌دهد که زنجیره‌های تازه سنتز شده‌ای را تولید می‌کنند که در جهت ′۳ به ′۵ رشته الگو امتداد می‌یابند. در طی سومین چرخه، دو مولکول DNA دورشته‌ای تولید می‌شود که از لحاظ اندازه با توالی ناحیه ازدیاد شده مساوی است. در هر چرخه پی در پی، قطعه‌ای که پرایمرها به آن متصل خواهند شد، دو برابر خواهد شد و سرانجام تعداد بسیار زیادی از قطعات دیگر DNA در ترکیب واکنش ایجاد خواهند کرد. چرخه‌های PCR متوالی می‌تواند توسط چرخه‌ای کردن واکنش برای فاصله‌های زمان‌دار در دمای بالا برای ذوب DNA و در دمای پائین تعریف شده برای اتصال و امتداد یافتن قسمت‌هایی از چرخه، خودکار شود. یک واکنش که ۲۰ مرتبه پیش می‌رود توالی هدف موردنظر را یک میلیون برابر زیاد خواهد کرد.

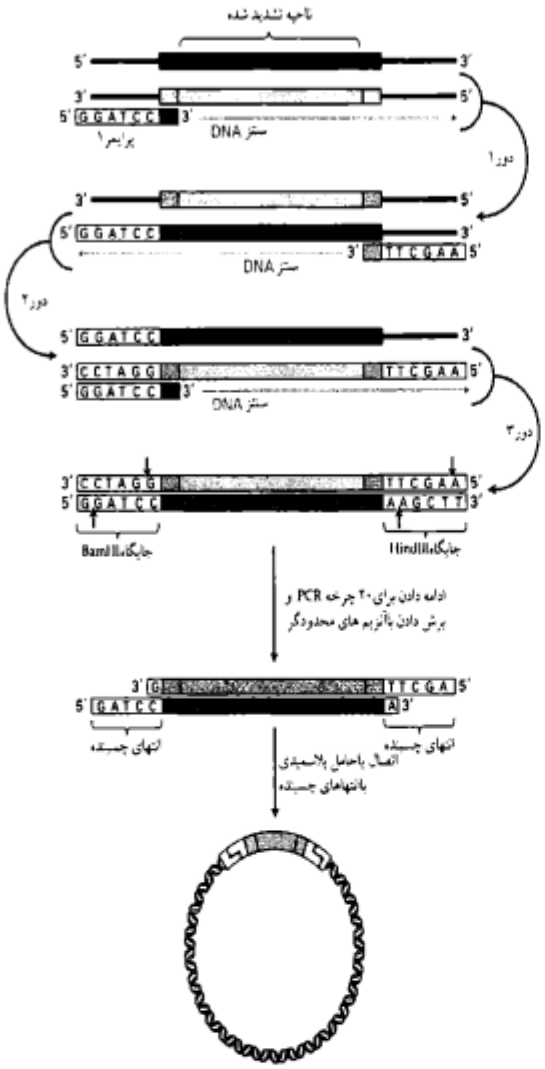
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توالی DNAی خاص از یک ترکیب پیچیده را زیاد می‌کند

اگر توالی‌های نوکلئوتیدی در انتهاهای یک ناحیه DNAی خاص شناخته شود، قطعه داخل آن می‌تواند به طور مستقیم توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) زیاد شود. در این جا ما تکنیک PCR پایه و سه حالتی را که در آن استفاده می‌شود، توضیح می‌دهیم. PCR به توانایی دناتوره کردن متناوب مولکول‌های DNA دورشته‌ای و دورگه کردن زنجیره‌های منفرد مکمل در یک مسیر کنترل شده، بستگی دارد. همچنانکه در شکل ۲۳-۵ آورده شده است، یک روش PCR نمونه با دناتوره کردن گرمایی یک نمونه DNA به رشته‌های منفرد شروع می‌شود. در مرحله بعد، دو الیگونوکلئوتید مکمل به انتهاهای ′۳ قطعه DNAی هدف دلخواه در مقداری بیش از DNA دناتوره شده اضافه می‌شود و دما به پائین‌تر از ۶۰-۵۰ درجه آورده می‌شود. الیگونوکلئوتیدهای خاص، که در غلظت‌های بالا وجود دارند، با توالی‌های مکمل‌شان در نمونه DNA دورگه خواهند شد، در صورتیکه زنجیره‌های طویل DNA نمونه به علت غلظت کم‌شان خارج می‌شوند. الیگونوکلئوتیدهای دورگه شده بعنوان پرایمرهایی برای سنتز زنجیره DNA در حضور دئوکسی نوکلئوتیدها (dNTP) و یک DNA پلیمراز مقاوم به دما مانند

آنزیم پلیمرازی که از ترموس آکواتیکوس[1] باکتری که در چشمه‌های آب گرم زندگی می‌کند به دست می‌آید، به کار می‌رود. این آنزیم، Taq پلیمراز نامیده می‌شود که می‌تواند حتی در دمای ۹۵ درجه فعال باقی بماند و پرایمرها را در دمای بالاتر از ۷۲ درجه طویل کند. وقتی که سنتز کامل شد، کل ترکیب تا دمای ۹۵ درجه برای دناتوره کردن DNAی دورشته‌ای تازه ساخته شده، گرم می‌شود. بعد از اینکه دوباره دما پائین آورده شد، چرخه دیگر از سنتز به علت وجود پرایمر اضافی اتفاق می‌افتد. چرخه‌های مکرر دناتوره کردن (گرما دادن) که به دنبال دورگه شدن و سنتز (سرد کردن) خواهد بود، به سرعت توالی دلخواه ما را تشدید خواهد کرد. در هر چرخه، تعداد نسخه‌های توالی بین جایگاههای پرایمری دوبرابر می‌شوند؛ بنابراین توالی دلخواه به طور توانی افزایش پیدا می‌کند (در حدود یک میلیون برابر بعد از ۲۰ چرخه) در صورتیکه سایر توالی‌ها در DNAی نمونه بدون ازدیاد باقی می‌مانند.

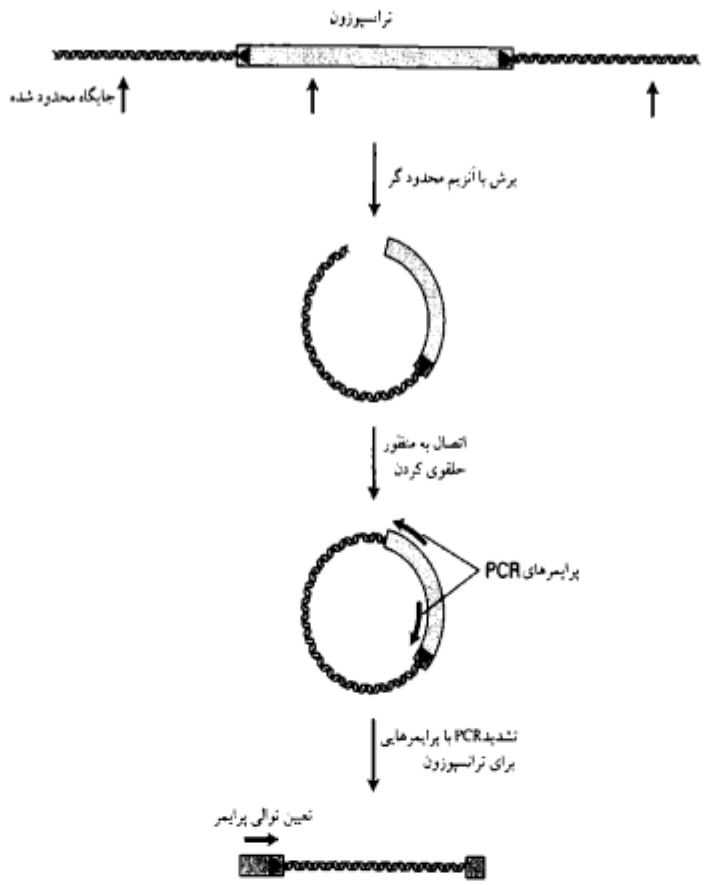
جداسازی مستقیم یک قطعه خاص از DNA ژنومی برای موجودات زنده‌ای که در آن‌ها همه یا قسمت بیشتر ژنوم تعیین توالی شده است، ازدیاد با PCR که با DNA ژنومی کلی شروع می‌شود، اغلب راحت‌ترین روش برای به دست آوردن ناحیه DNAی خاص مورد نظر برای کلون کردن است. در کاربرد برای این منظور، دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی برای دورگه شدن با توالی‌های اطراف ناحیه ژنومی دلخواه طراحی می‌شود و شامل توالی‌هایی هستند که توسط آنزیم‌های محدودکننده خاصی شناسایی می‌شوند (شکل ۲۴-۵). پس از ازدیاد توالی هدف دلخواه برای حدود ۲۰ چرخه PCR، شکست با آنزیم‌های محدوکننده مناسب، تولید قطعات چسبنده را خواهد کرد که اجازه اتصال موثر آن قطعه را به یک حامل پلاسمیدی شکسته شده با همان آنزیم در رابطه چندگانه را خواهد داد. همه پلاسمیدهای نوترکیب حاصل حامل قطعه DNAی ژنومی مشابهی هستند که می‌تواند در سلول‌های E.Coli کلون شود. با اصلاحات خاص PCR حتی قطعات DNA بزرگتر از ۱۰ کیلو باز می‌تواند در این روش کلون شده و ازدیاد یابد.

توجه کنید که این روش، کلون کردن تعداد زیادی از قطعات بدست آمده از DNA ژنومی و غربال بعدی برای شناسایی قطعه خاص مورد نظر را در برنمی‌گیرد. روش PCR این روش سنتی را معکوس کرده است و بنابراین از جنبه‌های یکنواخت آن اجتناب می‌کند. روش PCR برای جداسازی توالی‌های ژنی دستکاری شده در تعدادی از روش‌های مفید (بعدا توضیح داده شده است) استفاده می‌شود. بعلاوه



▲ **شکل تجربی ۲۴-۵ یک ناحیه هدف اختصاصی در DNA ژنومی کل می‌تواند توسط PCR برای استفاده در کلونینگ، ازدیاد حاصل کند.** هر پرایمری برای PCR مکمل یک انتهای توالی هدف و شامل توالی شناسایی برای یک آنزیم محدودکننده است که جایگاهی داخل ناحیه هدف ندارد. در این مثال، پرایمر ۱ دارای یک توالی BamHI هست، در صورتیکه پرایمر ۲ دارای یک توالی HindIII است (توجه کنید برای سادگی، در هر دور، تشدید فقط یکی از دو رشته نشان داده شده است). بعد از تشدید، قطعات هدف با آنزیم‌های محدودکننده مناسب تیمار می‌شوند، که تولید قطعات با انتهاهای چسبنده را می‌کنند. این قطعات می‌توانند به حامل‌های پلاسمیدی ملحق شوند و در E.Coli توسط روش معمول که در شکل ۱۳-۵ آورده شده است، کلون شوند.

1- Thermus aquaticus



▲ **شکل تجربی ۲۵-۵ توالی ژنومی در جایگاه دخول یک ترانسپوزون توسط تشدید با PCR و تعیین توالی شناخته می‌شود.** برای به دست آوردن توالی DNAی جایگاه دخول ترانسپوزون عنصر P نیاز به تشدید با PCR رابط بین توالی‌های ترانسپوزون شناخته شده و توالی‌های ناشناخته در اطراف توالی کروموزومی است. یک روش برای حصول این امر شکست DNA با یک آنزیم محدودکننده است که یک بار در داخل توالی ترانسپوزون شکست ایجاد می‌کند. اتصال قطعات محدود شده اختصاصی حاصل، مولکول‌های DNA حلقوی را تولید خواهد کرد. با استفاده از پرایمرهای DNA طراحی شده مناسب که با توالی‌های ترانسپوزون جفت می‌شوند تشدید توسط PCR از قطعه اتصالی مورد نظر امکانپذیر است. سرانجام، یک واکنش تعیین توالی DNA (شکل ۲۱-۵ را ملاحظه کنید) با استفاده از قطعه تشدید شده با PCR بعنوان یک الگو و یک پرایمر الیگونوکلئوتیدی که با توالی‌های نزدیک به انتهای ترانسپوزون برای ایجاد توالی اتصال بین ترانسپوزون و کروموزوم، انجام می‌شود.

روش PCR می‌تواند برای جداسازی توالی‌های ژنی از موجودات زنده جهش یافته و برای تعیین اینکه چگونه آنها از نوع وحشی متفاوت هستند، استفاده می‌شود. تغییر بر روی روش PCR اجازه ازدیاد از طریق PCR توالی‌های cDNA خاص از mRNAهای سلولی را می‌دهد. این روش بعنوان **PCR با رونوشت بردار معکوس** (RT-PCR) شناخته می‌شود که با همان روشی که قبلا برای جداسازی cDNA از یک مجموعه mRNAهای سلولی توضیح داده شده است، انجام می‌شود. معمولاً یک پرایمر الیگو dT) که با دم‌پلی A انتهای mRNA۳′ دورگه خواهد شد، بعنوان پرایمر برای سنتز اولین زنجیره cDNAیی توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس استفاده می‌شود. یک cDNA خاص می‌تواند از این ترکیب پیچیده cDNA توسط ازدیاد با PCR با استفاده از دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی که برای جفت شدن با توالی‌های موجود در انتهاهای ۵′ و ۳′ RNA مرتبط طراحی شده است، جداسازی شود. همچنانکه قبلا توضیح داده شد، این پرایمرها می‌توانند طوری طراحی شوند که دارای جایگاههای محدود شده برای تسهیل ورود cDNAی تشدید شده به داخل حامل پلاسمیدی مناسب باشند.

تهیه پروب‌ها: قبلا گفتیم که چگونه پروب‌های الیگونوکلئوتیدی به منظور ارزیابی دورگه سازی می‌توانند به طریق شیمیایی سنتز شوند. تهیه چنین پروب‌هایی توسط ازدیاد با PCR نیاز به سنتز شیمیایی فقط دو پرایمر نسبتا کوچک مرتبط با دو انتهای توالی هدف دارد.

نمونه آغازگر برای ازدیاد توسط PCR از توالی هدف می‌تواند DNA ژنومی یا cDNAی سنتز شده از mRNA سلولی باشد. برای تولید محصول نشاندار با رادیواکتیو از PCR، dNTPهای نشاندار با ^{32}P در طی آخرین دوره‌های ازدیاد، لازم است. به خاطر اینکه پروب‌های تهیه شده توسط PCR نسبتا طویل هستند و اتم‌ها ^{32}P رادیواکتیو زیادی دارند که به آنها الحاق یافته است، این پروب‌ها معمولاً علامت خیلی اختصاصی‌تر و قوی‌تر از پروب‌های سنتز شده از طریق شیمیایی را می‌دهند.

نشاندار کردن ژن‌ها توسط ورود جهش‌ها: کاربرد مفید دیگر PCR ازدیاد یک ژن نشاندار شده از DNAی ژنومی یک سوش جهش یافته است. این روش، روش ساده‌تری برای شناسایی ژن‌های مرتبط با فنوتیپ جهش یافته خاص نسبت به غربال کتابخانه توسط مکمل‌سازی عملکردی است (شکل ۱۸-۵ را ملاحظه کنید).

کلید این نوع استفاده از PCR توانایی تولید جهش‌هایی توسط ورود یک توالی DNA شناخته شده به داخل ژنوم یک موجود زنده آزمایشگاهی است. چنین جهش‌های ناشی از ورود می‌تواند با استفاده از **عناصر DNA متحرک**[1] تولید شود، که می‌تواند از یک جایگاه کروموزومی به جایگاه دیگر حرکت کند. چنانکه در فصل ۶ به تفصیل بیان شده است، این توالی‌های DNA به طور طبیعی در ژنوم اغلب موجودات زنده موجود می‌باشد. اگر آنها به یک ناحیه رمزدار کننده پروتئین منتقل شوند ممکن است باعث فقدان عملکرد جهش‌ها شوند، برای مثال، محققان یک عنصر DNA متحرک مگس سرکه راکه بعنوان عنصر P شناخته می‌شد، به منظور بهینه کردن استفاده از تولید آزمایشگاهی جهش‌های دخولی، تغییر دادند. وقتی مشخص شد که دخول عنصر P باعث جهش یا فنوتیپ مورد نظر می‌شود توالی‌های ژنومی مجاور به جایگاه دخول می‌توانند توسط تغییر پروتوکل PCR استاندارد تشدید گردد. که از پرایمرهای سنتزی مکمل با توالی عنصر P شناخته شده استفاده می‌کند ولی اجازه می‌دهد که توالی‌های همسایه ناشناخته نیز زیاد شوند. چنین روشی در شکل ۲۵-۵ ترسیم شده است. با شکست DNAی ژنومی‌مگس سرکه شروع می‌شود که شامل دخول یک عنصر P با یک آنزیم محدودکننده است که DNAی داخل عنصر P را می‌شکند. مجموعه قطعات DNAی شکسته شده که با DNA لیگاز تیمار می‌شوند، مولکول‌های حلقوی را حاصل می‌کنند، برخی از آنها دارای DNA عنصر P هستند. سپس ناحیه کروموزومی در اطراف عنصر P می‌تواند توسط PCR با استفاده از پرایمرهایی که با توالی‌های عنصر P جفت می‌شوند، تشدید شوند و در جهت مخالف طویل شوند. سپس توالی قطعه حاصل می‌تواند با استفاده از پرایمر DNA سوم تعیین شود. توالی اصلی برای شناسایی جایگاه دخول عنصر P ارتباط بین انتهاهای عنصر P و توالی‌های ژنومی است. در کل، این روش از کلون کردن از تعداد زیاد قطعات DNA و غربالگری آنها به منظور شناسایی DNAی کلون شده مرتبط با ژن جهش یافته مورد نظر اجتناب می‌کند.

روش‌های مشابه برای سایر موجودات زنده برای جهش‌های دخولی به کار برده شده است که می‌تواند با استفاده از عناصر DNA متحرک یا ویروس‌ها با ژنومهای تعیین توالی شده که می‌توانند به طور تصادفی در داخل ژنوم وارد شوند، ایجاد شود.

نکات کلیدی بخش ۲-۵

کلونینگ و تعیین خصوصیات DNA

- در کلونینگ DNA مولکول‌های DNA نوترکیب با وارد نمودن قطعات DNA به داخل مولکول‌های DNA حامل، تشکیل می‌شوند. سپس مولکول‌های DNA نوترکیب وارد سلول‌های میزبان شده و در آن جا همانندسازی کرده و مقدار زیادی مولکول DNA نوترکیب تولید می‌کنند.
- آنزیم‌های محدودکننده (اندونوکلئازها) توالی‌های پالیندرو ۴ تا ۸ جفت بازی بریده و قطعات مشخصی را که اغلب دارای انتهای چسبنده می‌باشند تولید می‌کنند.
- دو قطعه حاصل از عمل آنزیم محدودکننده با انتهاهای مکمل می‌توانند با آنزیم DNA لیگاز به هم متصل شده و مولکول DNA نوترکیب را تشکیل دهند (شکل ۱۲-۵ را ملاحظه کنید).
- حامل‌های کلونینگ E.coli مولکول‌های DNA دورشته‌ای کوچک (پلاسمید) بوده و حاوی سه ناحیه عملکردی یعنی مبدأ همانندسازی، ژن مقاوم به دارو و جایگاهی که قطعه DNA را می‌توان به آن وارد کرده، می‌باشد. سلول‌های دارای حامل بصورت‌کلونی‌های روی محیط انتخابی رشد می‌کنند (شکل ۱۳-۵ را ملاحظه کنید).
- کتابخانه DNA مجموعه‌ای از کلون‌های cDNA تهیه شده از mRNA جدا شده از یک نوع خاص از بافت است. کتابخانه ژنومی مجموعه‌ای از کلون‌های حامل قطعاتی می‌باشند که از برش کل ژنوم حاصل شده‌اند.

1-Mobile DNA elements

■ در کلونینگ cDNA، mRNAهای بیان شده در اثر رونویسی معکوس به DNAهای مکمل یا cDNA تبدیل می‌شوند cDNAهای تک رشته‌ای از طریق مجموعه‌ای از واکنش‌ها، به DNAهای دو رشته‌ای تبدیل می‌شوند. cDNAهای دو رشته‌ای را سپس می‌توان به داخل حامل پلاسمیدی وارد نمود (شکل ۱۵-۵ ر ملاحظه کنید).

■ قطعه DNA کلون شده خاص درون کتابخانه را می‌توان با دورگه نمودن به الیگو نوکلئوتید نشان دار با مواد رادیواکتیو شناسایی نمود. این الیگونوکلئوتید توالی مکمل با قسمتی از قطعه DNA کلونی شده دارد.

■ حامل‌های شاتل که هم در مخمر و هم در E.coli همانندسازی می‌کنند را می‌توان برای ساخت کتابخانه ژنومی مخمر استفاده نمود. ژن‌های خاصی را می‌توان از طریق توانایی شان برای مکمل شدن با ژن‌های جهش یافته مرتبط در سلول‌های مخمر جدا نمود (شکل ۱۷-۵ را ملاحظه کنید).

■ قطعات DNA کلون شده بزرگ اغلب با آنزیم‌های محدودکننده بریده شده و قطعات کوچکتر را تولید می‌کنند. سپس این قطعات با الکتروفورز ژل جداشده قبل از تعیین توالی و انجام آزمایش‌های در وکتور پلاسمیدی کلون می‌شوند.

■ قطعات DNA تا طول ۵۰۰ نوکلئوتید بر اساس روش سانجر (خاتمه زنجیره با دی‌دئوکسی) در دستگاه‌های خودکار تعیین توالی می‌شوند.

■ کل توالی ژنوم را می‌توان از کنار هم قرار دادن توالی تعداد زیادی از کلون‌های همپوشانی حاصل از کتابخاه ژنومی به دست آورد (شکل ۲۲-۵ را ملاحظه کنید).

■ واکنش زنجیره‌های پلیمراز (PCR) امکان تکثیر توانی یک قطعه خاص از مولکول DNAی الگو را می‌دهد. برای تکثیر ناحیه‌ای از DNA بایستی توالی اطراف آن را داشت.

■ PCR روشی چندکاره بوده و می‌توان آن را برای تکثیر توالی DNA ژنومی خاص، cDNA یا توالی تقاطع بین قطعه قابل انتقال و توالی‌های کروموزومی کناری به کار برد.

۵-۳ استفاده از قطعات DNA کلون شده برای مطالعه بیان ژن

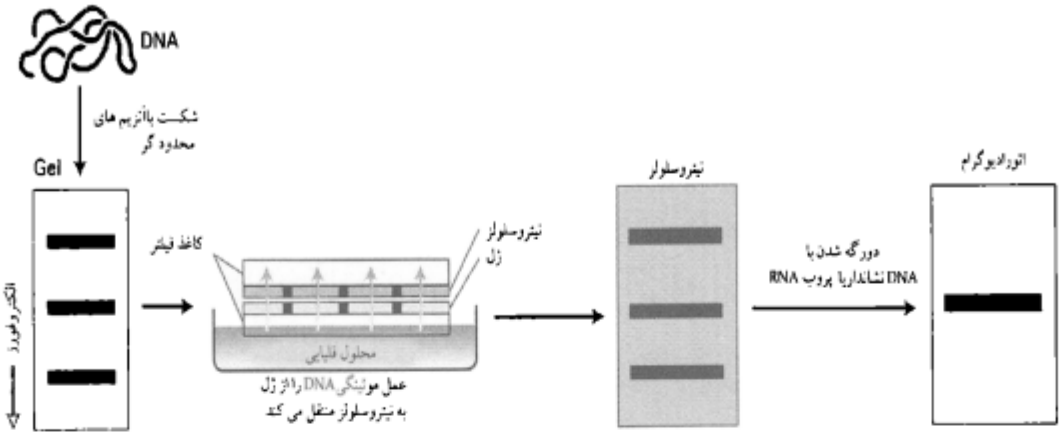
در قسمت قبلی ما تکنیک‌های پایه‌ای را برای استفاده از فن آوری DNA نوترکیب به منظور جداسازی کلون‌های DNA اختصاصی و همچنین روش‌هایی را که این کلون‌ها می‌توانستند بیشتر شناسایی بشوند را توضیح دادیم. اکنون ما به این نکته توجه می‌کنیم که چگونه یک کلون DNA جداسازی شده می‌تواند به منظور مطالعه بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد. ما چندین تکنیک عمومی را که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند و با تکیه بر دورگه سازی اسید نوکلئیک به منظور توضیح اینکه چه وقت و در کجا ژن‌ها بیان می‌شوند و همچنین روش‌هایی را برای تولید مقادیر زیاد پروتئین و به عبارت دیگر دستکاری توالی‌های اسید آمینه‌ای برای تعیین الگوی بیان، ساختار و عملکرد آنها را، توضیح می‌دهیم.

تکنیک‌های دورگه سازی (هیبریداسیون) اجازه شناسایی قطعات DNA اختصاصی و mRNAها را می‌دهند

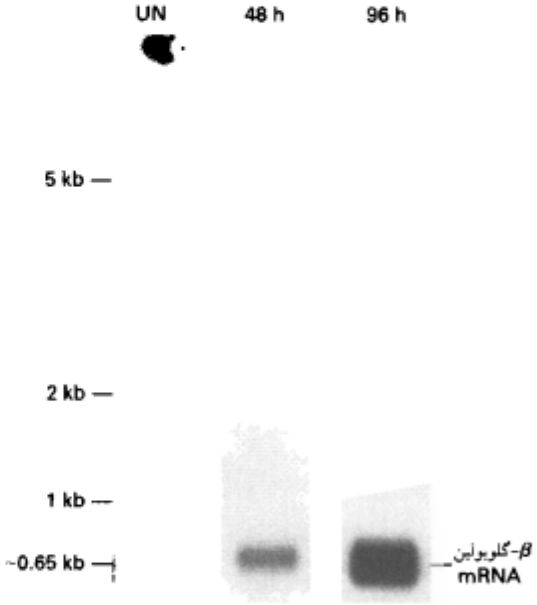
دو روش خیلی حساس برای شناسایی یک توالی DNA یا RNAی خاص در درون یک ترکیب پیچیده، جداسازی با الکتروفورز ژلی و دورگه سازی را با یک پروب DNA نشاندار با رادیواکتیو مکمل ترکیب می‌کند. سومین روش شامل دورگه سازی پروب‌های نشاندار به طور مستقیم با نمونه بافتی تهیه شده، است. این سه تکنیک چندین کاربرد دارند.

لکه گذاری ساترن اولین روش دورگه سازی برای شناسایی قطعات DNA با توالی اختصاصی است که به خاطر ابداع کننده آن ای.ام.ساترن[1]، بعنوان لکه گذاری ساترن شناخته می‌شود. این تکنیک توانایی شناسایی یک قطعه محدود شده خاص را در ترکیب پیچیده‌ای ازقطعات تولید شده توسط شکست کل ژنوم انسانی با یک آنزیم محدودکننده را دارد. وقتی که چنین ترکیب پیچیده‌ای مورد الکتروفورز ژلی قرار می‌گیرد، قطعات مختلف زیادی با اندازه تقریباً برابر وجود دارند که جدا کردن هر کدام از قطعات DNAی خاص بصورت باند ضخیم بر روی ژن امکان‌پذیر نیست. با وجود این شناسایی یک قطعه خاص که بصورت یک باند روی ژل حرکت می‌کند توسط توانایی آن برای دورگه شدن با پروب DNAیی خاص امکانپذیر است. قطعات محدود شده موجود در ژل با قلیا دناتوره می‌شوند و بر روی فیلتر نیتروسلولز یا غشا نایلونی توسط لکه گذاری[2] (شکل ۲۶-۵) انتقال داده می‌شوند. در این روش توزیع قطعات بر روی ژل حفظ می‌شود و ایجاد یک رپلیکا از ژل بر روی فیلتر می‌کند (بلات به این خاطر مورد استفاده قرار می‌گیرد که پروب‌ها به راحتی نمی‌توانند به داخل ژل اصلی منتشر شوند). سپس فیلتر در شرایط دورگه سازی با پروب DNA نشاندار شده با رادیو

1-E.M.Southern 2- Blotting



▲ **شکل تجربی ۲۶-۵ لکه‌گذاری ساترن می‌توان قطعه DNAی خاصی را در یک ترکیب پیچیده از قطعات محدودشده شناسایی کند.** این دیاگرام سه قطعه محدودشده را در ژن ترسیم می‌کند، این روش می‌تواند برای ترکیبی از میلیونها قطعه DNA به کار رود فقط قطعاتی که با یک پروب نشاندار دورگه می‌شوند بر روی اتورایوگرام ایجاد علامت می‌کنند. تکنیک مشابه لکه‌گذاری نوترن نامیده می‌شود که mRNAهای خاص را در داخل یک ترکیب شناسایی می‌کند.



▲ **شکل تجربی ۲۷-۵ ارزیابی لکه گذاری نورترن از بیان افزایش یافته mRNAی β-گلوبین در سلول‌های اریترولوکمیای تمایز یافته را نشان می‌دهد.** mRNA کل در سلول‌های اریترولوکمیا که در حال رشد بودند ولی تحت تاثیر قرار نگرفته بودند و در سلول‌های القاء شده به منظور توقف رشد و تمایز یافتن برای حدود ۴۸ ساعت یا ۹۶ ساعت توسط لکه گذاری نورترن برای mRNAی β- گلوبین مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت یک باند متناسب با میزان mRNAی موجود است. mRNAی β- گلوبین در سلول‌های تحت تاثیر قرار نگرفته به ندرت قابل تشخیص است (ردیف UN) ولی در طی ۹۶ ساعت بعد از تمایز القا شده حدود ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد.

اکتیو انکوبه می‌شود، که معمولاً از یک قطعه محدود شده کلون شده ایجاد شده است، قطعه محدود شده DNAی مکمل پروب با آن دورگه ایجاد می‌کند و مکان آن بر روی فیلتر می‌تواند توسط اتورادیوگرافی تشخیص داده شود.

لکه گذاری نورترن[1]. یکی از روش‌های اولیه برای شناسایی یک ژن کلون شده تشخیص این نکته است که چه زمانی و در کجای موجود زنده آن ژن بیان می‌شود. بیان یک ژن خاص می‌تواند توسط ارزیابی mRNAی مرتبط با آن توسط **لکه گذاری نورترن** پی‌گیری شود. یک نمونه RNA، (که اغلب اوقات RNA سلولی کل است)، توسط تیمار با عواملی از قبیل فرمالدئید که پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها را از بین می‌برد و تضمین می‌کند که همه مولکول‌های RNA ساختاربندی تا نخورده و خطی داشته باشند دناتوره می‌شود. RNAهای منفرد بر اساس اندازه‌شان در روی الکتروفورز ژلی جداسازی شده و به یک فیلتر نیتروسلولز که به آن RNAهایی با ساختار دناتوره و باز متصل می‌شوند، انتقال می‌یابند. همانند روش ساترن، فیلتر در معرض پروب DNA نشاندار قرار می‌گیرد که مکمل ژن مورد نظر است. سرانجام، فیلتر نشاندار مورد اتورادیوگرافی قرار می‌گیرد. به خاطر اینکه مقدار یک RNAی خاص در یک نمونه می‌تواند از لکه گذاری نورترن برآورد شود، این روش به طور گسترده برای مقایسه مقادیر یک mRNA خاص در سلول‌ها در شرایط

1- Northern blotting

مختلف استفاده می‌شود (شکل ۲۷-۵)

دورگه شدن درجا[1]. در روش لکه گذاری نورترن نیاز به استخراج mRNA از یک سلول یا ترکیبی از سلول‌ها است که در این حالت سلول‌ها از مکان طبیعی‌شان در داخل یک موجود زنده یا بافت برداشته شده‌اند، در نتیجه مکان سلول و ارتباط آن با سلول‌های مجاورش از بین می‌رود. برای کسب اطلاعات بیشتر در مطالعات دقیق‌تر از بیان ژن، کل یا قسمتی از بافت و یا حتی کل چنین نفوذپذیر شده ممکن است مورد **دورگه سازی** درجا برای شناسایی و اندازه‌گیری mRNAی رمزدار شده توسط یک ژن خاص قرار بگیرد. این تکنیک اجازه می‌دهد که رونویسی از ژن در هر زمان و هر مکانی معلوم شود (شکل ۲۸-۵).

ریزآرایه‌های DNA می‌توانند به منظور ارزیابی بیان بسیاری از ژن‌ها در یک زمان مورد استفاده قرار گیرند

نمایش بیان هزاران ژن به طور همزمان با تجزیه تحلیل **ریزآرایه‌های DNA** امکان‌پذیر است، که تکنیک دیگری است که براساس دورگه شدن اسید نوکلئیک پایه گذاری شده است. یک آرایه DNA شامل یک آرایشی سازمان یافته از هزاران توالی خاص ژنی مجزا هست که در کنار هم قرار گرفته‌اند و به سطح یک لام میکروسکوپی شیشه‌ای متصل شده‌اند. با تلفیق برآورد ریزآرایه با نتایج حاصل از پروژه‌های تعیین توالی ژنوم، محققان می‌توانند الگوی گروهی بیان ژن یک موجود زنده را در طی پاسخهای فیزیولوژیکی یا فرآیندهای تکوینی مورد تجزیه تحلیل قرار دهند.

تهیه ریزآرایه‌های DNA: در روشی برای تهیه ریزآرایه‌ها، قسمتی در حدود یک کیلوباز از ناحیه رمزدار کننده هر ژن مورد بررسی، بطور مجزایی توسط PCR تشدید می‌شود. یک وسیله رُباتی برای قرار دادن نمونه DNA تشدید شده بر روی سطح لام شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد و سپس به منظور اینکه توالی‌های DNAیی به طور دائم روی سطح شیشه‌ای قرار بگیرند و به منظور دناتوره کردن آنها فرآیندهای شیمیایی بر روی آنها انجام می‌گیرد. یک آرایه معمولی ممکن است دارای حدود ۶۰۰۰ قطعه از DNA در لام ۲×۲cm باشد.

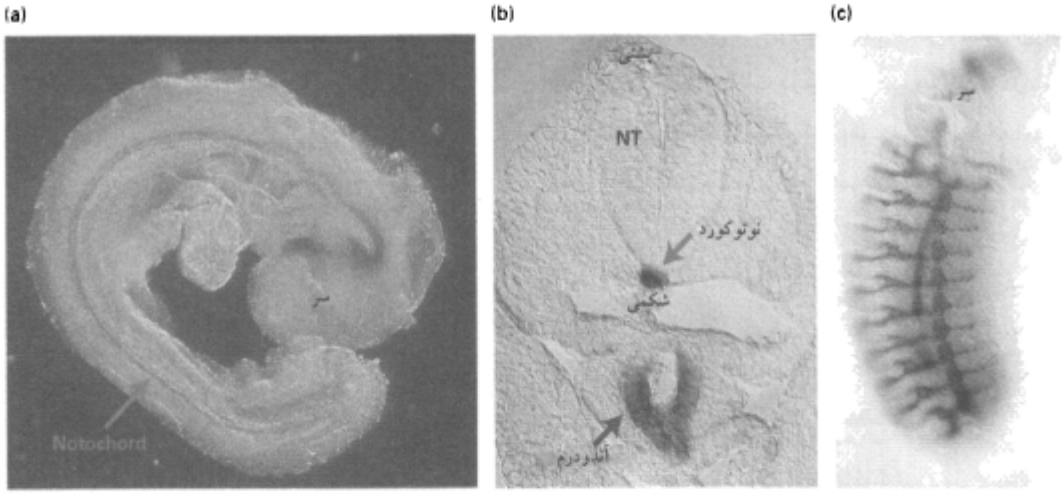
در روشی جایگزین، الیگونوکلئوتیدهای چندگانه، (که معمولاً اندازه شان ۲۰ نوکلئوتید است) از یک نوکلئوتید اولیه سنتز می‌شوند و به طور کووالان به سطح لام شیشه‌ای متصل می‌شوند. سنتز یک نوکلئوتید از توالی خاص می‌تواند در یک ناحیه کوچک بر روی سطح لام انجام شود. چندین توالی الیگونوکلئوتیدی از یک ژن منفرد در نواحی مجاور لام به منظور بررسی بیان آن ژن سنتز می‌شوند. با این روش، الیگونوکلئوتیدهای نشان دهنده هزاران ژن می‌توانند تنها بر روی یک لام شیشه‌ای تولید شوند. به خاطر اینکه روش‌های ساخت این آرایه‌های الیگونوکلئوتیدهای سنتزی با روش‌های ساختن مدارهای میکروسکوپی استفاده شده در کامپیوترها مشابهت دارد، این نوع از ریزآرایه‌های الیگونوکلئوتیدی اغلب اوقات چیپ‌های DNA[2] نامیده می‌شوند.

استفاده از ریزآرایه‌ها به منظور مقایسه بیان ژن در شرایط مختلف.

مرحله ابتدایی در مطالعه بیان ریزآرایه، آماده سازی cDNAهای نشاندار با فلورسانت مرتبط با mRNAهای بیان شده توسط سلول‌های در حال مطالعه است. وقتی cDNA در ریزآرایه به کار برده می‌شود، نقطه‌های نشان دهنده ژن‌های بیان شده، هست که در شرایط مناسب با cDNAهای مکمل‌شان در ترکیب پروب نشاندار شده جفت خواهند شد و بعدا می‌توانند در میکروسکوپ پویش کننده با لیزر[3] مورد شناسایی قرار بگیرند.

شکل ۲۹-۵ می‌گوید که چگونه این روش می‌تواند برای بررسی تغییرات در بیان ژن مورد مشاهده بعد از اینکه فیبروبلاست‌های انسان از محیط عاری از مواد غذایی به محیط رشد غنی انتقال داده می‌شوند، به کار رود. در این نوع آزمایش، cDNAهای جدا شده از فیبروبلاست‌های رشد داده شده در سرم و عاری از مواد غذایی، با رنگ‌های فلورسانت نشاندار می‌شوند. سپس یک آرایه DNA دارای ۸۶۰۰ ژن پستاندار با مخلوطی حاوی مقادیر مساوی از دو دسته cDNAهای متفاوت در شرایط جفت شدن قرار می‌گیرند. بعد از اینکه cDNAهای جفت شده، شسته شدند، شدت فلورسانس سبز و قرمز در هر نقطه DNA با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس اندازه‌گیری می‌شود و نام هر ژن براساس موقعیت آن بر روی لام در پرونده‌های کامپیوتری ذخیره می‌شود. شدت‌های نسبی علائم فلورسانس قرمز و سبز در هر نقطه مقدار نسبی از بیان آن ژن در پاسخ به سرم هستند. ژن‌هایی که تحت این شرایط رونویسی نمی‌شوند، علامتی ایجاد نمی‌کنند. ژن‌هایی که در همان مقدار در هر دو شرایط رونویسی می‌شوند به طور مساوی با هر دو cDNAهای

1-In situ hybridization 2- DNA Chips
3- Scaning laser microscope



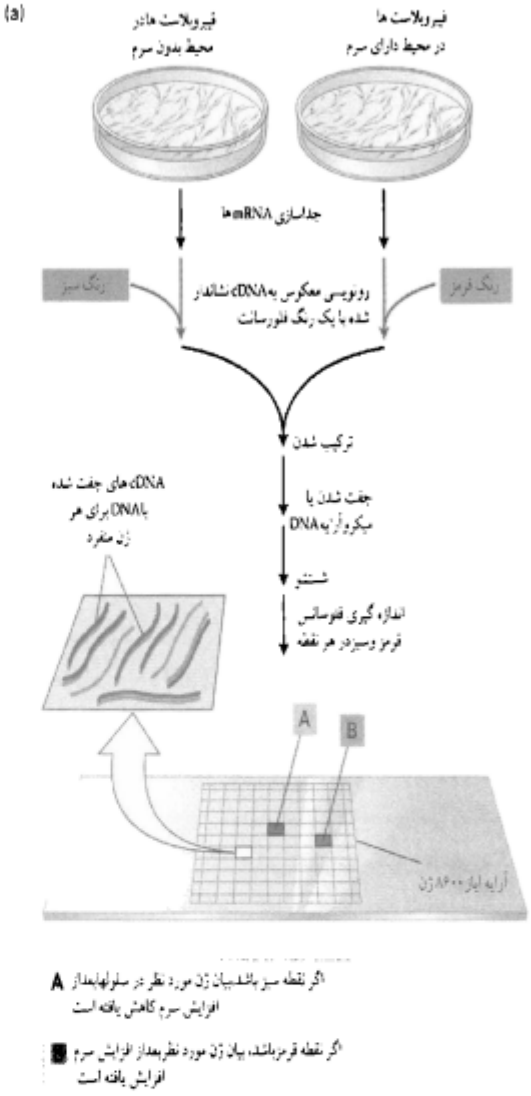
▲ **شکل تجربی ۲۸-۵ دورگه شدن درجا می‌تواند فعالیت ژن‌های خاص در کل و قسمتی از جنین را اندازه‌گیری کند.** نمونه توسط تیمار با دترژان و یک پروتئاز که mRNA را در معرض پروب قرار می‌دهد، نفوذپذیر می‌شود. یک پروب DNA یا mRNA، (مختص mRNA مورد نظر)، با مشتقات نوکلئوتیدی دارای گروه‌های شیمیایی که توسط آنتی بادی‌ها شناسایی می‌شوند، ساخته می‌شود. بعد از اینکه نمونه نفوذپذیر شده با پروب در شرایطی که دورگه شدن را شروع می‌کند، انکوبه شد، پروب اضافی توسط شستشو برداشته می‌شود. سپس نمونه در محلول دارای آنتی بادی که به پروب متصل می‌شود، انکوبه می‌شود. این آنتی بادی بطور کووالان به یک آنزیم گزارشگر (مانند، پراکسیداز تربچهٔ کوهی [1] یا فسفاتاز قلیایی) متصل می‌شود یک محصول رنگی تولید می‌کند. بعد از اینکه آنتی بادی اضافی برداشته شد، سوبسترای آنزیم گزارشگر اضافه می‌شود. یک رسوب رنگی در جنین‌هایی که پروب با mRNA دورگه شده است تشکیل می‌گردد. (a) جنین کامل موش ۱۰ روزه برای mRNAی Sonic hedghog مورد شناسایی قرار گرفته است. رنگ نوتوکورد را (یک نواری از مزودرم که در طول طناب نخاعی آینده کشیده شده است) را نشان می‌دهد (b) یک قسمت از جنین موش شبیه به قسمت (a). محور پشتی و شکمی از لوله عصبی (NT) می‌تواند با نوتوکورودی که بیان کننده sonic hedghog در زیر آن است و آندورم که هنوز بیشتر شکمی است، دیده شود. (c) جنین مگس سرکه کامل برای یک mRNA تولید شده در طی تکوین تراشه، نشاندار شده است. الگوی تکراری از قطعات بدنی قابل مشاهده است. قسمت جلویی به طرف بالا قرار گرفته است: قسمت شکمی به طرف چپ قرار گرفته است.

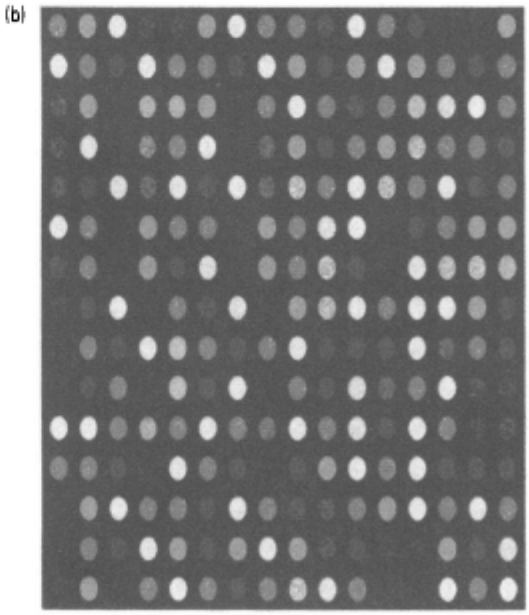
نشاندار سبز و قرمز جفت خواهند شد. برآورد ریزآرایه‌ای از بیان ژن در فیبروبلاست نشان داده که رونویسی حدود ۵۰۰ ژن از ۸۶۰۰ ژن مورد بررسی، بعد از افزودن سرم به طور زیادی تغییر کرد.

تجزیه تحلیل دسته‌ای از آزمایش‌های بیانی چندگانه ژن‌هایی راکه با هم تنظیم می‌شوند شناسایی می‌کند

به ندرت می‌توان از یک آزمایش ریزآرایه در مورد اینکه آیا ژن‌هایی که تغییرات مشابهی در بیان دارند یا با هم تنظیم می‌شوند و از لحاظ عملکردی به هم وابستگی نزدیکی دارند، نتیجه‌گیری قطعی کرد. برای مثال، بسیاری از اختلافات مشاهده شده که در بیان ژن در مورد فیبروبلاست‌ها توضیح داده شد، می‌تواند نتایج غیرمستقیم تغییرات مختلف زیادی در فیزیولوژی سلول باشد که وقتی که سلول‌ها از یک محیط به محیط دیگر منتقل می‌شوند، اتفاق می‌افتد. به عبارت دیگر، ژن‌هایی که در آزمایش بیانی ریزآرایه‌ای در ظاهر با هم تنظیم می‌شوند، ممکن است متحمل تغییراتی در بیان بنا به چندین دلیل مختلف شوند و در واقع ممکن است که عملکردهای زیست شناختی متفاوتی دارند. یک راه حل برای این مساله ترکیب اطلاعات حاصل از یک عده از آزمایش‌های آرایه‌ای بیان ژن برای یافتن ژن‌هایی که به طور مشابه در چندین شرایط یا خارج از یک دوره زمانی تنظیم می‌شوند، است. این چنین استفاده از آزمایش‌های آرایه‌ای بیانی چندگانه توسط بررسی ۸۶۰۰ ژن در زمانهای مختلف بعد از افزایش سرم، تولید بیش از 10^4 دسته مجزا از داده‌ها را می‌کند. یک برنامه کامپیوتری مرتبط برای تعیین نسبت توالی‌های پروتئینی مختلف به کار می‌رود که می‌تواند این داده‌ها را سازماندهی کند و ژن‌هایی راکه بیان مشابهی بعد از افزایش سرم نشان می‌دهند را دسته بندی کند. بطور قابل ملاحظه‌ای، چنین گروه‌های تجزیه تحلیلی دسته‌ای، ژن‌هایی را که پروتئین‌هایی را رمزدار می‌کند که در فرآیندهای سلولی مشترک شرکت می‌کنند، دسته بندی می‌کند مثلاً ژن‌های بیوسنتز کلسترول یا چرخه سلولی (شکل ۳۰-۵).

1- Horese radish peroxidase(HRP)



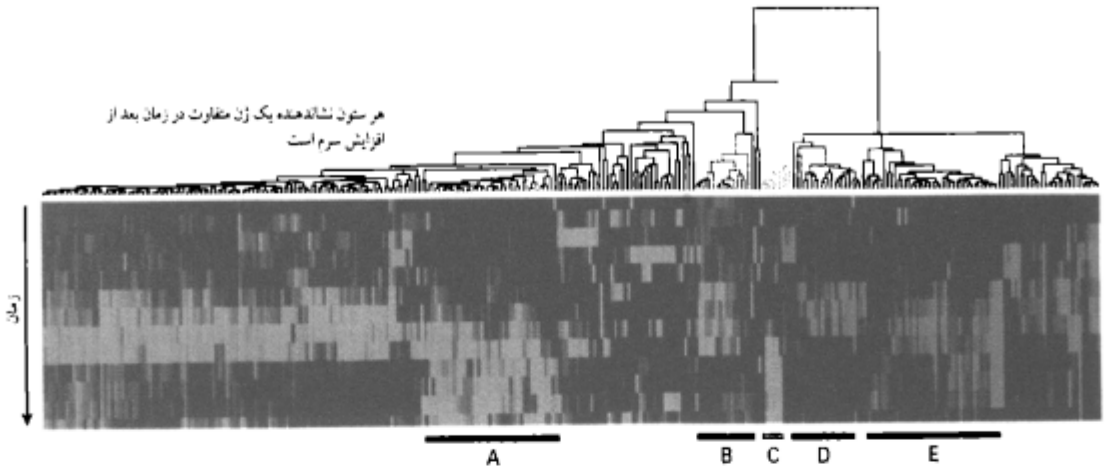


◀ شکل تجربی ۲۹-۵ (شکل رنگی) تجزیه تحلیل ریزآرایه DNAیی می‌تواند اختلافات در بیان ژن فیبروبلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی متفاوت را آشکار کند. (a) در این مثال، cDNAی تهیه شده از mRNAی جداسازی شده از فیبروبلاستهای مهم در شرایط فقر سرمی و هم در شرایط افزودن سرم با رنگ‌های فلورسانت متفاوت نشاندار شده‌اند. یک ریزآرایه از نقطه‌های DNA نشاندهنده ۸۶۰۰ ژن پستانداری، در مقابل مقدار مساوی از دو cDNA تهیه شده تحت شرایط جفت شدن قرار می‌گیرد. نسبت شدت رنگ‌های قرمز و سبز در هر نقطه، با میکروسکوپ پویش‌کننده با لیزر کانفوکال اندازه‌گیری شد، که حاکی از بیان نسبی هر ژن در پاسخ به سرم بود. (b) میکروگرافی از یک قطعه کوچک از ریزآرایه DNA. هر نقطه در این آرایه ۱۶×۱۶ تایی دارای DNAی ژن‌های مختلف جفت شده با نمونه‌های cDNA کنترل و آزمایشگاهی نشاندار با رنگ‌های فلورسانت قرمز و سبز است. (نقطه زرد نشان‌دهنده جفت شدن مساوی رنگ‌های فلورسانس قرمز و سبز است که حاکی از این است که بیان ژن تغییری نداشته است).

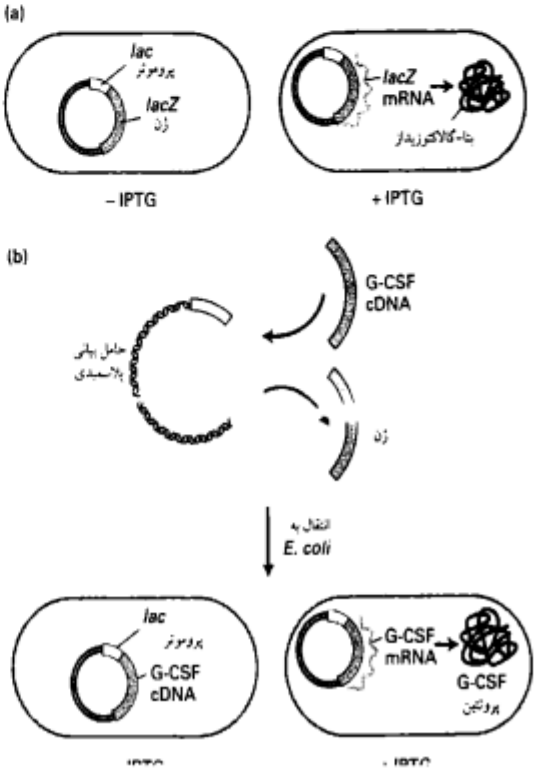
در آینده، تجزیه تحلیل ریزآرایه‌ای ابزار تشخیصی قدرتمندی در پزشکی خواهد بود. برای مثال، عده خاصی از mRNAها یافت شده‌اند که تومورهایی را که کمتر از بقیه قابل تشخیص هستند شناسایی می‌کنند. بیماریهایی که قبلاً غیرقابل تشخیص بودند، در حال حاضر قابل شناسایی شده‌اند. تجزیه تحلیل بیوپسی‌های تومور برای این mRNAهای شناسایی کننده تومورها به پزشکان برای انتخاب روش درمانی مناسب کمک خواهند کرد. همچنانچه الگوهای بیانی ژنی بیشتر مشخصه چندین بافت بیمار شناسایی می‌شود، استفاده تشخیصی از ریزآرایه‌های DNA گسترش می‌یابد.

سیستم‌های بیان E.Coli می‌توانند تولید مقادیر زیادی پروتئین از ژن‌های کلون شده را بکنند.

بسیاری از هورمونهای پروتئینی و سایر پروتئین‌های تنظیمی و پیام رسان به طور طبیعی در غلظت‌های بسیار پائین بیان می‌شوند و مانع از جداسازی و خالص سازی آنها در مقادیر زیاد توسط روش‌های بیوشیمیایی استاندارد می‌شود. استفاده درمانی گسترده از چنین پروتئین‌هایی و همچنین تحقیقات پایه بر روی ساختار و عملکرد آنها، به روش‌های موثر برای تولید مقادیر زیاد در قیمتی معقول از این پروتئین‌ها بستگی دارد. تکنیک‌های DNA نوترکیب سلول‌های E.Coli را تبدیل به



▲ **شکل‌تجربی ۳۰-۵ (شکل رنگی) تجزیه تحلیل دسته‌ای از داده‌های آزمایشهای بیان ریزآرایه‌ای چندگانه می‌تواند ژن‌هایی را که با هم تنظیم می‌شوند را شناسایی کند.** بیان ۸۶۰۰ ژن پستانداری توسط تجزیه تحلیل ریزآرایه‌ای در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بعد از اینکه فیبرولاست‌های دچار فقر سرم، در محیط سرم‌دار قرار گرفتند، اندازه‌گیری شد. دیاگرام دسته‌ای که در شکل نشان داده شده براساس الگوریتم کامپیوتری است و گروه‌های ژنی را که تغییرات بیانی مشابهی در مقایسه با نمونه کنترلی دچار فقر سرم را با زمان نشان می‌دهد. هر ستون از خانه‌های رنگی نشاندهنده یک ژن منفرد است و هر ردیف نشان دهنده یک نقطه زمانی است. خانه قرمز افزایش بیان را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد. یک خانه سبز، کاهش در بیان و خانه سیاه عدم تغییر در بیان را نشان می‌دهد. دیاگرام درخت مانند در بالای دیاگرام نشان می‌دهد که چگونه الگوهای بیان ژن‌های منفرد می‌تواند به گروهی که با هم بیشترین شباهت را در الگوی بیان در زمان دارند، سازماندهی شوند. پنج دسته از ژن‌هایی که با هم تنظیم می‌شدند در این آزمایش شناسایی شده و توسط خطهایی در زیر نشان داده شده‌اند. هر دسته دارای چندین ژن هست که پروتئین‌هایی را رمزدار می‌کنند که در یک فرآیند سلولی خاص عمل می‌کنند: سنتز کلسترول (A) چرخه سلولی (B) پاسخ اولیه (C) پیام رسانی و مرگ زایی (D) و ترمیم زخم و شکل دهی بافت (E).



▶ **شکل تجربی ۳۱-۵ برخی از پروتئین‌های یوکاریوتی می‌توانند در سلول‌های E.Coli از حامل پلاسمیدی دارای پروموتر Lac تولید شوند.** (a) حامل بیانی پلاسمیدی دارای یک قطعه از کروموزوم E.Coli دارای پروموتر Lac و ژن LacZ در کنار آن است. در حضور مشتق لاکتوز یعنی IPTG، RNA پلیمراز به طور طبیعی از ژن LacZ رونویسی می‌کند، که تولید mRNAی LacZ را می‌کند، که پروتئین بتاگالاکتوزیداز را ایجاد می‌کند. (b) ژن LacZ می‌تواند از حامل بیانی توسط آنزیم‌های محدودکننده [illegible] شود، در این حالت یک فاکتور محرک کلونی گرانولوسیتی (G-CSF) رمزدار می‌شود. وقتی پلاسمید حاصل به سلول‌های E.Coli منتقل شود، افزایش IPTG و رونویسی بعدی از پروموتور Lac تولید mRNAی G-CSF را خواهد کرد و آن نیز به پروتئین G-CSF تبدیل می‌شود.

کارخانه‌هایی می‌کنند که برای سنتز پروتئین‌های با مقدار کم که امروزه برای تولید تجارتی‌فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت

(G-CSF)، انسولین، هورمون رشد و سایر پروتئین‌های انسانی با استفاده درمانی به کار می‌روند. برای مثال، G-CSF تولید گرانولوسیت‌ها و سلول‌های سفید خونی فاگوسیت کننده لازم برای دفاع بر علیه عفونت‌های باکتریایی را تحریک می‌کند و بدان جهت بیماران را برعلیه عفونت جدی وقتی که تحت شیمی درمانی هستند، حفاظت می‌کند.

اولین مرحله در تولید مقادیر زیاد یک پروتئین، به دست آوردن کلون DNAی رمزدار کننده پروتئین کامل با استفاده از روشهایی است که قبلا توضیح داده شده است. مرحله دوم مهندسی حامل‌های پلاسمیدی است که مقادیر زیادی از پروتئین رمزدار شده را وقتی که وارد سلول‌های E.Coli می‌شوند بیان کنند، کلید طراحی چنین حامل‌های بیانی وارد کردن یک پروموتر است، (توالی DNAیی که رونویسی cDNA را می‌تواند شروع کند).

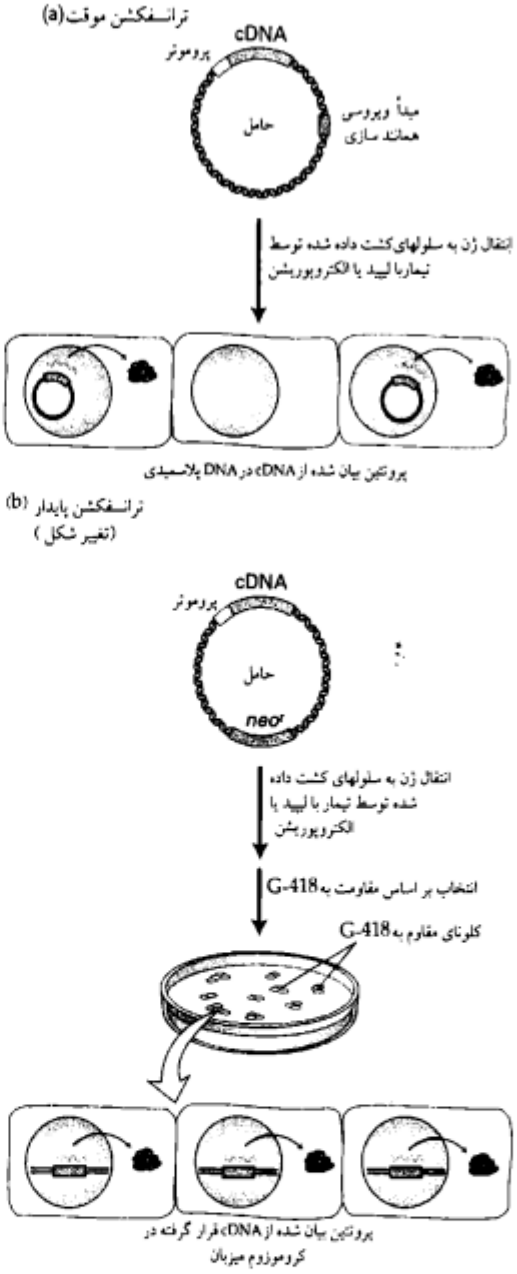
بعنوان مثال، سیستم نسبتا ساده برای بیان G-CSF در شکل ۳۱-۵ آورده شده است. در این حالت، G-CSF در E.Coli با حامل‌های پلاسمیدی که دارای پروموتر Lac نزدیک به cDNAی رمزدار کننده G-CSF کلون شده هستند، بیان می‌شوند. رونویسی از پروموتور Lac در سرعت بالا فقط وقتی لاکتوز، یا مشتق لاکتوز مانند ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG)، به محیط کشت اضافه شده است، اتفاق می‌افتد. حتی مقادیر بیشتر پروتئین مورد نظر می‌تواند در سیستم‌های بسیار پیچیده‌تر از سیستم‌های بیانی E.Coli تولید شوند. به منظور کمک به خالص سازی یک پروتئین یوکاریوتی تولید شده در یک سیستم بیانی E.Coli، محققان اغلب اوقات در cDNA رمزدار کننده پروتئین نوترکیب به منظور تسهیل جداسازی آن از پروتئین‌های E.Coli تغییراتی می‌دهند. یک تغییر از این نوع که بطور معمول استفاده می‌شود افزودن یک توالی نوکلئوتیدی کوتاهی به انتهای cDNA است که پروتئینی را رمزدار می‌کند که دارای شش رزیدوی هیستیدین در انتهای کربوکسیل است. پروتئینی که به این صورت تغییر داده شده است به طور محکم به یک بستر تمایلی که حاوی اتم‌های نیکل شلاته شده است متصل می‌شود در صورتیکه بیشتر پروتئین‌های E.Coli به بستر متصل نخواهد شد. پروتئین‌های متصل شده می‌توانند توسط کاهش pH محیط اطراف آن از اتم‌های نیکل، جدا شوند. در بیشتر حالات، این روش پروتئین نوترکیب خالص را تولید می‌کند که دارای عملکرد است، زیرا افزودن توالی‌های اسیدآمینه‌ای کوتاه هم به انتهای کربوکسیل و هم به انتهای آمین از یک پروتئین معمولاً با فعالیت بیوشیمیایی پروتئین مداخله نخواهد کرد.

حامل‌های بیانی پلاسمیدی می‌توانند برای استفاده در سلول‌های جانوری طراحی شوند

در حالیکه سیستم‌های بیانی باکتریایی به طور موفقیت‌آمیزی می‌توانند برای ایجاد مقادیر زیادی از پروتئین به کار روند، باکتری‌ها نمی‌توانند در همه حالات مورد استفاده قرار گیرند. بسیاری از آزمایش‌های برای بررسی عملکرد یک پروتئین در زمینه سلولی مناسب نیاز به بیان پروتئین دارند که از لحاظ ژنتیکی در سلول‌های جانوری کشت شده، تغییر داده شده‌اند. ژن‌ها در داخل حامل‌های بیانی یوکاریوتی خاصی کلون می‌شوند و در داخل سلول‌های جانوری توسط فرآیندی به نام **ترانس فکشن**[1] قرار داده می‌شوند دو دو روش معمول برای انتقال ژن به سلول‌های جانوری در اینکه آیا DNAی حامل نوترکیب در DNAی ژنومی سلول میزبان قرار می‌گیرد یا نه، وجود دارد. در هر دو روش، سلول‌های جانوری کشت داده شده بایستی به منظور تسهیل جذب حامل پلاسمیدی نوترکیب تیمار شوند. این امر می‌تواند توسط در معرض قرار دادن سلول‌ها به ترکیبات لیپیدی که به غشا پلاسمایی نفوذ می‌کنند و نفوذپذیری آن را به DNA افزایش می‌دهند، انجام می‌شود. یا اینکه سلول‌ها مورد شوک الکتریکی مختصر با چندین هزار ولت قرار گیرند، تکنیکی که **الکتروپوریشین**[2] شناخته می‌شود. این امر سلول‌ها را به طور موقت به DNA نفوذپذیر می‌سازد. معمولاً DNA پلاسمیدی به منظور تضمین اینکه نسبت زیادی از سلول‌های کشت داده شده، حداقل یک نسخه از DNA پلاسمیدی را دریافت خواهند کرد، با غلظت کافی افزوده می‌شود. محققان همچنین از ویروس‌های بی‌خطر برای استفاده در آزمایشگاه به کار می‌برند. ویروس‌ها می‌توانند تبدیل به نگهدارنده DNA مورد نظر شوند و که سپس در داخل سلول‌های میزبان توسط عفونی کردن آنها با ویروس نوترکیب قرار می‌گیرند.

ترانسفکشن موقت. ساده‌ترین روش از دو روش بیانی، **ترانسفکشن موقت** نامیده می‌شود که حامل مشابه با حامل‌های شاتل مخمری را که قبلا توضیح داده شده است، به کار می‌برد. برای استفاده در سلول‌های پستانداران، حامل‌های پلاسمیدی همچنین برای حمل کردن یک مبدأ همانندسازی مشتق از ویروس که سلول‌های پستانداران را عفونی می‌کند، یک پروموتر قوی که توسط RNA پلیمراز پستانداران شناسایی می‌شود و cDNA کلون شده رمزدار کننده پروتئین که در کنار پروموتور قرار می‌گیرد، طراحی می‌شود

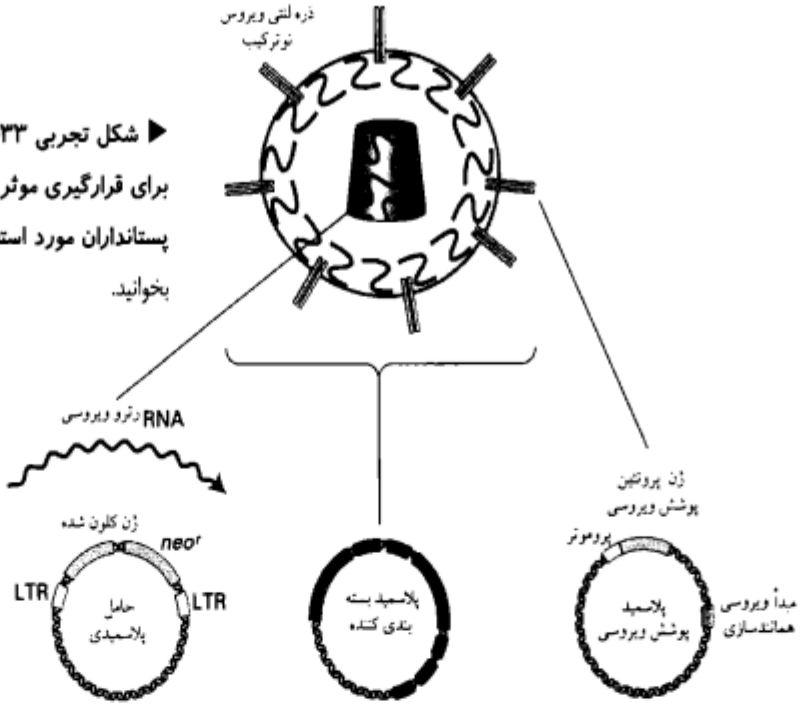
1- Transfection 2- Electroporation



◀ شکل تجربی ۳۲-۵ ترانسفکشن موقت و پایدار با حامل‌های پلاسمیدی طراحی شده اجازه بیان ژن‌های کلون شده در سلول‌های جانوری کشت داده شده را می‌دهند. هر دو روش حامل‌های پلاسمیدی را که دارای عناصر معمول (ORI، نشانگر قابلیت انتخاب، (مثلاً amp) و رابط چندگانه) که اجازه ازدیاد در E.Coli و دخول یک cDNA کلون شده با یک پروموتر جانوری نزدیک به آن را می‌دهد. به منظور سهولت این عناصر رسم نشده‌اند. (a) در ترانسفکشن موقت، حامل پلاسمیدی دارای یک منشأ همانندسازی برای یک ویروس است که می‌تواند در سلول‌های جانوری کشت داده شده همانندسازی شوند. از این رو حامل به ژنوم سلول‌های کشت داده شده ملحق نمی‌شود. تولید پروتئین رمزدار شده از cDNA فقط برای مدت محدودی ادامه می‌یابد. (b) در ترانسفکشن پایدار، حامل یک نشانگر انتخابی از قبیل neo^r را حمل می‌کند که باعث مقاومت به G-۴۱۸ می‌شود. سلول‌های جانوری که نسبتاً کم ترانس فکت شده‌اند و cDNA خارجی را در ژنومشان قرار داده‌اند، در محیط‌های حاوی G-۴۱۸ انتخاب می‌شوند. به دلیل اینکه حامل در داخل ژنوم قرار گرفته است، این سلول‌های ترانسفکت شده پایدار یا تغییر شکل داده به تولید پروتئین رمزدار شده از cDNA تا وقتی که کشت انجام می‌شود، ادامه خواهند داد. متن را برای توضیح بیشتر ملاحظه کنید.

(شکل ۳۲-۵). زمانیکه چنین حامل پلاسمیدی وارد سلول پستانداران می‌شود، مبدأ ویروسی همانندسازی اجازه همانندسازی موثر را می‌دهد که تولید تعدادی پلاسمید از آن را می‌کند که پروتئین بیان می‌شود. به هر حال، در طی تقسیم سلول چنین پلاسمیدهایی به طور مساوی بین سلول‌های دختری تقسیم نمی‌شوند و باگذر زمان تعداد زیادی از سلول‌ها در محیط کشت دارای پلاسمید نخواهند بود، و از این جهت ترانسفکشن موقت نامیده می‌شود.

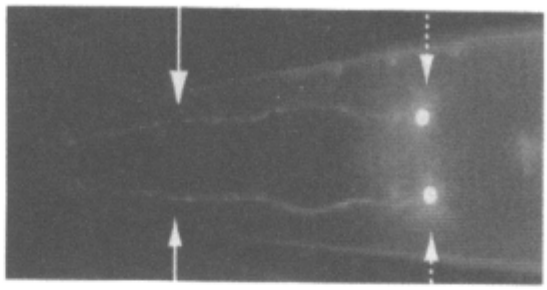
ترانسفکشن پایدار (تغییر شکل). اگر حامل وارد شده در داخل ژنوم سلول میزبان قرار گیرد، آن ژنوم به طور دائمی تغییر می‌کند و گفته می‌شود که سلول **تغییر شکل** داده است. قرارگیری در ژنوم، اغلب توسط آنزیم‌های پستانداری که به طور طبیعی در ترمیم DNA و نوترکیبی عمل می‌کنند، مساعدت می‌شود. به خاطر اینکه قرارگیری در جایگاههای تصادفی در ژنوم اتفاق می‌افتد، کلون‌های تغییر شکل داده منفرد مقاوم به G-418 اغلب در سرعت رونویسی از cDNAی وارد شده فرق خواهند داشت. یک نشانگر قابل انتخاب که به طور معمول استفاده می‌شود، ژن نئومایسین فسفوترانسفراز است (با neo^r نشان داده می‌شود) که به ترکیب شیمیایی مرتبط با نئومایسین که G-418 است، مقاومت نشان می‌دهد. روش پایه برای بیان cDNA کلون شده توسط ترانسفکشن پایدار در شکل ۳۲-۵ آورده شده است. فقط سلول‌هایی که حامل بیانی در ژنومشان قرار گرفته است زنده خواهند ماند و تولید کلونی در حضور غلظت بالای

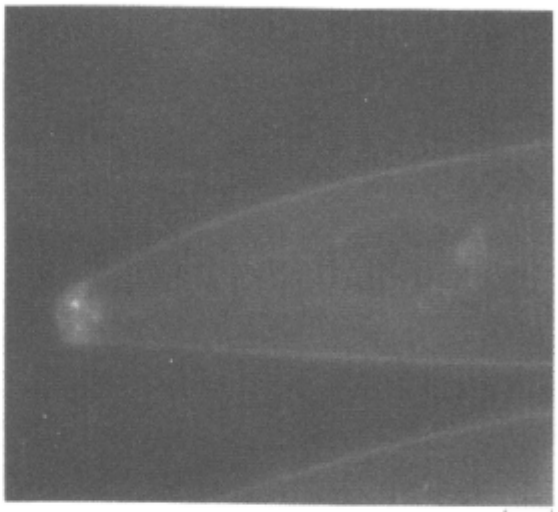


▶ شکل تجربی ۳۳-۵ حامل‌های رتروویروسی می‌توانند برای قرارگیری موثر ژن‌های کلون شده در داخل ژنوم پستانداران مورد استفاده قرا بگیرند. برای توضیح متن را بخوانید.

G-418 خواهند کرد. به خاطر اینکه قرارگیری در داخل ژنوم در جایگاههای تصادفی در ژنوم اتفاق می‌افتد، کلون‌های تغییر شکل داده مقاوم به G-418 در سرعت رونویسی از cDNA با هم فرق خواهند داشت. بنابراین، سلول‌های دچار تغییر پایدار معمولاً به منظور شناسایی انواعی که پروتئین مورد نظر را در سطوح بالا تولید می‌کنند، غربال می‌شوند.

سیستم‌های بیانی رتروویروسی. محققان از مکانیسم‌های پایه استفاده شده توسط ویروس‌ها برای قرار دادن ماده ژنتیکی در داخل سلول‌های جانوری و دخول بعدی آن به داخل DNA کروموزومی به منظور افزایش بیشتر بازدهی که در آن ژن تغییر یافته می‌تواند در سلول‌های جانوری به طور پایداری بیان شود، بهره برده‌اند. یک مثال از چنین بیان ویروسی از یک رده از رتروویروسها که بعنوان **لنتی ویروس‌ها** شناخته می‌شوند به دست آمده است. همچنانکه در شکل ۳۳-۵ نشان داده شده است، سه پلاسمید مختلف در داخل سلول‌ها توسط ترانسفکشن موقت قرارداده شده‌اند، به منظور تولید ذرات لنتی ویروس مناسب برای قرارگیری موثر یک ژن کلون شده داخل سلول‌های جانوری هدف، مورد استفاده قرار گرفته است. اولین پلاسمید، بعنوان **پلاسمید حامل** دارای یک ژن کلون شده مورد نظر در کنار نشانگر قابلیت انتخاب از قبیل neo^r که در اطراف آن توالی‌های LTR لنتی ویروس قرار دارند. همچنانکه در فصل ۶ توضیح داده شده است، توالی‌های LTR ویروسی سنتز مولکول RNAی ویروسی را رمزدار می‌کنند که با قرارگیری در داخل سلول هدف عفونی شده با ویروس می‌تواند توسط رونویسی معکوس به DNAتبدیل گردد و سپس در داخل DNAی کروموزومی قرار گیرد. پلاسمید دوم بعنوان پلاسمید بسته‌بندی کننده شناخته می‌شود که همه ژن‌های ویروسی به جز پروتئین پوشش ویروسی اصلی را حمل می‌کند، که برای بسته بندی RNA ویروسی دارای LTR به یک ذره لنتی ویروسی عملکردی لازم است. پلاسمید آخر باعث بیان یک پروتئین پوشش ویروسی می‌شود که به یک لنتی ویروس نوترکیب متصل شده و باعث دورگه شدن ذرات ویروسی برای عفونی کردن نوع سلولی هدف مورد نظر می‌شود. یک پروتئین پوششی معمول استفاده شده در این مورد گلیکوپروتئین ویروس استوماتی‌تیس وزیکولی است (گلیکوپروتئین VSVG) که می‌تواند به سرعت جایگزین پروتئین پوشش لنتی ویروس طبیعی در روی سطح ذرات ویروسی کامل شود و اجازه می‌دهد تا ذرات ویروسی حاصل عده زیادی از انواع سلولی پستانداری را سرعتی کنند، که شامل سلول‌های بنیادی خون ساز، نورون‌ها، سلول‌های کبدی و ماهیچه‌ای هستند. بعد از عفونی شدن، ژن کلون شده که در کنار توالی‌های LTR قرار گرفته و به DNA رونوشت معکوس می‌شود، به داخل هسته منتقل [illegible] پس در داخل ژنوم میزبان قرار می‌گیرد. اگر لازم باشد، همسند حالت ترانسفکشن پایدار، سلول‌های دارای ژن کلون





▲ **شکل تجربی ۳۴-۵. نشاندار کردن پروتئین و ژن، جایابی سلولی پروتئین‌های بیان شده از ژن‌های کلون شده را تسهیل می‌کنند.** در این آزمایش، ژن رمزدار کننده یک گیرنده بویایی شیمیایی، Odr10 از کرم حلقوی الگانس با توالی ژنی پروتئین فلورسانت سبز الحاق شد. (a) یک پروموتر الحاقی توسط ارتباط GFP به پروموتر و چهار اسیدآمینه اول Odr10 تولید شد. این پروتئین در سیتوپلاسم نورون‌های حسی خاصی در سر کرم حلقوی الگانس بیان می‌شود. توجه کنید که جسم سلولی (پیکانهای نقطه چین) و دندریت‌های حسی (پیکانهای بدون نقطه چین) بطور فلورسانس نشاندار شده‌اند. (b) یک پروتئین الحاقی توسط اتصال GFP به انتهای توالی رمزدار کننده Odr10 ساخته شد. در این حالت پروتئین الحاقی Odr10-GFP به طرف غشاء در بالای سلول‌های حسی می‌رود و فقط در انتهای دیستال مژک‌های حسی آشکار می‌شود. توزیع مشاهده شده می‌تواند انعکاسی از جایابی طبیعی پروتئین Odr10 در نورونهای خاص باشد.

شده قرار گرفته بصورت پایدار و نشانگر neo^r می‌توانند برای مقاومت به G-418 مورد انتخاب قرار گیرند.

نشان دار کردن ژن و پروتئین. حامل‌های بیانی می‌توانند روشی برای مطالعه بیان و قرارگیری درون سلولی پروتئین‌های یوکاریوتی فراهم آورند. این روش اغلب بر استفاده از پروتئین گزارشگر از قبیل **پروتئین فلورسانت سبز**[1] (GFP) که می‌تواند در سلول‌ها شناسایی شود، تکیه دارد. ما دو روش برای ایجاد ژن دورگه‌ای که پروتئین گزارشگر و پروتئین مورد نظر ما را به هم مرتبط می‌کند توضیح می‌دهیم. وقتی این ژن دورگه توسط ترانسفکشن با حامل بیانی پلاسمیدی در داخل سلولی که دارای ژن تغییر یافته است و یا توسط ایجاد جانور تراریخته[2] همچنانکه در بخش ۵-۵ توضیح داده شده است قرار می‌گیرد، بیان پروتئین گزارشگر می‌تواند به منظور تعیین اینکه در کجا و چه زمانی ژن بیان می‌شود، به کار می‌رود. این روش داده‌های مشابهی با آزمایش‌های دورگه سازی درجا قبلا توضیح داده شد ولی اغلب اوقات با قدرت تفکیک بیشتر و حساسیت بالاتر، را ایجاد می‌کند.

شکل ۳۴-۵ استفاده از دو نوع متفاوت از آزمایش‌های نشاندار کردن با GFP به منظور مطالعه بیان پروتئین گیرنده بویایی را در کرم حلقوی الگانس به تصویر کشیده است. وقتی پروموتر برای گیرنده بویایی به طور مستقیم به توالی رمزدار کننده GFP متصل شود این ساختار بندی **الحاق پروموتری** نامیده می‌شود. GFP در نورونهای خاصی بیان می‌شود و سیتوپلاسم آن سلول‌ها را پر می‌کند، در مقابل وقتی ژن دورگه توسط ارتباط دادن GFP به توالی رمزدار کننده گیرنده ساخته می‌شود، **پروتئین الحاقی**[3] حاصل می‌تواند توسط فلورسانس GFP در مژک‌های دیستال نورون‌های حسی جایابی شود، جایگاهی که در آن پروتئین گیرنده به طور طبیعی قرار می‌گیرد.

یک روش برای جایگزین نشاندار کردن با GFP، شناسایی محل داخل سلولی یک پروتئین، تغییر ژن مورد نظر توسط الحاق آن با یک توالی کوتاه DNA است که یک توالی کوتاه از اسیدهای آمینه‌ای را که توسط آنتی بادی مونوکلونال شناسایی می‌شوند، رمزدار کند. چنین پپتید کوتاهی که می‌تواند به یک آنتی بادی متصل شود **اپی توپ**[4] نامیده می‌شود، از اینرو، این روش بعنوان **نشاندار کردن با اپی توپ** شناخته می‌شود. بعد از ترانسفکشن با حامل بیانی پلاسمیدی دارای ژن تغییر یافته، نوع نشاندار از اپی‌توپ بیان شده پروتئین می‌تواند توسط ردیابی ایمونوفلورسانس سلول‌ها با آنتی بادی مونوکلونال خاص برای آن اپی توپ شناسایی شود. انتخاب اینکه آیا از اپی توپ کوتاه یا GFP برای نشان دار کردن یک پروتئین استفاده شود، اغلب اوقات بستگی به این دارد که چه نوع تغییراتی را یک ژن کلون شده

1- Green fluorescent protein
2-Transgenic
3-Protein-fusion
4-Epitope

می‌تواند تحمل کند و عملکرد خودش را از دست ندهد.

نکات کلیدی بخش ۳-۵

استفاده از قطعات DNA برای مطالعه بیان ژن

- لکه‌گذاری ساترن با ترکیب روش‌های الکتروفورز ژن، انتقال (لکه‌گذاری) باندهای جداشده روی فیلتر و دورگه کردن با پروب DNA مکمل نشاندار می‌تواند یک قطعه DNA را در یک مخلوط شناسایی نماید (شکل ۲۶-۵ را ملاحظه کنید). تکنیک مشابه یعنی لکه‌گذاری نورترن، یک RNA خاص را در یک مخلوط شناسایی می‌کند.
- وجود و پراکندگی mRNAهای خاص را در سلول‌های زنده می‌توان بوسیله دورگه‌سازی درجا شناسایی کرد.
- آنالیز ریزآرایه‌ای DNA بطور همزمان سطح نسبی بیان هزاران ژن در انواع مختلف سلول یا در سلول‌های مشابه را در زمان‌های متفاوت شناسایی می‌کند.
- آنالیز دسته‌ای اطلاعات حاصل از آزمایش‌های بیان ریزآرایه چندگانه می‌تواند ژن هایی را که به طور مشابه در شرایط متفاوت تنظیم می‌شوند، شناسایی نماید. چنین ژن‌هایی که با هم تنظیم می‌شوند معمولاً پروتئین‌هایی مرتبط از لحاظ عملکرد زیست شناختی را رمزدهی می‌کنند.
- بیان حامل‌های حاصل از پلاسمیدها امکان تولید مقادیر زیاد یک پروتئین را از یک ژن کلون شده می‌دهند.
- حامل‌های بیانی یوکاریوتی برای بیان ژن‌های کلون شده در مخمر یا سلول‌های پستانداران استفاده می‌شوند. کاربرد مهم این روش‌ها نشان‌دار کردن پروتئین‌ها با GFP یا با یک اپی توپ برای شناسایی با آنتی بادی است.

۵-۴ شناسایی و جایابی ژن‌های بیماری انسانی

بیماریهای ارثی انسان نتیجه فنوتیپی نقص در ژن‌های انسان هستند. جدول ۲-۵ چندین بیماری ارثی را که بیشتر رایج هستند آورده است. اگر چه یک ژن "بیمار" ممکن است نتیجه جهش جدیدی باشد که در نسل قبلی حاصل شده است، ولی در اغلب حالات بیماریهای ارثی توسط آلل‌های جهش یافته از قبل موجود که از یک نسل به دیگر نسل‌ها می‌رود، ایجاد می‌شوند.

امروزه اولین مرحله از کشف علت بیماری ارثی انسان، شناسایی ژن و پروتئین رمزدار شده از آن است که تحت تاثیر قرار گرفته‌اند. مقایسه توالی‌های یک ژن بیمار و محصول آن با ژن‌ها و پروتئین‌هایی که توالی و عملکرد آنها شناخته شده است، می‌تواند راهنمایی برای دلیل سلولی و مولکولی بیماری باشد. محققان از هر راهنمای فنوتیپی که امکان دارد با پایه مولکولی بیماری‌های ارثی مرتبط باشد، استفاده کرده‌اند. یک مثال موفق فرضیه‌ای در مورد آنمی سلول داسی شکل بود (که بعنوان بیماری سلول‌های خونی شناخته شود، و ممکن بود که هموگلوبین معیوب علت آن باشد. این نظریه منجر به شناسایی جانشینی یک اسید آمینه خاص در هموگلوبین شد که باعث پلیمریزه‌شدن مولکول‌های هموگلوبین معیوب می‌شد، و باعث تغییر شکل شبیه به سلول داسی شکل سلول‌های قرمز در افرادی می‌شد که دو نسخه از آلل Hb^S برای هموگلوبین سلول داسی به ارث برده بودند.

اغلب اوقات ژن‌های مسئول بیماریهای ارثی بدون داشتن هیچ دانش قبلی یا فرضیه معقول در مورد طبیعت ژن تحت تاثیر قرار گرفته یا پروتئین رمزدار شده آن یافت می‌شوند. در این بخش ما خواهیم دید که چگونه ژنتیکدانهای انسانی می‌توانند ژن مسئول برای یک بیماری ارثی به دنبال تقسیم شدن بیماری در خانواده پیدا کنند. تقسیم بیماری می‌تواند مرتبط با بسیاری از نشانگرهای دیگر باشد، که سرانجام منجر به شناسایی موقعیت کروموزومی ژن تحت تاثیر قرار گرفته می‌شود. این اطلاعات همراه با دانش تعیین توالی ژنوم انسان می‌تواند سرانجام ژن بیمار و جهش‌های مسئول بیماری را تعیین کند.

بسیاری از بیماریهای ارثی یکی از سه الگوی اصلی وراثتی را نشان می‌دهند

بیماریهای ژنتیکی انسانی که نتیجه جهش در یک ژن خاص هستند چندین الگوی وراثتی بسته به طبیعت و محل کروموزومی آللهایی که باعث بیماری می‌شوند، نشان می‌دهند. یک الگوی مشخصه توسط آلل غالب در یک اتوزوم نمایش داده می‌شود (که یکی از ۲۲ کروموزوم‌های انسانی است که کروموزومی جنسی نیستند). به خاطر اینکه آلل ***اتوزومی غالب*** به صورت هتروزیگوت بیان می‌شود، معمولاً حداقل یکی از والدهای یک فرد بیمار آن بیماری را خواهد داشت. اغلب اوقات در حالتی که بیماری‌های ایجاد شده توسط آلل‌های غالب بعد از سن بلوغ ظاهر می‌شوند. اگر این حالت نبود، انتخاب طبیعی این آللها را در طی تکامل انسان از میان می‌برد. مثالی از بیماری غالب اتوزومی بیماری هانتیگتون است که به بیماری تحلیل برنده عصبی موسوم است که معمولاً از میانسالی به بعد شروع می‌شود. اگر هر کدام از والدین یک آلل جهش یافته HD را حمل کنند

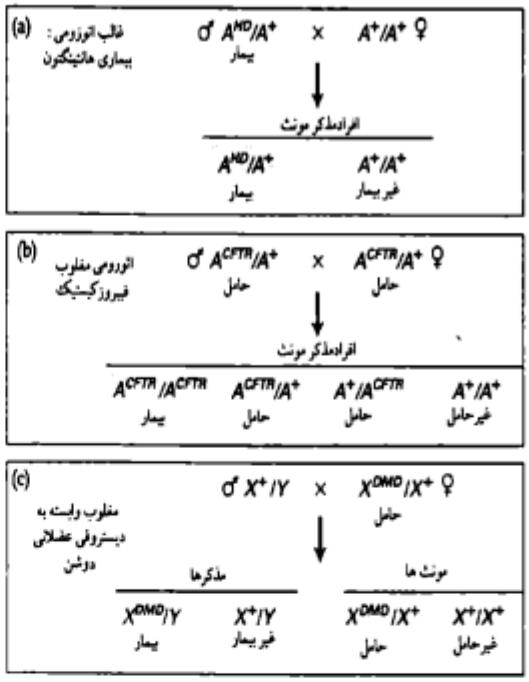
جدول ۲-۵ بیماریهای ارثی انسانی رایج

بیماری	نقص سلولی و مولکولی	وقوع
مغلوب اتوزومی		
آنمی سلول داسی شکل	هموگلوبین غیرطبیعی باعث تغییر شکل سلول‌های خونی قرمز می‌شود که می‌توانند در مویرگ‌ها قرار گیرند. همچنین مقاومت به مالاریا را القا می‌کند.	$\frac{۱}{۶۲۵}$ از منشا آفریقای ساب ساهاران
فیبروز کیستیک	کانال کلرید معیوب (CFTR) در سلول‌های اپی تلیال منجر به زیاد شدن موکوس در ریه‌ها می‌شود.	$\frac{۱}{۲۵۰۰}$ از منشا اروپایی
فنیل کتونوریا (PKU)	نقص آنزیم در متابولیسم فنیل آلانین (تیروزین هیدروکسیلاز) باعث ازدیاد فنیل آلانین می‌گردد که منجر به عقب ماندگی ذهنی می‌شود مگر اینکه توسط رژیم غذایی کنترل شود.	$\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ از منشا اروپایی
بیماری تی ساکس	نقص آنزیم هگزوآمینیداز منجر به تجمع اسفنگولیپیدهای اضافی در لیزوزومهای نورون‌ها می‌شود و باعث تخریب تکوین عصبی می‌شود	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$ از منشا اروپایی غربی
اتوزومی غالب		
بیماری هانتینگتون	پروتئین عصبی معیوب (هانتینگتین) ممکن است برای تشکیل اجتماعات پروتئینی، تجمع حاصل کند که باعث آسیب به بافت عصبی می‌شود.	$\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ از منشا اروپایی
هیپرکلسترولمی	گیرنده معیوب LDL منجر به کلسترول اضافی در خون می‌شود که باعث حمله قلبی زودرس می‌شود.	$\frac{۱}{۱۲۲}$ از کانادایی‌های فرانسوی زبان
مغلوب وابسته به X		
دیستروفی عضلانی دوشن (DMD)	پروتئین اسکلت سلولی معیوب منجر به تخریب عملکرد عضله می‌شود.	$\frac{۱}{۳۵۰۰}$ مردها
هموفیلی A	فاکتور لخته خونی معیوب VIII منجر به خونریزی کنترل نشده می‌شود.	$\frac{۲}{۱۰۰۰۰}$ - $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ مردها

فرزندهایشان (بدون توجه به جنسیت آنها) پنجاه درصد شانس به ارث بردن آلل جهش یافته و بیمار شدن دارند (شکل ۳۵-۵).

یک آلل مغلوب در یک اتوزوم الگوی تقسیمی کاملا متفاوت را نشان می‌دهد. برای یک آلل مغلوب اتوزومی، هر دو والدین بایستی **حامل‌های** هتروزیگوت آلل باشند تا اینکه فرزندهای آنها بیمار شوند. هر فرزند از والدین هتروزیگوت ۲۵ درصد شانس دریافت هر دو آلل مغلوب و بنابراین بیمار شدن را دارد، و شانس ۵۰ درصدی دریافت یک آلل طبیعی و جهش یافته را دارند و بنابراین حامل می‌شوند و یک شانس ۲۵ درصدی برای دریافت دو آلل طبیعی دارند. یک مثال واضح از یک بیماری مغلوب اتوزومی: بیماری فیبروز کیستیک است که در نتیجه نقص در ژن کانال کلرید که بصورت CFTR شناخته می‌شود، ایجاد می‌شود (شکل ۳۵-۵). افراد وابسته (اولین و دومین عموزاده) احتمالا نسبتا بالایی برای حامل بودن برای همان آلل‌های مغلوب را دارند. بنابراین فرزندهای والدین دارای نسبت فامیلی بسیار بیشتر از آنهایی که از والدین غیرفامیل متولد می‌شوند. برای یک بیماری مغلوب اتوزومی هموزیگوت هستند و بنابراین بیمار هستند.

الگوی معمول سوم به ارث رسیدن بیماری آلل **مغلوب وابسته به X** است. یک آلل مغلوب روی کروموزوم X که اغلب اوقات در مذکرها، که فقط یک کروموزوم X از مادرشان دریافت می‌دارند، و نه در مونث‌ها که یک کروموزوم X از هم مادر و هم پدرشان دریافت می‌دارند، بیان می‌شود. این امر منجر به الگوی تقسیم وابسته به



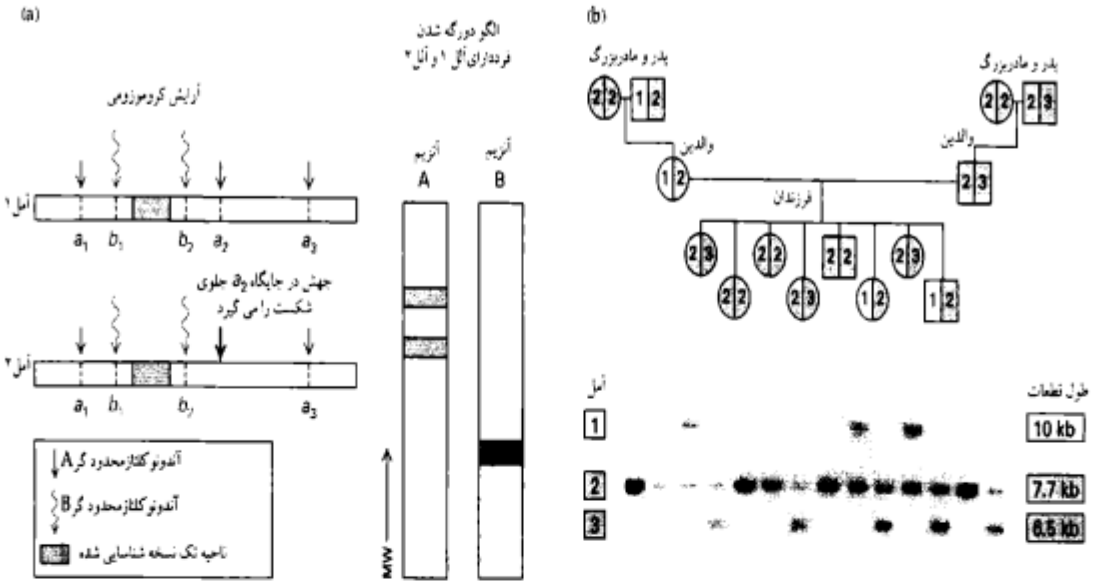
▲ **شکل ۳۵-۵ سه الگوی وراثتی معمول برای بیماریهای ژنتیکی انسانی.** کروموزوم‌های اتوزومی نوع وحشی (A) و کروموزوم‌های جنسی (XوY) با علائم مثبت نشان داده شده‌اند. (a) در بیماری اتوزومی غالب مانند بیماری هانتینگتون، فقط یک آلل جهش یافته برای ایجاد بیماری لازم است. اگر هر والد برای آلل HD هتروزیگوت باشد، فرزندهای آن والد شانس ۵۰ درصدی برای به ارث بردن آلل جهش یافته و ابتلا به بیماری دارند. (b) در بیماری مغلوب اتوزومی مانند فیبروزکیستیک دو آلل جهش یافته بایستی برای ایجاد بیماری وجود داشته باشد. هر کدام از والدین بایستی حامل‌های هتروزیگوت ژن CFTR جهش یافته برای فرزندهایشان باشند تا در خطر ابتلا به بیماری یا حامل بودن قرار بگیرند. (c) یک بیماری وابسته به X مانند دیستروفی عضلانی دوشن توسط جهش مغلوب روی کروموزوم X ایجاد می‌شود و الگوی تقسیم وابسته به جنس معمول را نشان می‌دهد. افراد مذکر متولد شده از مادران هتروزیگوت برای آلل جهش یافته DMD شانس ۵۰ درصدی دارند که آلل جهش یافته را به ارث ببرند و بیمار شوند. افراد مونث متولد شده از مادران هتروزیگوت شانس ۵۰ درصدی دارند که حامل باشند.

جنس متفاوت می‌شود که بیماری بسیار بیشتر در افراد مذکر نسبت به افراد مونث دیده می‌شود. برای مثال، دیستروفی عضلانی دوشن (DMD)، یک بیماری تحلیل برنده عضله است که به طور خاص افراد مذکر را تحت تاثیر قرار می‌دهد و توسط آلل مغلوب بر روی کروموزوم X ایجاد می‌شود. DMD الگوی تقسیم وابسته به جنس را نشان می‌دهد که در آن مادرهایی که هتروزیگوت هستند و بنابراین ازلحاظ فنوتیپی طبیعی هستند، می‌توانند بعنوان حامل عمل کنند و آلل‌های DMD و بنابراین بیماری را به ۵۰ درصد از بچه‌های مذکرشان انتقال دهند (شکل ۳۵-۵).

چندشکلی‌های DNA در نقشه برداری پیوستگی جهش‌های انسانی استفاده می‌شوند

وقتی که وراثت بیماری تعیین شد، مرحله بعدی در تعیین موقعیت یک آلل بیمار، نقشه برداری ژنتیکی موقعیت آن با توجه به نشانگرهای ژنتیکی شناخته شده توسط استفاده از اصول پایه پیوستگی ژنتیکی است که در بخش ۱-۵ توضیح داده شده است. وجود بسیاری از نشانه‌ها یا نشانگرهای ژنتیکی مختلف نقشه برداری شده که کل طول کروموزوم‌ها را در برمی‌گیرند، نقشه برداری از جهش جدید را توسط ارزیابی امکان پیوستگی آن با این نشانگرهای ژنی در آمیزش‌های مناسب را تسهیل کرده است. با دردسترس بودن نشانگرهای بیشتر، نقشه برداری از جهش می‌تواند دقیق‌تر شود. تعداد نشانگرهای ژنتیکی مورد نیاز برای تفکیک بالا از نقشه ژنتیکی انسانی در حدود یک نشانگر در هر سانتی مورگان است (CM) (همچنانکه قبلا توضیح داده شد، یک واحد نقشه ژنتیکی یا سانتی مورگان بصورت فاصله بین دو مکان در طول یک کروموزوم است که باعث ایجاد یک فرد نوترکیب در ۱۰۰ تا تولد می‌شود). بنابراین نقشه ژنتیکی با قدرت تفکیک بالا نیاز به ۲۵ یا بیشتر از نشانگرهای ژنتیکی با موقعیت شناخته شده گسترش یافته در طول هر کروموزوم انسانی دارد.

در حیوانات آزمایشگاهی که معمولاً برای مطالعات ژنتیکی استفاده می‌شوند، چندین نشانگر با فنوتیپ‌های قابل شناسایی به راحتی برای نقشه برداری ژنتیکی جهش‌ها در دسترس هستند.این امر برای نقشه برداری ژن‌هایی که آلل‌های جهش یافته مرتبط با بیماریهای وراثتی در انسان دارند، صادق نیست. تکنولوژی DNA نوترکیب گنجینه‌ای از نشانگرهای مولکولی بر پایه DNA را در دسترس قرار داده است. به دلیل اینکه بیشتر ژنوم انسان پروتئین رمزدار نمی‌کند، مقدار زیادی از تغییر توالی بین افراد وجود دارد. در حقیقت، برآورده شده است که تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین افراد غیرفامیل می‌تواند در هر 10^3 نوکلئوتید شناسایی شود. اگر این تغییرات در توالی DNA، که بعنوان **چندشکلی DNA** از آن یاد می‌شود، از یک نسل به نسل دیگر دنبال شود، می‌توانند بعنوان نشانگرهای ژنتیکی برای مطالعات پیوستگی به کار روند. به طور همزمان، پانلی بیش از 10^4 چند شکلی شناخته شده متفاوت که محل شان در ژنوم انسانی نقشه برداری شده است برای مطالعات پیوستگی ژنتیکی در انسانها استفاده می‌شود.



▲ **شکل تجربی ۳۶-۵ چندشکلی در طول قطعه محدود (RFLPها) می‌توانند مانند نشانگرهای ژنتیکی پی‌گیری شوند.** (a) در دو کروموزوم همتای نشان داده شده، DNA با دو آنزیم محدودکننده متفاوت تیمار داده شده است. (BوA) که DNA را در توالی‌های متفاوت برش می‌دهند (bوa). قطعات حاصل مورد تجزیه تحلیل لکه گذاری ساترن (شکل ۳۶-۵ را ملاحظه کنید) با یک پروب رادیواکتیو هستند که به ناحیه DNA مورد نظر به منظور شناسایی آن قطعات متصل می‌شود. اختلافی بین دو کروموزوم همتا در توالی‌های شناخته شده توسط آنزیم B وجود ندارد. فقط یک قطعه توسط پروب شناخته می‌شود، همچنانکه توسط یک باند دورگه شده منفرد نشان داده شده است. به هر حال، تیمار با آنزیم A قطعات متفاوت از لحاظ رادیوگرافی با دو طول متفاوت تولید می‌کند (a_1-a_3وa_1-a_2)، و دو باند دیده شده است، حاکی از آن است که جهش باعث کاهش جایگاه‌هایی بر روی یکی از کروموزوم‌ها می‌شود (b) شجره نامه بر اساس تجزیه تحلیل DNA از ناحیه شناخته شده موجود بر روی کروموزوم ۵. نمونه‌های DNA با آنزیم محدودکننده Taq1 برش داده شده و توسط لکه گذاری ساترن مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند. در این خانواده، این ناحیه از ژنوم در سه نوع آللی وجود دارند که توسط جایگاههای Taq1 که اندازه ۱۰، ۷/۷ و ۶/۵کیلوبازی دارند، شناخته می‌شود. هر فرد دو آلل دارد: برخی افراد دارای آلل ۲ (۷/۷کیلوبازی) در هر دو کروموزوم‌شان هستند و سایرین در این جایگاه هتروزیگوت هستند. دایره‌ها معرف افراد مونث هستند؛ مربع‌ها معرف افراد مذکر هستند. لانهای ژل به همان ترتیبی که افراد در شجره نامه قرار گرفته‌اند، در زیر آورده شده است.

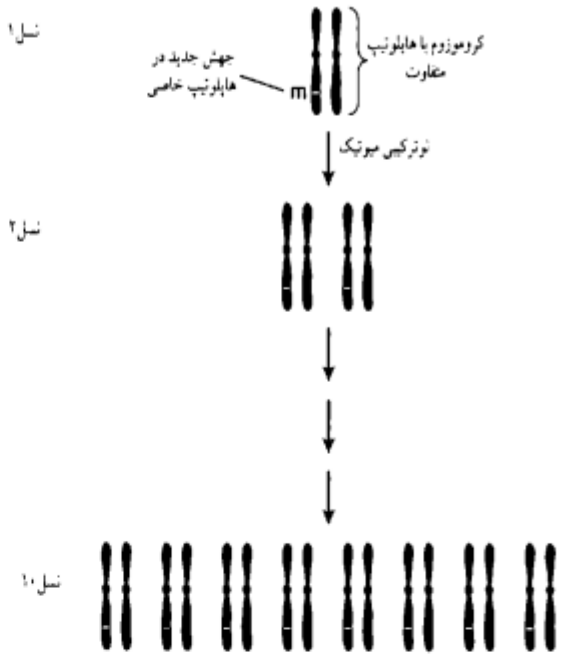
چند شکلی در طول قطعه محدود (RFLPها). اولین نوع از نشانگرهای مولکولی بودند که در مطالعات پیوستگی استفاده شد. RFLPها از جهش‌هایی که می‌تواند جایگاه‌هایی را برای آنزیم‌های محدودکننده خاصی به وجود بیاورند یا از بین ببرند و در طول DNA انسان قرار دارند، حاصل می‌شوند. این امر منجر به تغییراتی بین افراد در طول قطعات محدود ایجاد شده از نواحی مشابهی از ژنوم می‌شود. اختلافات در اندازه‌های قطعات محدود شده بین افراد توسط لکه گذاری ساترن و با یک پروب ویژه برای ناحیه‌ای از DNA که دارای RFLP است، شناخته می‌شود (شکل ۳۶-۵). تقسیم و نوترکیبی میوزی چنین چندشکلی‌های DNA می‌تواند مانند نشانگرهای ژنتیکی پی‌گیری شود. شکل ۳۶-۵ این را که چگونه تجزیه تحلیل RFLP از یک خانواده می‌تواند برای آزمایش ارتباط آماری آلل برای یک بیماری ارثی یا برخی مشخصه‌های انسانی مورد نظر به کار رود را به تصویر کشیده است.

اطلاعات توالی ژنومی حاصل شده از انسانهای مختلف منجر به شناخت چندشکلی‌های DNA مفید در سالهای اخیر شده است. **چند شکلی تک نوکلئوتیدی**[1] (SNPها) روشی است که بسیار زیاد استفاده می‌شود و برای ساخت نقطه‌های با حداکثر قدرت تفکیک مفید است. نوع مفید دیگر از چندشکلی DNA شامل یک تعداد متغییر از تکرار توالی‌های یک، دو و سه بازی است. چنین چندشکلی‌هایی، بعنوان تکرارهای توالی ساده[2] (SSPها) یا بصورت **میکروساتلایت**[3] شناخته می‌شوند که احتمالا توسط

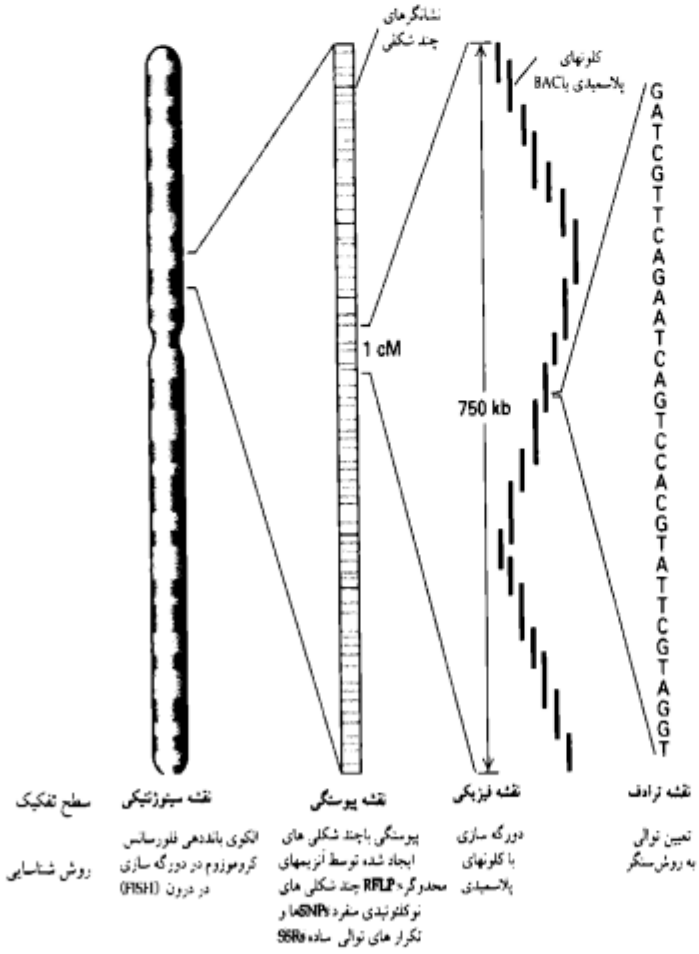
1-Single-nucleotiede polymorphisms (SNPs)

2- Simple Sequenee repeats

3- Micro satfllite



◀ شکل ۳۷-۵ (شکل رنگی) مطالعات پیوستگی ترجیحی جمعیت‌های انسانی می‌تواند برای نقشه برداری از ژن‌ها با قدرت تفکیک بالا زیاد مورد استفاده قرار گیرد. جهش بیماری جدید در کروموزوم اجدادی در بین یک عده از چند شکلی‌هایی که بعنوان هاپلوتیپ شناخته می‌شوند، ایجاد خواهد شد. بعد از چندین نسل، کروموزوم‌های حامل جهشی عامل بیماری قطعاتی از هاپلوتیپ اجدادی را حمل می‌کنند که از جهش عامل بیماری توسط نوترکیبی جدا نشده‌اند. قطعات آبی این کروموزوم‌ها نشان دهنده هاپلوتیپ معمولی مشتق از جمعیت معمولی است و از هاپلوتیپ اجدادی با منشا جهش، نیست. این پدیده **پیوستگی ترجیحی** شناخته می‌شود، موقعیت جهش عامل بیماری می‌تواند توسط بررسی کروموزوم‌هایی که دارای جهش عامل بیماری برای چند شکلی‌های حفاظت شده مرتبط با هاپلوتیپ اجدادی، جایابی شود.



◀ شکل ۳۸-۵ ارتباط بین نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی در یک کروموزوم انسانی. این شکل یک کروموزوم انسانی را نشان می‌دهد که در سطوح مختلف به تفصیل تحت بررسی قرار گرفته است. کل این کروموزوم می‌تواند وقتی که به حالت متراکم در متافاز است در زیر میکروسکوپ نوری دیده شود و محل نزدیک به توالی‌های خاص می‌تواند با استفاده از دورگه سازی فلورسانس بر روی آن شناسایی شود. مشخصه‌های ژنتیکی با جزئیات بیشتری نسبت به نشانگرهای ژنتیکی براساس DNA می‌تواند نقشه برداری شود. قطعات محلی کروموزوم می‌تواند در سطح توالی‌های DNAی شناخته شده توسط روش‌های دورگه سازی ساترن یا PCR مورد بررسی قرار گیرد. سرانجام تفاوت‌های ژنتیکی مهم می‌تواند بطور دقیق توسط اختلافات در ترادف نوکلئوتیدی DNA کروموزومی تعیین شود.

نوترکیبی یا مکانیسم لغزشی[1] یا از زنجیره الگو و یا زنجیره‌های تازه سنتز شده در طی همانندسازی DNA تشکیل می‌شوند. یک خصوصیت مفید SSRها این است که افراد مختلف تعداد متفاوتی از تکرارها را دارند. وجود انواع چندگانه یک SSR آن را برای تهیه یک الگوی تقسیمی ارزنده در یک شجره نامه مناسب می‌کند و بنابراین استفاده عمومی‌تری در نقشه برداری از محل ژن‌های بیمار دارد. اگر یک SNP یا SSR یک جایگاه محدود را تغییر دهند، این امر می‌تواند با تجزیه تحیل RFLP شناسایی شود. به هر حال، چندشکلی‌ها، قطعات محدود شده را تغییر نمی‌دهند و بایستی توسط تشدید با PCR و تعیین توالی DNA شناسایی شوند.

مطالعات پیوستگی می‌تواند ژن‌های مربوط به بیماری را با قدرت تفکیک در حدود یک سانتی مورگان نقشه برداری کند

بدون پرداختن به نکات تکنیکی، اجازه دهید ببینیم چگونه ممکن است آللی که یک خصوصیت غالب خاص را ایجاد می‌کند (مثلاً هیپروکلسترولمی فامیلی) نقشه برداری می‌شود. مرحله اول به دست آوردن نمونه‌های DNA از همه اعضای خانواده شامل افرادی است که بیماری را نشان می‌دهند. DNAی بی‌حاصل هم از افراد بیمار و هم افراد سالم برای تعیین هویت عده زیادی از چند شکلی‌های DNA مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند (هم نشانگرهای SSR و هم SNP می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد).

الگوی تقسیم هر چند شکلی DNA در خانواده با تقسیم بیماری مورد بررسی برای یافتن چندشکلی‌هایی که در طی بیماری تمایل به تقسیم شدن دارند، مقایسه می‌شود. سرانجام، تفسیر کامپیوتری از داده‌های تقسیم به منظور محاسبه شباهت پیوستگی بین هر چند شکلی و آلل عامل بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در عمل، داده‌های تقسیم از خانواده‌های مختلف نشان دهنده بیماری، جمع آوری شده و ذخیره می‌گردد. هر اندازه خانواده‌های نشان دهنده بیماری خاصی که می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد بیشتر می‌شود، اهمیت آماری مدرک پیوستگی که می‌تواند حاصل شود و همچنین دقت اندازه‌گیری فاصله بین یک چند شکلی DNA پیوسته و یک آلل بیماری بیشتر می‌شود. اغلب مطالعات خانوادگی حداکثر ۱۰۰ نفر دارند که در آن پیوستگی بین ژن بیماری و یک قطعه از چند شکلی‌های DNA می‌تواند مورد آزمایش قرار گیرد. این تعداد از افراد، حد بالاتر عملی از قدرت تفکیک در مطالعه نقشه برداری تا حدود یک سانتی مورگان با یک فاصله فیزیکی در حدود $۷/۵\times۱۰^{۵}$ جفت باز را تنظیم می‌کند.

پدیده‌ای که **پیوستگی ترجیحی**[2] نامیده می‌شود اساس استراتژی جایگزینی است که در برخی حالات می‌تواند درجه بالاتری از قدرت تفکیک را در مطالعات نقشه برداری ایجاد کند. این روش وابسته به وضعیت خاصی است که در آن یک بیماری ژنتیکی به طور معمول در یک جمعیت خاصی در نتیجه جهش منفردی که در بسیاری از نسل‌های گذشته اتفاق افتاده است، یافت می‌شود. چند شکلی‌های DNAیی حمل شده توسط این کروموزوم اجدادی در مجموع تحت عنوان **هاپلوتایپ** آن کروموزوم شناخته می‌شوند. همچنانکه آلل بیمار از یک نسل به نسل دیگر منتقل می‌شود، فقط چند شکلی‌هایی که نزدیک به ژن عامل بیماری هستند توسط نوترکیبی از آن جدا نخواهند شد. بعد از چندین نسل، ناحیهٔ دارای ژن عامل بیماری آشکار خواهد شد زیرا این ناحیه تنها ناحیه‌ای از کروموزوم است که هاپلوتایپ کروموزوم اجدادی در میان چندین نسل حفظ شده است (شکل ۳۷-۵). با ارزیابی توزیع نشانگرهای مخصوص در افراد بیمار در جمعیت، ژنتیکدانها می‌توانند نشانگرهای DNAیی که به طور زیادی با بیماری مرتبط هستند را شناسایی کنند. بنابراین جایابی ژن مرتبط با بیماری، می‌تواند در یک ناحیه نسبتا کوچک انجام شود. در شرایط ایده‌آل مطالعات پیوستگی ترجیحی می‌تواند قدرت تفکیک مطالعات نقشه برداری را به کمتر از ۰/۱ سانتی مورگان بهبود بخشد. قدرت این روش از توانایی آن برای تعیین اینکه آیا یک چند شکلی و آلل مرتبط با بیماری همیشه توسط نوترکیبی میوتیک در زمانی که آلل مرتبط با بیماری برای اولین بار روی کروموزوم اجدادی ظاهر می‌شود، به دست می‌آید. در برخی حالات این امر می‌تواند منجر به یافتن نشانگرهایی شود که به طور نزدیکی به ژن عامل بیماری متصل است و حتی بعد از صدها تقسیم میوزی هرگز توسط نوترکیبی از هم جدا نمی‌شوند.

تجزیه تحلیل بیشتر برای جایابی ژن عامل بیماری در DNA کلون شده مورد نیاز است.

گرچه نقشه برداری پیوستگی معمولاً می‌تواند یک ژن عامل بیماری را در ناحیه دارای $۱۰^{۵}$ جفت باز جایابی کنند ولی در این ناحیه ممکن است بیش از ۱۰ ژن متفاوت قرار گرفته باشند. هدف نهایی یک بررسی نقشه برداری، جایابی یک ژن در داخل یک قطعه کلون شده DNA و سپس تعیین توالی نوکلئوتیدی این قطعه است. مقیاس نسبی یک نقشه ژنتیکی کروموزومی و نقشه‌های فیزیکی مرتبط با دسته‌های منظم کلون‌های پلاسمیدی و توالی نوکلئوتیدی در شکل

1-Slippage mechanism 2- Linkage disequilibrium

۳۸-۵ نشان داده شده است.

یک راهکار برای جایابی یک ژن عامل بیماری در داخل ژنوم، شناسایی mRNAی رمزدار شده توسط DNA در ناحیه‌ای از ژن در حال مطالعه است. مقایسه بیان ژن در بافت‌های افراد نرمال و بیمار ممکن است بافت‌هایی را به ما نشان دهد که در آن‌ها ژن عامل بیماری به طور طبیعی بیان می‌شود. برای مثال، جهشی که به طور فنوتیپی ماهیچه را تحت تاثیر قرار می‌دهد ولی بر روی سایر بافت‌ها اثری ندارد، ممکن است در ژنی باشد که منحصرا در بافت ماهیچه بیان می‌شود. بیان mRNA در افراد طبیعی و بیمار معمولاً توسط لکه‌گذاری نورترن یا دورگه سازی در جا از DNAها و mRNAهای نشان دار شده در برش‌های بافتی، تعیین می‌شود. لکه‌گذاری نورترن، دورگه سازی در جا یا آزمایش‌های زیزآرایه اجازه مقایسه سطح بیان و اندازه mRNAها بافت‌های جهش یافته و طبیعی را می‌دهد. اگر چه حساسیت دورگه سازی در داخل بافت کمتر از تجزیه تحلیل لکه گذاری نوترن است، با وجود این می‌تواند در شناسایی mRNAیی که در سطوح کم در یک بافت ولی در سطوح زیاد در یک یک زیررده سلولی از سلول‌ها در داخل آن بافت بیان می‌شود، مفید واقع شود. یک mRNA که در برخی افراد بیمار در مقایسه با افراد سالم دچار تغییر یا کاهش شده است، نامزد خیلی خوبی برای رمزدار کردن پروتئینی خواهد بود که عمل از بین رفته آن باعث بیماری شده است.

در بسیاری از حالات، جهش‌های نقطه‌ای که باعث ایجاد آلل‌های عامل بیماری می‌شوند، ممکن است تغییر قابل شناسایی در میزان رونویسی یا حرکت الکتروفورتیکی در mRNAها ایجاد نکنند. بنابراین اگر مقایسه mRNAهای بیان شده در افراد طبیعی و بیمار، تفاوت‌های قابل شناسایی را در mRNA مورد نظر ایجاد نکرد، جستجو برای جهش‌های نقطه‌ای در نواحی DNA رمزدار کننده آن mRNA انجام می‌شود. امروزه که روش‌های خیلی موثری برای تعیین توالی DNA در دسترس هستند، محققان مکررا توالی نواحی موردنظر DNA جداسازی شده از افراد بیمار را به منظور شناسایی جهش‌های نقطه‌ای تعیین می‌کنند، راهکار کلی جستجو برای توالی رمزدار کننده‌ای است که بطور مداوم تغییرات زیان‌آوری را در DNAی افراد بیمار نشان می‌دهند. محدودیت این راهکار آن است که ناحیه نزدیک به ژن عامل بیماری ممکن است بطور طبیعی دارای چند شکلی‌های غیرمرتبط به ژن مورد نظر باشد. چنین چندشکلی‌هایی که بطور عملکردی مرتبط به این بیماری نیستند، می‌توانند منجر به گمراهی در شناسایی قطعه DNA حامل ژن مورد نظر شوند. بنا به این دلیل، با داشتن آلل‌های جهش یافته بیشتر، ژن مورد نظر بطور صحیح شناسایی می‌شود.

بسیاری از بیماریهای ارثی نتیجه نقص در چندین ژن هستند

اکثر بیماری‌های ارثی انسانی که تاکنون در سطح مولکولی بحث شدند **صفات تک‌ژنی** هستند: که یک حالت بیماری مشخص است که توسط نقص در یک ژن منفرد ایجاد می‌شود. بیماریهای تک ژنی که توسط جهش در یک ژن خاص ایجاد می‌شوند یکی از الگوهای مشخصه ارثی را که در شکل ۳۵-۵ نشان داده شده است نشان می‌دهند. ژن‌های مرتبط با اغلب بیماریهای تک ژنی معمول قبلا با استفاده از نشانگرهای DNA همچنانکه قبلا توضیح داده شده نقشه برداری شده‌اند. به هر حال بسیاری از بیماریهای ارثی الگوهای پیچیده‌تر ارثی را نشان می‌دهند، که شناسایی ژنتیک آنها را بسیار مشکل می‌سازد.

یک نوع از پیچیدگی که به طور مکرر با آن برخورد می‌شود، **ناهمگنی ژنتیکی**[1] است. در چنین حالاتی، جهش در هر کدام از ژن‌های مختلف چندگانه باعث ایجاد همان بیماری می‌گردد، برای مثال، رتی‌نی‌تیس پیگمانتوزا[2]، که توسط تجزیه شبکیه شناخته می‌شود و معمولاً منجر به کوری می‌گردد می‌تواند توسط جهش‌هایی در یک یا بیشتر از ۶۰ ژن مختلف ایجاد شود. در مطالعات پیوستگی انسانی، داده‌ها از چندین خانواده معمولاً بایستی به منظور تعیین اینکه پیوستگی مهم از لحاظ آماری بین یک ژن عامل بیماری و نشانگرهای مولکولی شناخته شده وجود دارد یا نه، با هم ترکیب می‌شوند. ناهمگنی ژنتیکی مانند آنچه که توسط رتی‌نی‌تیس پیگمانتوزا نشان داده شد با چنین روشی گیج کننده باشد زیرا هر روش آماری در داده‌های نقشه برداری از یک خانواده توسط داده‌های حاصل از خانواده دیگر با یک ژن عامل غیرمرتبط نقض می‌شود. ژنتیکدانان انسانی دو روش متفاوت را به منظور شناسایی بسیاری از ژن‌های مرتبط با رتی‌نی‌تیس پیگمانتوزا به کار برده‌اند. اولین روش بر روی مطالعات نقشه برداری استثنائا به خانواده‌هایی تکیه دارد که دارای تعداد کافی از افراد بیمار به منظور فراهم آوردن مدرک مهم آماری برای پیوستگی بین چندشکلی‌های DNA شناخته شده و یک ژن عامل منفرد هستند. ژن‌های شناخته شده در چنین مطالعاتی چندین جهش را نشان دادند که باعث ایجاد رتی‌نی‌تیس پیگمانتوزا می‌شوند که در ژن‌هایی که پروتئین‌های زیادی از شبکیه را رمزدار

1-Genetic heterogeneity

2-Retinitis pigmentosa

می‌کنند، قرار می‌گیرند. به دنبال این راهنما، ژنتیکدانها توجه خود را بر روی ژن‌هایی معطوف کردند که بطور زیاد در شبکیه وقتی که سایر افراد دارای رتی‌نی‌تیس پیگمانتوزا غربال شدند، بیان می‌شوند. این روش استفاده از اطلاعات به منظور تمرکز تلاشهای غربالگری بر روی یک عده از ژن‌های نامزد منجر به شناسایی جهش‌های عامل کمیاب بیشتری در بسیاری از ژن‌های متفاوت رمزدار کننده پروتئین‌های شبکیه شد.

پیچیدگی بیشتر در تجزیه ژنتیکی بیماریهای انسانی در دیابتی‌ها، بیماری قلبی، چاقی، استعداد به سرطان و یک عده از اختلالات ذهنی که حداقل چندین خصوصیت قابل توارث دارند، مطرح می‌گردد. این بیماریها و بسیاری از بیماریهای دیگر می‌توانند بصورت **صفات چندژنی** بعبارت دیگر آلل‌های ژن‌های چندگانه مورد توجه واقع شوند. که با همدیگر در یک فرد عمل می‌کنند، که هم در وقوع و هم شدت بیماری شرکت می‌کنند. راه حل مناسب برای مسئله نقشه برداری خصوصیت‌های چند ژنی پیچیده در انسان وجود ندارد. پیشرفت‌های آینده ممکن است نتیجه گسترش روش‌های تشخیصی جدید باشد که می‌تواند انواع مختلفی از بیماریها را که در نتیجه چندین عامل است را شناسایی بکند.

مدل‌های بیماری انسانی در موجودات زنده آزمایشگاهی ممکن است در از هم باز کردن ژنتیک صفات پیچیده‌ای از قبیل چاقی یا دیابت نقش داشته باشد. مثلاً آزمایش‌های اصلاحی کنترل شده در مقیاس بزرگ در موش‌ها می‌تواند ژن‌های موشی مرتبط با بیماری شبیه به آن را در انسان شناسایی کند. همتاهای انسانی از ژن‌های موشی شناخته شده در چنین مطالعاتی نامزدهایی برای نقش آنها در بیماری معادل انسانی‌شان هستند. سپس DNAی جمعیت‌های انسانی می‌تواند به منظور تعیین اینکه آیا آلل‌های خاص از ژن‌های کاندید برای بودن در افراد بیمار تمایل نشان می‌دهند و یا اینکه تمایل به بودن در افراد سالم نشان نمی‌دهند، مورد بررسی واقع شود. روش ژن کاندید هم اکنون به طور زیادی به منظور جستجوی ژن‌هایی که ممکن است در بیماریهای چند ژنی اصلی در انسانها نقش داشته باشند، مورد استفاده قرار گیرد.

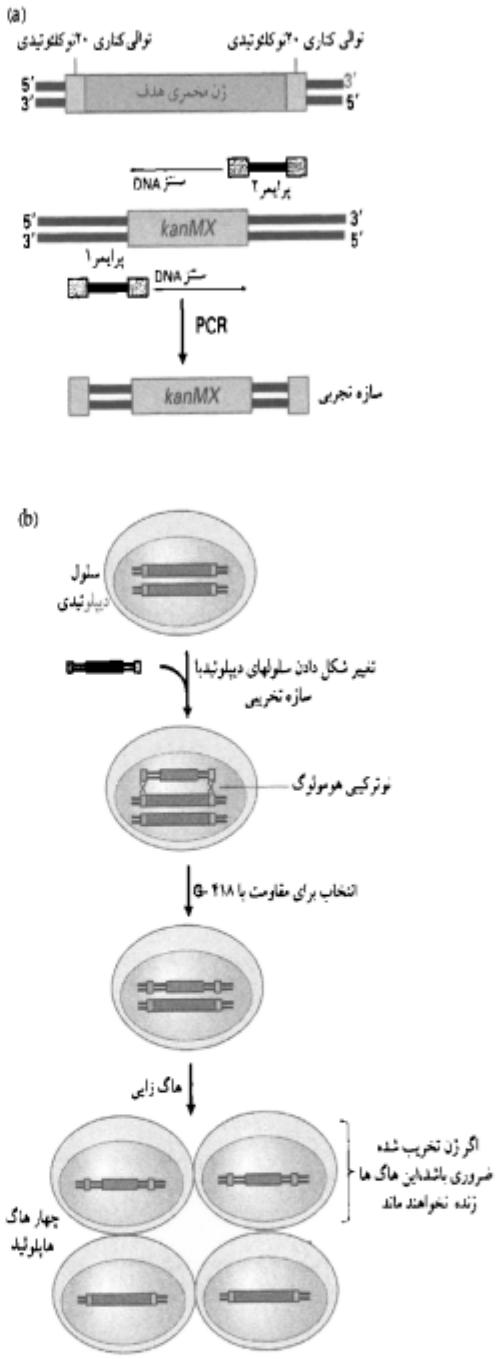
نکات کلیدی بخش ۴-۵

شناسایی و موقعیت‌یابی ژن‌های بیماریزای انسان

- بیماری و سایر خصوصیات ارثی در انسان سه الگوی اصلی توارث را نشان می‌دهد. اتوزومی غالب اتوزومی مغلوب و مغلوب وابسته به X (شکل ۳۵-۵ را ملاحظه کنید).
- نقشه ژن‌های بیماری‌ها و خصوصیات دیگر در انسان را می‌توان با تعیین هم تفکیکی آنها طی میوز و با استفاده از نشانگرهایی که موقعیت مشخصی روی ژنوم دارند. تعیین کرد. هر قدر ژن به یک نشانگر نزدیک‌تر باشد، احتمال بیشتری دارد که با همدیگر تفکیک شوند.
- تعیین دقیق نقشه ژن‌های انسان به هزاران نشانگر توزیع شده در طول کروموزوم‌ها نیاز دارد. بیشترین نشانگرهای مورد استفاده اختلاف توالی DNA (چندشکلی) بین افراد در نواحی غیره رمزکننده ژنوم است.
- چند شکلی‌های DNA در تعیین نقشه ژن‌های انسان با استفاده از چند شکلی‌های حاصل از عمل آنزیم‌های محدودکننده (RFLPs)، چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و تکرارهای توالی ساده (SSRs) کاربرد دارد.
- تعیین نقشه پیوستگی می‌تواند موقعیت ژن بیماری انسانی را در ناحیه کروموزومی حاوی ۱۰ ژن شناسایی نماید برای شناسایی ژن مورد نظر در درون این ناحیه به بررسی بیان و مقایسه توالی‌های DNA بین نوع وحشی و افراد بیمار نیاز است.
- بعضی از بیماری‌های ارثی می‌توانند ناشی از جهش در ژن‌های متفاوت در افراد متفاوت ناهمگنی ژنتیکی باشند. بروز و شدت بیماری‌ها به حضور آلل‌های جهش یافته چند ژن در یک فرد وابسته است (خصوصیات پلی ژنیک) تعیین نقشه ژن‌هایی که باعث چنین بیماری‌های می‌شوند مشکل است زیرا بروز این بیماری‌ها را می‌توان به یک جایگاه کروموزومی نسبت داد.

۵-۵ غیرفعالسازی عملکرد ژن‌های خاص در یوکاریوت‌ها

تعیین توالی‌های پروتئین و DNA در سالهای اخیر با استفاده از الگوهای توالی DNA ی ژنومی و شباهت توالی پروتئین‌های رمزدار شده با پروتئین‌های با عملکرد شناخته شده، منجر به شناسایی بسیاری از ژن‌ها شده است، همچنانکه در فصل ۶ توضیح داده شده است، عملکردهای کلی پروتئین‌های شناخته شده توسط جستجوهای توالی ممکن است با شباهت بین پروتئین‌های شناخته شده، پیشگویی شود. به هر حال، نقش‌های دقیق چنین پروتئین‌های "جدید"ی در داخل بدن ممکن است در غیاب انواع جهش یافته از ژن‌های مرتبط نامشخص باشد. ما چندین روش برای جدا کردن عملکرد طبیعی یک ژن خاص در ژنوم یک موجود زنده را توضیح می‌دهیم. تجزیه تحلیل فنوتیپ جهش یافته حاصل به آشکار شدن



◀ شکل تجربی ۳۹-۵ نوترکیبی هومولوگی با سازواره‌های تخریبی وارد شده می‌توانند ژن‌های هدف خاص را در مخمر غیرفعال بکند. (a) یک سازه مناسب برای تخریب یک ژن هدف می‌تواند توسط PCR تهیه شود. دو پرایمر طراحی شده برای این هدف هر کدام دارای توالی در حدود ۲۰ نوکلئوتید (nt) است که مشابه یک انتهای ژن مخمر هدف است و همچنین توالی‌های مورد نیاز برای تشدید یک قطعه از DNAی حامل یک ژن نشانگر قابل انتخاب مانند KanM است، که مقاومت به G-۴۱۸ را القاء می‌کند. (b) وقتی سلول‌های ساکارومایسیس دیپلوئید دریافت کننده با یک سازه تخریبی ژنی تغییر شکل داده شوند، نوترکیبی هومولوگ بین انتهاهای سازه و توالی‌های کروموزومی معادل ژن KanM را در داخل کروموزوم قرار خواهد داد. سلول‌های دیپلوئیدی نوترکیب در محیط دارای G-۴۱۸ رشد خواهند کرد ، در صورتیکه سلول‌های تغییر شکل نداده رشد نخواهند کرد. اگر ژن هدف برای حیات ضروری باشد، نصف هاگ‌هایی که بعد از هاگ زایی سلول‌های دیپلوئیدی نوترکیب را تشکیل می‌دهند، زنده نخواهند ماند.

عملکرد ژن طبیعی و پروتئین رمزدار شده از آن در داخل بدن کمک می‌کند.

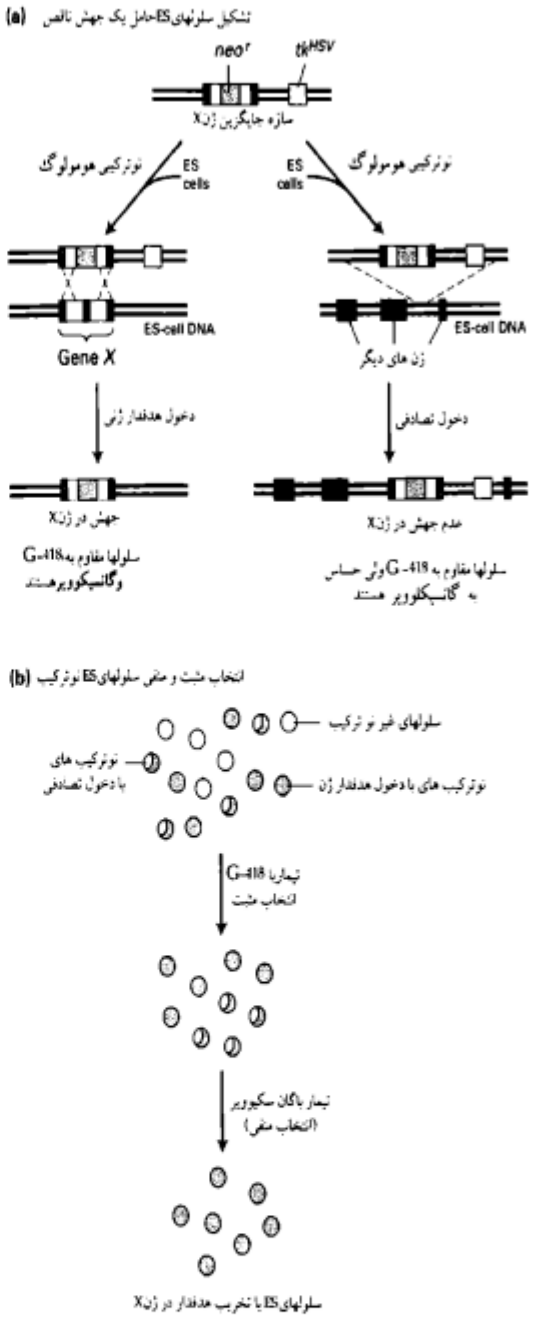
سه روش اصلی در تکنیک‌های غیرفعال سازی ژن قرار می‌گیرند: (۱) جایگزینی ژن با توالی‌های دیگر (۲) وارد کردن آللی که پروتئین رمزدار شده آن عملکرد پروتئین طبیعی بیان شده را مهار می‌کند و (۳) شروع تخریب mRNA بیان شده از یک ژن. ژن درون‌زای طبیعی در تکنیک‌هایی براساس روش اول تغییر داده می‌شود ولی در روش‌های دیگر تغییر داده نمی‌شود.

ژن‌های طبیعی مخمر می‌توانند با آلل‌های جهش یافته توسط نوترکیبی هومولوگ جایگزین شوند

تغییر دادن ژنوم مخمر ساکارومایسس سرویزیه به دو دلیل آسان است: سلول‌های مخمری به راحتی DNA خارجی را در شرایط خاصی جذب می‌کنند و DNA وارد شده به طور موثری با جایگاه کروموزومی مشابه‌اش در سلول دریافت کننده، مبادله می‌شود. این نوترکیبی خاص و هدفدار به توالی‌های مشابه DNA اجازه می‌دهد هر ژنی در کروموزوم مخمر با آلل جهش یافته جایگزین شود. (همچنانکه ما در قسمت ۱-۵ شرح دادیم، نوترکیبی بین کروموزوم‌های همتا به طور طبیعی در طی میوز اتفاق می‌افتد).

در یک روش عمومی برای تخریب ژن‌های مخمری در این شیوه، PCR به منظور تولید **سازه تخریبی**[1] دارای یک نشانگر قابل انتخاب که بعدا به داخل سلول‌های مخمری فرستاده می‌شود، استفاده می‌شود. همچنانکه در شکل ۳۹-۵ نشان داده شده است، پرایمرهایی به منظور تشدید با PCR از نشانگر قابل انتخاب طراحی شده است که دارای حدود ۲۰ نوکلئوتید مشابه در اطراف توالی‌هایی است که با ژن مخمری جایگزین شده است. سازه تشدید شدهٔ حاصل دارای نشانگر قابل انتخاب (مانند: ژن KanM، که مانند neo^r مقاومت به G-418 را القا می‌کند) در کنار حدود ۲۰ جفت باز قرار

1- Disruption costruct

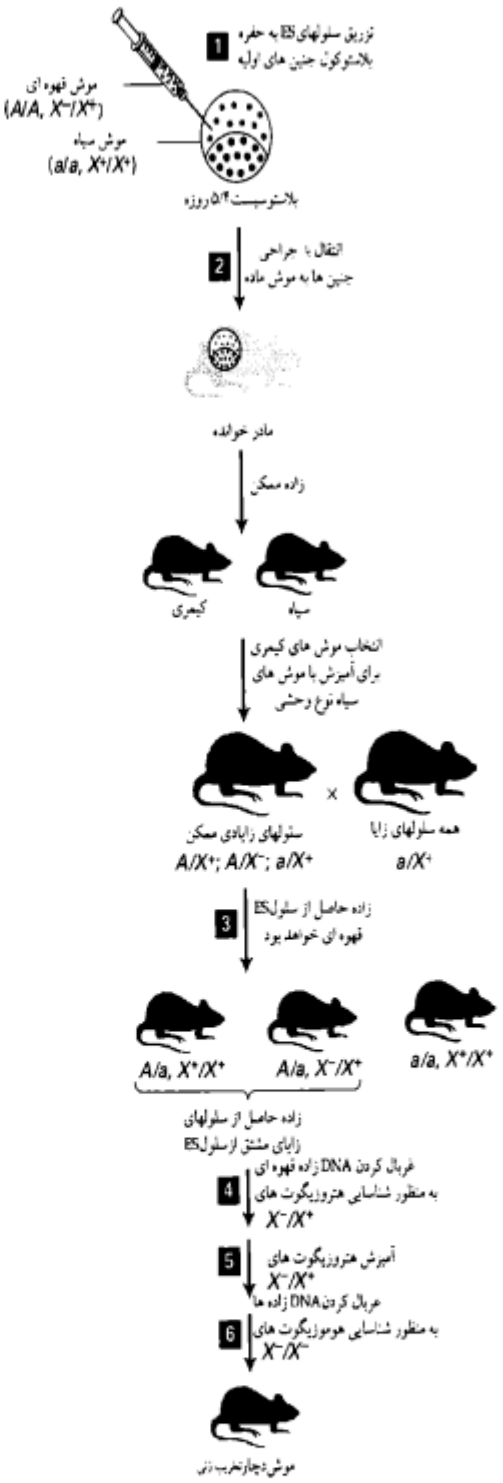


◀ شکل تجربی ۴۰-۵ جداسازی سلول‌های ES موشی با تخریب هدفدار ژنی، اولین مرحله در تولید موش‌های دارای نقص است. (a) وقتی که DNAی خارجی به داخل سلول‌های بنیادی جنینی وارد می‌شود، دخول تصادفی از طریق نوترکیبی غیرهوموبوگ بسیار بیشتر از دخول هدفدار ژن از طریق نوترکیبی هومولوگ اتفاق می‌افتد. سلول‌های نوترکیب که در آن‌ها یک آلل از ژن X تخریب شده است می‌تواند با استفاده از یک حامل نوترکیب که حامل ژن X تخریب شده با neo^r است، حاصل شود که مقاومت به G-418 را القاء می‌کند، و در خارج از ناحیه هومولوژی، tk^{HSV}، ژن تیمیدین کیناز از ویروس سیمپلکس هرپس[1] است. تیمیدین کیناز ویروسی، برخلاف آنزیم موشی درونی، می‌تواند گانسیکلوویر (مشتق نوکلئوتیدی) را به نوع مونوفسفاتی تبدیل کند. سپس این ترکیب به نوعی تری‌فسفات تبدیل می‌شود که همانندسازی DNA سلولی را در سلول‌های ES (سلول‌های بنیادی جنینی) مهار می‌کند. بنابراین گان سیکلوویر برای سلول‌های ES حامل ژن tk^{HSV} سمی است. دخول غیرهومولوگ شامل ژن tk^{HSV} است، در صورتیکه دخول هومولوگ اینطور نیست. بنابراین سلول‌های با دخول غیرهومولوگ به گان سیکلوویر حساس هستند. (b) سلول‌های نوترکیب توسط تیمار با G-418 انتخاب شده است، از اینجهت سلول‌هایی که در برداشت DNA دچار نقص هستند یا آن را در داخل ژنومشان قرار می‌دهند به این ترکیب سمی حساس هستند. سلول‌های نوترکیب زنده با گان سیکلوویر تیمار شده‌اند. فقط سلول‌های با تخریب هدفدار در ژن X و بنابراین فاقد ژن tk^{HSV} و سمیت همراه با آن، زنده خواهند ماند.

می‌گیرد که انتهاهای ژن مخمری هدف را به هم متصل می‌کند. سلول‌های مخمری دیپلوئیدی تغییرشکل یافته که دارای یکی از دو نسخه ژن آندونوکلئاز هدف است توسط سازه تخریبی که توسط مقاومت آنها به G-418 یا سایر فنوتیپ‌های قابل انتخاب دیگر شناخته می‌شوند، جایگزین شده‌اند. این سلول‌های مخمری دیپلوئید معمولاً به طور طبیعی بدون توجه به عملکرد ژن هدف رشد می‌کنند، ولی نصف هاگ‌های هاپلوئید حاصل فقط آلل تخریب شده را حمل خواهند کرد (شکل ۳۹-۵). اگر ژن برای حیات ضروری باشد، هاگ‌های حمل کننده آلل تخریب شده زنده نخواهند ماند.

ثابت شده است که تخریب ژن‌های مخمری توسط این روش در ارزیابی نقش پروتئین‌های شناخته شده توسط بررسی توالی DNA ژنومی کامل مفید است (فصل ۶ را ملاحظه کنید). عده زیادی از دانشمندان تقریباً ۶۰۰۰ ژن شناخته شده توسط این بررسی را با سازه تخریبی KanMX جایگزین کرده‌اند و تعیین کرده‌اند که آن تخریب‌های ژنی منجر به ایجاد هاگ‌های دیپلوئید غیرزنده می‌شوند. این بررسی‌ها نشان داده است که در حدود ۴۵۰۰ ژن از ۶۰۰۰ ژن مخمری برای قابلیت حیات مخمر لازم نیستند، (یک تعداد زیادی از ژن‌های غیرضروری)، در برخی حالات، تخریب یک ژن خاص ممکن است باعث ایجاد نقایصی شود که قابلیت حیات سلول‌های مخمری را که در شرایط آزمایشگاهی رشد می‌کنند به

1- Herpes simplex virus



◀ شکل تجربی ۴۱-۵ (شکل رنگی) سلول‌های ES هتروزیگوت برای ژن تخریب شده، به منظور ایجاد موشهای دچار تخریب هدفدار ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مرحله ۱: سلول‌های بنیادی جنینی (ES) هتروزیگوت برای جهش تخریب‌کننده[1] در یک ژن مورد نظر (X) و هوموزیگوت برای یک آلل غالب از ژن نشانگر، به حفره بلاستوکول جنین ۴۵ روزه که برای آلل مغلوب ژن نشانگر هوموزیگوت هستند. مرحله ۲: سپس جنین‌های اولیه به موش‌های ماده منتقل شدند. این زاده‌ها دارای سلول‌های مشتق از ES کیمری هستند. که با رنگ‌های قهوه‌ای و سیاه مخلوط نشان داده شده‌اند. مرحله ۳: سپس موشهای کیمری با موشهای سیاه آمیزش داده می‌شوند. زاده‌های قهوه‌ای از این جفت‌گیری، سلول‌های مشتق از ES در رده زایایی‌شان دارند. مراحل ۶-۴: ارزیابی DNAی جداسازی شده از مقدار کمی از بافت دمی می‌تواند موش‌های قهوه‌ای هتروزیگوت برای آلل ناقص را شناسایی بکند. آمیزش این موشها تولید افراد هوموزیگوت برای آلل تخریب شده را می‌کند که موش دچار تخریب ژنی است.

مخاطره نیاندازد. در عوض، سلول‌های دارای ژن تخریب شده ممکن است به علت وجود مسیرهای جبرانی قابلیت حیات داشته باشند. به منظور بررسی این امکان، ژنتیکدانهای مخمری در حال حاضر در حال جستجوی جهش‌های کشنده سنتتیک هستند که ممکن است ژن‌های غیرضروری با عملکردهای کاهش یافته را آشکار سازد (شکل ۹-۵ را ملاحظه کنید).

رونویسی ژن‌های متصل به پروموتر تنظیم شده می‌تواند از لحاظ آزمایشگاهی کنترل شود

گرچه تخریب یک ژن لازم برای رشد سلول هاگ‌های غیرزنده را ایجاد خواهد کرد ولی این روش نیاز به اطلاعات کمی این‌باره دارد که آیا پروتئین رمزدار شده واقعا در سلول‌ها است یا نه. برای درک بیشتر از اینکه چگونه یک ژن خاصی در رشد سلولی و قابلیت زیست سلول نقش دارد، محققان بایستی قادر به غیرفعالسازی قابل انتخاب در جمعیتی از سلول‌های در حال رشد باشند، یک روش برای انجام این عمل، پروموتر تنظیم شده به منظور خاموش کردن انتخابی رونویسی یک ژن اساسی را به خدمت می‌گیرد.

پروموتر مفید برای این هدف پروموتر GAL1 مخمر است که در سلول‌های رشد داده شده در محیط دارای گالاکتوز فعال است ولی به طور کامل در سلول‌های رشد داده شده در محیط گلوکز غیرفعال است. در این روش، توالی رمزدار کننده یک ژن اساسی (X) متصل به پروموتر GAL1 به داخل حامل شاتل مخمر وارد می‌شود (شکل ۱۷-۵ را ملاحظه کنید). سپس حامل نوترکیب به سلول‌های مخمری هاپلوئیدی که در آن ژن X تخریب شده است وارد می‌شود. سلول‌های هاپلوئیدی که تغییر شکل یافته‌اند در محیط گالاکتوز رشد خواهند کرد، از این رو نسخه طبیعی ژن X در حامل در حضور

1-Knockout mutation

گالاکتوز بیان شده است. وقتی که سلول‌ها به محیط دارای گلوکز منتقل می‌شوند، ژن X بیشتر رونویسی نمی‌شود. همچنانکه سلول‌ها تقسیم می‌شوند، مقدار پروتئین X رمزدار شده به تدریج کاهش می‌یابد، سرانجام سپس به حالتی از حذف می‌رسد که از جهش فقدان عملکردی تقلید می‌کند. تغییرات مشاهده شده در فنوتیپ آن سلول‌ها بعد از انتقال به محیط دارای گلوکز ممکن است گویای این باشد که فرآیندهای سلولی به پروتئین رمزدار شده با ژن X ضروری بستگی داشته باشند.

در کاربرد قبلی این روش، محققان عملکرد ژن‌های Hsc70 سیتوزولی را در مخمر مورد بررسی قرار دادند. سلول‌های هاپلوئید دارای تخریب در همه چهار ژن Hsc70 قابلیت زیست را نداشتند، مگر اینکه حامل دارای یک نسخه از ژن Hsc70 باشد که می‌تواند از پروموتر GAL1 در محیط دارای گالاکتوز بیان شود. با انتقال به محیط دارای گلوکز، سلول‌های دارای حامل سرانجام رشدشان را به خاطر ناکافی بودن فعالیت Hsc70 متوقف کردند. بررسی دقیق این سلول‌های در حال مرگ روشن کرد که پروتئین‌های ترشحی آنها وارد شبکه آندوپلاسمی نمی‌شوند (ER). این مطالعه اولین مدرک برای نقش غیرمنتظره پروتئین Hsc70 را در انتقال پروتئین‌های ترشحی به داخل ER. (فرآیندی که به تفصیل در فصل ۱۳ بررسی شده است) فراهم کرد.

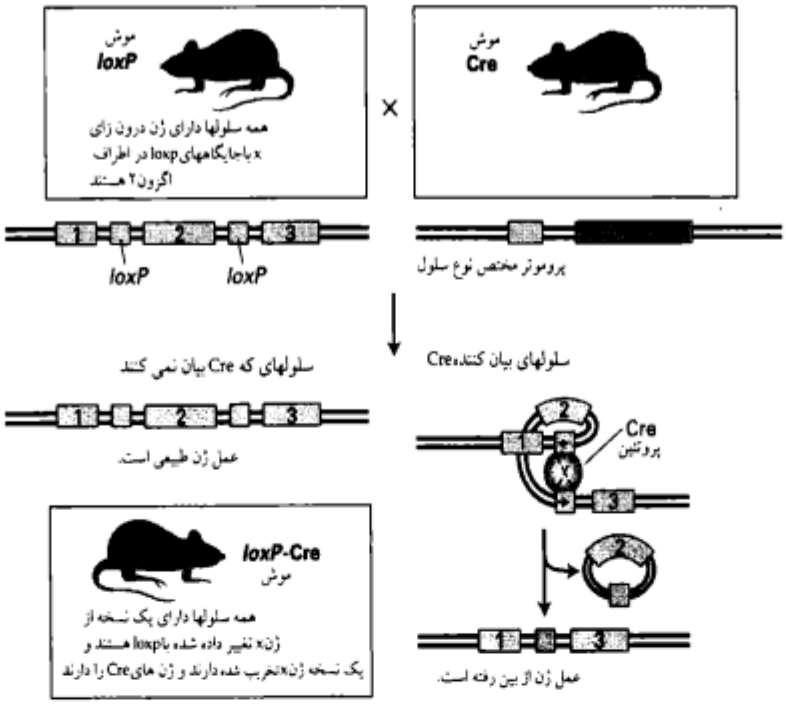
ژن‌های خاصی می‌توانند به طور دائم در رده سلولی زایای[1] موش‌ها غیرفعال شوند

بسیاری از روش‌ها برای تخریب ژن‌ها در مخمر می‌توانند در یوکاریوت‌های عالی‌تر به کار برده شود. این ژن‌های تغییر یافته می‌توانند وارد رده سلولی زایا توسط نوترکیبی هومولوگ به منظور ایجاد حیواناتی با یک ژن تخریب شده[2] شوند. موشهای دچار نقص در یک ژن خاص تخریب شده، سیستم آزمایشگاهی قدرتمندی برای مطالعه تکوین پستانداران و همچنین رفتار و فیزیولوژی آنها است. آنها همچنین در مطالعه اساس مولکولی بیماریهای ژنتیک انسانی خاص مفید واقع می‌شوند. موش‌های دچار نقص هدفدار در یک ژن توسط روش دو مرحله‌ای تولید می‌شوند. در مرحله اول، یک سازه DNA دارای آلل تخریب شده از یک ژن هدف خاص وارد سلول‌های بنیادی جنینی (ES) می‌شوند. این سلول‌ها، که از بلاستوسیست‌ها مشتق شده‌اند، می‌توانند در محیط کشت به چندین نسل رشد داده شوند (شکل ۷-۲۱ را ملاحظه کنید). در جزء کوچکی از سلول‌های انتقال ژن یافته، DNAی وارد شده متحمل نوترکیبی هومولوگ با ژن هدف می‌شود، اگرچه نوترکیبی در جایگاههای کروموزومی ناهمسان بسیار بیشتر اتفاق می‌افتد. به منظور انتخاب سلول‌هایی که در آنها دخول هدفدار ژنی همسان اتفاق می‌افتد، سازه DNAی نوترکیب که وارد سلول‌های ES شود نیاز به دو ژن نشانگر قابل انتخاب دارد (شکل ۴۰-۵). یکی از این ژن‌ها (neo^r) که مقاومت به G-418 را القا می‌کند، وارد ژن هدف می‌شود که بدانجهت آن را تخریب می‌کند. ژن قابل انتخاب دیگر، ژن تیمیدین کیناز از ویروسی سیمپلکس هرپس (tk^{HSV}) است که حساسیت به گان سیکلوویر (یک مشتق نوکلئوتیدی سمی) را القا می‌کند که آن به داخل سازه خارج از توالی ژنی هدف وارد می‌شود. فقط سلول‌های ES متحمل نوترکیبی هومولوگ می‌شوند و بنابراین tk^{HSV} در داخل ژنوم آنها قرار نمی‌گیرد و می‌توانند در حضور هم G-418 و هم گان سیکلوویر زنده بمانند. در این سلول‌ها یک آلل ژن X تخریب خواهد شد.

در مرحله دوم تولید موشهای دچار تخریب ژنی، سلول‌های ES هتروزیگوت برای جهش ایجاد کننده نقص در ژن X، به بلاستوسیست موش نوع وحشی دریافت کننده تزریق می‌شوند که بعدا به موش‌های ماده منتقل می‌شوند (شکل ۴۱-۵). زاده حاصل **کیمری** خواهد بود که دارای بافت‌های مشتق زیر سلول‌های ES کاشته شده و سلول‌های میزبان خواهد بود. اگر سلول‌های ES نیز برای یک مشخصه نشانگر قابل دید هتروزیگوت باشد (از قبیل رنگ) زاده کیمری که در آن سلول‌های ES زنده مانده و تکثیر حاصل کرده‌اند، به راحتی می‌تواند شناخته شود. سپس موشهای کیمری با موش‌های هوموزیگوت برای آلل مشخصه نشانگر دیگر به منظور تعیین اینکه آیا جهش ایجاد کننده نقص داخل لایه زایا قرار گرفته است یا نه، آمیزش داده می‌شوند. سرانجام، آمیزش موش‌ها، هر موش هتروزیگوت برای آلل دچار نقص تولید زاده هوموزیگوت برای آلل را خواهد کرد.

تکوین موش‌هایی که دارای ژن‌های تخریب‌شده هستند و از بیماریهای انسانی تقلید می‌کنند می‌تواند با فیبروز کیستی توضیح داده شود. با روش‌های شرح داده شده در قسمت ۴-۵، جهش مغلوب که باعث این بیماری می‌شود، سرانجام نشان داده شد در ژنی که به عنوان **CFTR** شناخته می‌شود قرار می‌گیرد که یک کانال کلری را رمزدار می‌کند. با استفاده از ژن **CFTR** انسانی نوع وحشی، محققان ژن موشی هومولوگ را جدا کرده‌اند و سپس جهش‌هایی را در

1-Germ line 2-Gene knockout



▲ **شکل تجربی ۴۲-۵ سیستم نوترکیبی LoxP-Cre می‌تواند ژن‌های انواع سلولی خاص را تخریب کند.** یک جایگاه LoxP به هر طرف اگزون ۲ ژن هدف X توسط نوترکیبی هومولوگ وارد می‌شود که موش LoxP را تولید می‌کند. جایگاههای LoxP که در اینترون‌ها هستند عملکرد ژن X را تخریب نمی‌کنند. موشهای Cre یک آلل ناقص X را دارند و یک ژن Cre از باکتریوفاژ P1 به پروموتر مختص نوع سلول متصل می‌شود. ژن Cre توسط نوترکیبی غیرهومولوگ به ژنوم موش وارد می‌شود و عملکرد سایر ژن‌ها را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. در موش‌های LoxP-Cre که از آمیزش حاصل می‌شوند، پروتئین Cre فقط در سلول‌هایی تولید می‌شود که آن پروموتر فعال است. بنابراین آنها تنها سلول‌هایی هستند که در آنها نوترکیبی بین جایگاههای LoxP کاتالیز شده توسط آنزیم Cre اتفاق می‌افتد و منجر به حذف اگزون ۲ می‌شود. از آنجایی که آلل دیگر ژن X ساختاری ناقص است، نتیجه حذف بین جایگاههای LoxP حذف کامل عملکرد ژن X در همه سلول‌های بیان کننده Cre است. با استفاده از پروموترهای مختلف، محققان می‌توانند اثرات ژن X ناقص شده را در انواعی از سلول‌ها مطالعه کنند.

داخل آن ایجاد کرده‌اند. سپس تکنیک تخریب ژنی به منظور ایجاد موش‌های جهش یافته هوموزیگوت مورد استفاده قرار گرفت. و علائمی (مانند، یک فنوتیپ) شامل اختلالاتی در کارکرد سلول‌های اپی‌تلیال نشان دادند که شبیه به علائم موجود در انسانهای دارای فیبروز کیستی بود. موش‌های دارای ژن غیرفعال شده به طور همزمان به صورت سیستم مدل برای مطالعه این بیماری ژنتیکی و گسترش درمانهای موثر مورد استفاده قرار گرفتند.

نوترکیبی سلول سوماتیک می‌تواند ژن‌ها را در بافت‌های خاص غیرفعال سازد

محققان اغلب اوقات علاقه به بررسی اثرات جهش‌های غیرفعال کننده ژن در یک بافت خاص از موش در یک مرحله خاص در تکوین دارند. به هر حال موش‌های ژن تخریب‌شده در رده سلول زایا در ممکن است در چندین بافت نقص داشته باشند یا قبل از مرحله تکوینی مورد نظر بمیرند. به منظور حل این مسئله، ژنتیکدانهای موشی یک تکنیک زیرکانه‌ای به منظور غیرفعال سازی ژن‌های هدف در انواع خاصی از سلول‌های سوماتیک یا زمانهای خاصی در طی تکوین را ابداع کردند.

این تکنیک جایگاههای نوترکیبی DNA مختص یک جایگاه (که جایگاههای LoxP نامیده می‌شود) را به خدمت می‌گیرد و از آنزیم Cre که نوترکیبی بین آنها را کاتالیز می‌کند استفاده می‌کند. **سیستم نوترکیبی LoxP-Cre** از باکتریوفاژ P1 حاصل شده است، ولی این سیستم نوترکیبی مختص جایگاه، وقتی در سلول‌های موش قرار داده می‌شود نیز عمل می‌کند. خصوصیت اصلی این تکنیک آن است که بیان پروتئین Cre توسط یک پروموتر مختص نوع سلول کنترل می‌شود. در موش‌های LoxP-Cre ایجاد شده توسط روش ترسیم

شده در شکل ۴۲-۵، غیرفعالسازی ژن مورد نظر (X) فقط در سلول‌هایی که در آنها پروموتر کنترل کننده ژن Cre فعال است اتفاق می‌افتد.

کاربرد اولیه این تکنیک این مدرک قوی را فراهم کرده است که گیرنده میانجیگر عصبی خاصی، برای یادگیری و حافظه مهم است. مطالعات فارماکولوژیکی و فیزیولوژیکی قبلی روشن ساخته بودند که یادگیری طبیعی نیاز به دسته NMDA از گیرنده‌های گلوتامات در هیپوکامپ (ناحیه‌ای از مغز) دارند. ولی موش‌هایی که در آنها ژن رمزدار کننده یک زیرواحد از گیرنده NMDA تخریب شده بود، بعد از تولد می‌مردند که این امر مانع از ارزیابی نقش این گیرنده‌ها در یادگیری می‌شد. با تبعیت از پروتوکلی که در شکل ۴۲-۵ آمده است، محققان موشهایی ایجاد کردند که در آنها ژن این زیرواحد از گیرنده در هیپوکامپ غیرفعال شده بود ولی در سایر بافت‌ها بیان می‌شد. این موش‌ها تا بالغ شدن زنده ماندند و نقایصی را در حافظه و یادگیری نشان دادند که این امر نقش این گیرنده‌ها را در امر توانایی موش‌ها به وارد کردن تجاربشان به حافظه‌شان تایید کرد.

آلل‌های غالب منفی از لحاظ عملکردی برخی ژن‌ها را مهار می‌کنند.

در موجودات زنده دیپلوئید، همچنانکه در بخش ۱-۵ اشاره شده است، اثر فنوتیپی یک آلل مغلوب فقط در افراد هوموزیگوت بیان می‌شود، در صورتیکه آلل‌های غالب در هتروزیگوت‌ها بیان می‌شوند. بنابراین یک فرد بایستی حامل دو نسخه از آلل مغلوب باشد تا فنوتیپ مرتبط را نشان دهد، ولی یک نسخه از آلل غالب فنوتیپ مرتبط را نشان می‌دهد. ما دیده‌ایم که چگونه موشهایی که برای جهش تخریب ژنی مغلوب هوموزیگوت هستند، می‌توانند توسط آمیزش افرادی که برای آن جهش تخریب ژنی هتروزیگوت هستند، به وجود آیند (شکل ۴۱-۵ را ملاحظه کنید). برای آزمایشاتی با سلول‌های حیوانی کشت داده شده، معمولاً تخریب هر دو نسخه از یک ژن به منظور ایجاد یک فنوتیپ جهش یافته، مشکل است. علاوه بر این، مشکل ایجاد موش‌های دارای هر دو نسخه از ژن جهش یافته اغلب با وجود ژن‌های مرتبط با عمل مشابه همراه می‌شود. که بایستی به منظور ظهور فنوتیپ قابل مشاهده غیرفعال شوند.

برای ژن‌های خاص، از مشکلات تولید موش‌های جهش یافته هوموزیگوت می‌تواند با استفاده از یک آلل حامل جهش غالب منفی اجتناب شود. این آلل‌ها از لحاظ ژنتیکی غالب هستند، آنها تولید یک فنوتیپ جهش یافته در سلول‌های حامل نسخه نوع وحشی از ژن را می‌کنند. به هر حال، برخلاف سایر انواع آلل‌های غالب، آللهای منفی غالب یک فنوتیپ مشابه با جهش فقدان عملکرد تولید می‌کنند. آلل‌های غالب منفی مفید برای یک عده از ژن‌ها شناخته شده‌اند و می‌توانند توسط ترانسفکشن، و یا انتقال ژن به داخل رده سلولی زایای موش‌ها یا سایر موجودات زنده وارد شوند. در هر دو حالت، ژن وارد شده در داخل ژنوم توسط نوترکیبی غیرهومولوگ قرار می‌گیرد. چنین ژن‌های وارد شده ترانس ژن[1] نامیده می‌شوند. ترانس ژن‌ها دارای یک آلل غالب منفی هستند که معمولاً چنان مهندسی شده‌اند که آلل توسط یک پروموتر تنظیم شده کنترل می‌شود، که اجازه بیان پروتئین جهش یافته در بافت‌های مختلف را در زمان‌های مختلف می‌دهد. همچنانکه در بالا اشاره شده است، قرارگیری تصادفی DNAی خارجی از طریق نوترکیبی غیرهومولوگ در فرکانس بسیار بیشتر از دخول از طریق نوترکیبی هومولوگ اتفاق می‌افتد. به دلیل این پدیده، تولید موش‌های ترانسژنیک یک فرآیند موثر و سرراست است (شکل ۴۳-۵).

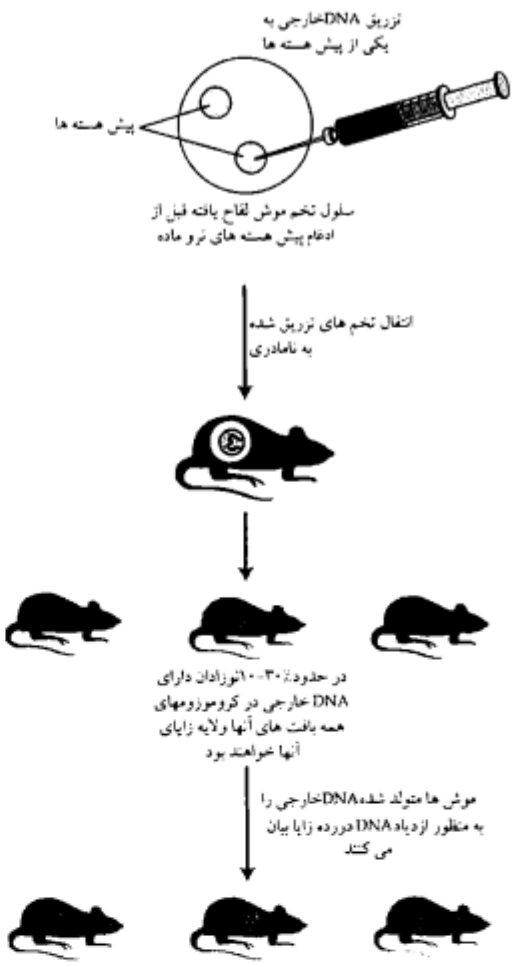
در میان ژن‌هایی که می‌توانند از لحاظ عملکردی توسط وارد کردن آلل غالب منفی غیرفعال شوند آنهایی هستند که پروتئین‌های اتصال یابنده به GTP کوچک را که به ابرخانواده GTPaseها تعلق دارند، رمزدار می‌کنند. همانطور که ما در چند فصل بعدی بررسی خواهیم کرد، این پروتئین‌ها (از قبیل، Ras، Rac و Rab) بعنوان کلیدهای داخل سلولی عمل می‌کنند. تبدیل این GTPaseها از حالت متصل به GDP غیرفعال به حالت متصل به GTP فعال به میانکش آنها با فاکتور مبادله کننده نوکلئوتیدی گوانین مرتبط بستگی دارد (GEF)[2]. یک GTPase کوچک جهش یافته که به طور مداوم به پروتئین GEF متصل می‌شود تبدیل GTPaseهای کوچک نوع وحشی درون‌زا را به حالت متصل به GTP فعال بلوکه خواهد کرد. بدین ترتیب جهت عملکرد کلیدی آنها را مهار خواهد کرد (شکل ۴۴-۵).

RNA مداخله‌گر باعث غیرفعال سازی ژنی توسط تخریب mRNAی مرتبط با آن می‌شود.

پدیده‌ای که اخیراً کشف شده است بعنوان **RNA مداخله گر (RNAi)** شناخته می‌شود که شاید راحت‌ترین روش برای مهار عملکرد ژن‌های خاص است. این راهکار از لحاظ تکنیکی ساده‌تر از

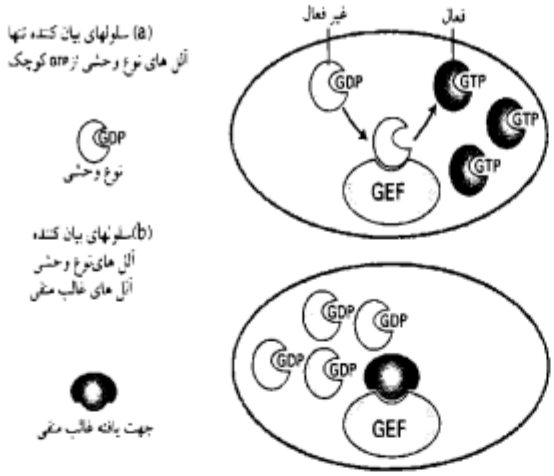
1-Transgene

2- Guanine nucleotide exchange factor



▲ **شکل تجربی ۴۳-۵ موش‌های ترانسژنیک توسط قرارگیری تصادفی ژن خارجی در داخل رده سلولی زایای موش تولید می‌شوند.** DNAخارجی که به داخل یکی از دو پیش هسته والدی وارد شده است (هسته‌های هاپلوئید نر و ماده که از والدین گرفته شده‌اند) شانس خوبی دارد که به طور تصادفی در ژنوم کروموزوم‌های تخم دیپلوئید قرار بگیرد. به دلیل اینکه یک ترانس ژن داخل ژنوم توسط نوترکیبی غیرهومولوگ قرار می‌گیرد، ژن‌های درونی را تخریب نمی‌کند.

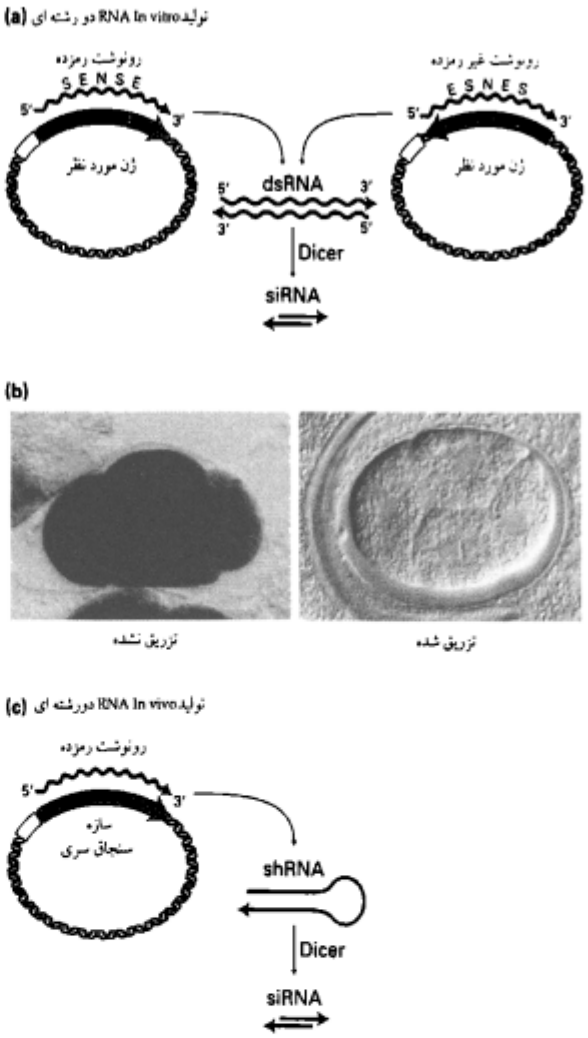
روش‌های شرح داده شده در بالا برای تخریب ژن‌ها است و اولین بار در کرم حلقوی اسگانس مشاهده شد، RNAi به توانایی RNA دورشته‌ای برای بلوکه کردن mRNA تک رشته‌ای مرتبط با آن اشاره می‌کند ولی mRNAهای با توالی متفاوت نیست. همانطور که در فصل ۸ شرح داده شده است، پدیده RNAi بر روی توانایی عمومی سلول‌های یوکاریوتی برای شکست RNA دورشته‌ای به قطعات دورشته‌ای (۲۳ نوکلئوتیدی) تکیه می‌کند که به عنوان RNA مهارگر کوچک شناخته می‌شوند (siRNA). RNA آندونوکلئازی که این فرآیند را کاتالیز می‌کند بعنوان Dicer شناخته می‌شود که در



▲ **شکل ۴۴-۵ غیرفعال سازی عملکرد GTPase نوع وحشی توسط عمل آلل جهش یافته غالب منفی.** (a) GTPaseهای کوچک (تک واحدی) توسط میانکش شان با فاکتور مبادله کننده نوکلئوتید گوانین فعال می‌شوند (GEF)، که تبادل GDP با GTP را کاتالیز می‌کند. (b) وارد کردن آلل غالب منفی ژن GTPase کوچک به داخل سلول‌های کشت داده شده یا حیوانات ترانسژنیک منجر به بیان GTPase جهش یافته می‌شود که به GEF متصل شده و آن را غیرفعال می‌سازد. نسخه‌های نوع وحشی درون‌زا از همان GTPase کوچک در حالت متصل به GDP (غیرفعال) به دام انداخته می‌شوند. یک آلل غالب منفی منفرد باعث ایجاد فنوتیپ فقدان عملکردی در هتروزیگوت‌ها مانند هوموزیگوت‌های حامل دو آلل فقدان عملکردی مغلوب می‌شود.

همه متازوئن‌هایافت می‌شود ولی در یوکاریوت‌های پست‌تر مانند مخمر یافت نمی‌شود. در عوض مولکول‌های siRNA می‌توانند باعث شکست مولکول‌های mRNA از توالی جفت شده و در یک واکنشی که توسط یک کمپلکس آنزیمی تحت عنوان RISC کاتالیز می‌گردد، شوند. RISC شناسایی و دورگه شدن بین یک رشته از siRNA و توالی مکملش را بر روی mRNA هدف واسطه گری می‌کند. سپس نوکلئازهای اختصاصی در کمپلکس RISC، دورگه mRNA/siRNA را می‌شکنند. این مدل اختصاصیت RNAi را تخمین می‌زند، از این جهت بستگی به جفت شدن باز (برای خاموش کردن عمل ژن دارد). از این رو mRNAی مکمل به طور مداوم توسط تجزیه نوکلئولیتیک تخریب می‌شود. عملکرد طبیعی هم Dicer و هم RISC، اجازه دادن به تنظیم ژن توسط مولکول‌های RNA درون زای کوچک است که بعنوان **میکرو RNAها (miRNA)** شناخته می‌شوند.

محققان از مسیر میکرو RNA برای خاموش کردن ژن مورد نظر با



شکل ۴۵-۵ RNA مداخله گر (RNAi) می‌تواند ژن‌ها را از لحاظ عملکردی در کرم حلقوی الگانس و سایر موجودات زنده غیرفعال سازد. (a) تولید invitro از RNA دو رشته‌ای (dsRNA) برای RNAi یک ژن هدف خاص. توالی رمزدار کننده ژن، یا از کلون cDNA یا یک قطعه از DNA ژنومی مشتق شده است در دو جهت حامل پلاسمیدی نزدیک به پروموتر قوی قرار گرفته است. رونویسی هر کدام از سازه‌ها در invitro با استفاده از RNA پلیمراز و ریبونوکلئوزید تری‌فسفات، نسخه‌های زیادی از mRNA در جهت رمزدهنده (مشابه یا توالی mRNA) یا در جهت مکمل غیررمزدهنده، می‌دهد. در شرایط مناسب، این مولکول‌های RNA مکمل به منظور تشکیل RNAی دو رشته‌ای جفت خواهند شد. وقتی که RNA دو رشته‌ای به داخل سلول‌ها تزریق می‌شود، توسط Dicer به siRNAها شکسته می‌شود. (b) مهار بیان Mex3RNA در جنین‌های کرم توسط RNAi (متن را برای درک مکانیسم بخوانید). (چپ) بیان Mex3RNA در جنین‌ها توسط دورگه سازی در جا با یک تروپ ویژه برای این mRNA مورد ارزیابی قرار گرفته است که متصل به آنزیمی است که تولید محصول رنگی را می‌کند. (راست) جنین حاصل از یک کرم که به آن Mex3mRNAی دورشته‌ای تزریق شده است Mex3mRNA تولید نمی‌کند و یا کم تولید می‌کند که با عدم وجود رنگ نشان داده شده است. هر جنین در مرحله چهار سلولی حدود ۵۰ میکرومتر طول دارد. (c) تولید invivo RNA دورشته‌ای از طریق پلاسمید مهندسی شده که به طور مستقیم وارد سلول‌ها شده است انجام می‌گیرد. سازه ژنی مصنوعی آرایش تاندم توالی‌های رمزدهنده و غیررمزدهنده از ژن هدف را دارد. وقتی که رونویسی می‌شود، RNA سنجاق‌سری کوچک دورشته‌ای (shRNA) تشکیل می‌شود. shRNA توسط Dicer به منظور تشکیل siRNA شکسته می‌شود.

استفاده از دو روش عمومی برای تولید siRNAها با توالی معین استفاده می‌کنند. در روش اول یک RNA دورشته‌ای مرتبط با توالی ژن هدف توسط رونویسی هر دو نسخه رمزدهنده و غیررمزدهنده این توالی در invitro تولید می‌شود. این RNAی دو رشته‌ای به غده جنسی کرم بالغ تزریق می‌شود، در آنجا توسط Dicer در جنین‌های در حال تکامل به siRNA تبدیل می‌شود. در ارتباط با کمپلکس RISC، مولکول‌های siRNA باعث می‌شوند که مولکول‌های mRNA به سرعت تخریب شوند. کرمهای حاصل فنوتیپی شبیه آنی دارند که از تخریب ژن مرتبط حاصل می‌شود. در برخی حالات، ورود تنها چند مولکول از RNAی دو رشته‌ای خاص به داخل سلول برای غیرفعال‌سازی نسخه‌های زیادی از mRNAی مرتبط کافی است. شکل ۴۵-۵ توانایی RNA دو رشته‌ای را برای مداخله کردن با تولید mRNA درون زای مرتبط در جنین‌های کرم حلقوی الگانس را نشان می‌دهد. در این آزمایش، مقدار mRNA در جنین‌ها توسط انکوبه کردن جنین‌ها با یک پروب نشاندار فلورسانس خاص برای mRNA مورد نظر تعیین شده است. این تکنیک (دورگه سازی درجا) در ارزیابی بیان mRNAی خاص در سلول‌ها و برشهای بافتی مفید است.

روش دوم تولید یک RNA دورشته‌ای خاص در invivo است. روش موثر برای انجام این عمل، بیان یک ژن مصنوعی است که

طوری طراحی شده است که دارای قطعات تاندم هم از رشته رمزدهنده و هم رشته غیررمزدهنده مرتبط با ژن هدف است (شکل ۴۵-۴). وقتی این ژن رونویسی می‌شود، یک RNAی دورشته‌ای به شکل ساختار سنجاق‌سری تشکیل می‌گردد که بعنوان RNA **سنجاق سری کوچک**[1] یا ShRNA ساخته می‌شوند. ShRNA سپس توسط Dicer به منظور تشکیل مولکول‌های SiRNA شکسته خواهد شد، حامل‌های بیانی لنتی ویروس برای وارد کردن ژن‌های مصنوعی برای بیان سازه‌های ShRNA به داخل سلول‌های حیوانی مفید هستند.

هر دو روش در مطالعات به منظور غیرفعالسازی هر کدام از ژن‌های شناخته شده در یک موجود زنده و به منظور مشاهده اینکه چه چیزی اشتباه رخ می‌دهد به کار می‌روند. برای مثال، در مطالعات ابتدایی با کرم حلقوی الگانس، تداخل RNA با ۱۶/۷۰۰ ژن (در حدود ۸۶ درصد ژنوم) ۱۷۲۲ فنوتیپ غیرطبیعی قابل مشاهده را حاصل نمود. ژن‌هایی که غیرفعالسازی عملکردی آنها باعث ایجاد فنوتیپ‌های غیرطبیعی می‌شود که می‌توانند به دسته‌هایی گروه بندی شوند. هر تعداد از یک دسته به طور فرضی همان پیام یا وقایع را کنترل می‌کند. ارتباطات تنظیمی بین ژن‌ها در هر دسته (برای مثال، ژن‌هایی که تکوین ماهیچه را کنترل می‌کنند) می‌تواند بعداً پیدا شود.

موجودات زنده‌ای که در آنها غیرفعال سازی ژنی به واسطه RNAi موفقیت‌آمیز بوده است، شامل مگس سرکه، انواع زیادی از گیاهان، Zebrafish، قورباغه گزنوپوس و موش‌ها هستند و امروزه مورد غربال‌های RNAi با مقیاس بزرگ قرار می‌گیرند. برای مثال حامل‌های لنتی ویروس به منظور غیرفعال سازی با RNAi بیشتر از ۱۰/۰۰۰ ژن مختلف بیان شده در سلول‌های پستانداری کشت داده شده طراحی شده‌اند. عمل ژن‌های غیرفعال شده می‌تواند از نقایص رشد یا شکل کلونی‌های سلولی که با حامل‌های لنتی ویروسی عفونی شده‌اند به دست آید.

نکات کلیدی بخش ۵-۵

غیرفعال سازی ژن‌های خاص در یوکاریوت‌ها

هنگامی که یک ژن کلون شده نشانه‌های مهم درباره عملکرد طبیعی آن ژن در داخل بدن موجود زنده را می‌توان با اثرات فنوتیپ مشاهده شده از ژن جهش یافته به دست آورد.

■ ژن‌ها را در مخمر می‌توان با وارد نمودن یک ژن نشانگر انتخابی به درون یک آلل از ژن نوع وحشی طی نوترکیبی هومولوگش تخریب نموده و جهش یافته هتروزیگوت تولید کرد. هنگامی که چنین جهش یافته هتروزیگوت هاگ‌زدایی نماید، تخریب یک ژن ضروری باعث تولید دو هاگ هاپلوئید خواهد شد که توانایی زنده ماندن را ندارند.

■ یک ژن مخمر می‌تواند در یک مسیر کنترلی با استفاده از پروموتر GAl1 خاموش کننده رونویسی ژن غیرفعال شود. و این امر زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌ها به محیط حاوی گلوکز منتقل گردند.

■ در موش، ژن‌های تغییر یافته را می‌توان با استفاده از نوترکیبی هومولوگش به درون لایه زایا در جایگاه ژنومی اولیه‌شان وارد کرده و را ایجاد نمود. (شکل ۴۰-۵ و ۴۱-۵ را ملاحظه کنید.) سوشن‌های تخریب ژن شده می‌توانند مدل‌های خوبی برای بیماریهای ژنتیکی انسان همچون فیبروز کیستیک باشند.

■ سیستم نوترکیبی loxP-cre امکان تولید موش‌هایی را می‌دهد که یک ژن در یک بافت خاص تخریب شده است.

■ در تولید سلول‌ها یا موجودات ترانشژیک، DNAی خارجی با استفاده از نوترکیبی غیرهومولوگ وارد ژنوم می‌شود (شکل۴۳-۵ را ملاحظه کنید). ایجاد آلل غالب منفی در این مسیر می‌تواند یک ژن را بدون تغییر در توالی از لحاظ عملکرد غیرفعال نماید.

■ در اغلب موجودات همچون کرم حلقوی الگانس، RNAی دورشته‌ای باعث تخریب همه مولکول‌های mRNA با توالی مشابه با آن می‌شود (شکل ۴۵-۵ را ملاحظه کنید). این پدیده با عنوان RNAi (RNA مداخله‌گر) شناخته شده و روشی اختصاصی و قدرتمند در غیرفعال نمودن عملکرد ژن‌ها بدون تغییر ساختارشان می‌باشد.

چشم‌اندازی به آینده

همچنانکه مثال‌ها در این فصل و در کل کتاب نشان می‌دهند، ارزیابی‌های ژنتیکی اساس درک ما از بسیاری از فرآیندهای اصلی از زیست‌شناسی سلولی است. با بررسی نتایج فنوتیپی جهش‌هایی که یک ژن خاص را غیرفعال می‌کنند، ژنتیکدان‌ها قادر به ارتباط دادن دانش توالی، ساختار و فعالیت بیوشیمیایی پروتئین رمزدار شده به عملکرد آن در سلول زنده یا موجود زنده پرسلولی شده‌اند. روش کلاسیکی به منظور ایجاد این ارتباطات در هم انسان‌ها و هم موجودات پست‌تر، موجودات آزمایشگاهی جهت شناسایی

1- Small hair pin RNA

جهش‌های جدید موردنظر براساس فنوتیپ آنها و سپس جداکردن ژن متاثر و محصول پروتئینی آن است.

اگرچه دانشمندان به استفاده از این روش ژنتیکی کلاسیک به منظور تشریح فرآیندهای سلولی اساسی و مسیرهای بیوشیمیایی ادامه می‌دهند، در دسترس بودن اطلاعات توالی ژنومی کامل برای اغلب‌موجودات زنده آزمایشگاهی معمولی به طور اساسی مسیر آزمایش‌های ژنتیکی را عوض می‌کند. با استفاده از چندین روش محاسباتی، دانشمندان توالی ژنی رمزدار کننده پروتئین را در اغلب موجودات زنده آزمایشگاهی مانند E.Coli، مخمر، کرم حلقوی الگانس، درزوفیلا، آرابید و پسیس، موش و انسان‌ها را شناسایی کرده‌اند. توالی‌های ژنی، توالی اسید آمینه‌ای اولیه محصولات پروتئینی رمزدار شده را نشان می‌دهند که برای ما تقریباً لیست کامل پروتئین‌های پیدا شده در هر موجود زنده آزمایشگاهی را فراهم می‌کند.

راهکار به کار رفته توسط اغلب محققین از کشف ژن‌های جدید و پروتئین‌های جدید با کشف عملکردهای ژن‌ها و پروتئین‌ها جایگزین شده است که توالی‌شان از قبل شناخته شده است. وقتی یک ژن مورد نظر شناخته شد، اطلاعات توالی ژنومی تا حد زیادی به دستکاری‌های ژنتیکی بر روی ژن سرعت می‌بخشند، که شامل غیرفعالسازی آن به منظور درک بیشتر درباره عملکردش است. دسته‌های حامل برای غیرفعالسازی RNAi اغلب ژن‌های تعیین شده در نماتد الگانس اجازه غربال‌های ژنتیکی موثر را که در این موجود پرسلولی انجام می‌شود را می‌دهد. این روش‌ها هم اکنون برای مجموعه‌های بزرگی از ژن‌ها در سلول‌های پستانداری کشت داده شده به کار می‌رود و در آینده نزدیک هم RNAi و هم روش‌های تخریب‌کردن برای غیرفعالسازی هر ژنی در موش استفاده خواهد شد.

در گذشته، یک دانشمند ممکن بود سالهای زیادی را فقط برای مطالعه یک ژن صرف کند، ولی امروزه دانشمندان به طور مشترک کل دسته‌های ژنی را در یک زمان مطالعه می‌کنند. برای مثال، با ریزآرایه DNA میزان بیان همه ژن‌ها در یک موجود زنده می‌تواند تقریباً به راحتی بیان یک ژن منفرد اندازه‌گرفته شود. یکی از چالش‌های بزرگ در مقابل ژنتیک‌دانان در قرن بیست و یک بهره برداری از مقادیر زیاد داده‌های موجود بر روی عملکرد و تنظیم ژن‌های افراد به منظور فهم اینکه چگونه ژن‌ها به منظور تشکیل مسیرهای بیوشیمیایی و شبکه‌های تنظیمی گروه بندی می‌شوند، است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

یک کشت از مخمری که به اوراسیل برای رشدش نیاز دارد ($ura3^-$) جهش داده شده است و دو کلونی جهش یافته X و Y از آن جداسازی شده‌اند. آمیزش سلول‌های a از جهش یافته X با سلول‌های α از جهش یافته Y به منظور تشکیل سلول‌های دیپلوئید انجام شد. سلول‌های X و Y والدی و ($ura3^-$) و سلول‌های دیپلوئید در پلیت‌های آگار دارای اوراسیل کشت داده و در دمای $23^\circ c$ یا $32^\circ c$ انکوبه شدند. رشد سلولی توسط تشکیل کلونی‌ها بر روی پلیت‌های کشت همچنانکه در شکل صفحه بعد نشان داده شده است آگهی داده می‌شد.

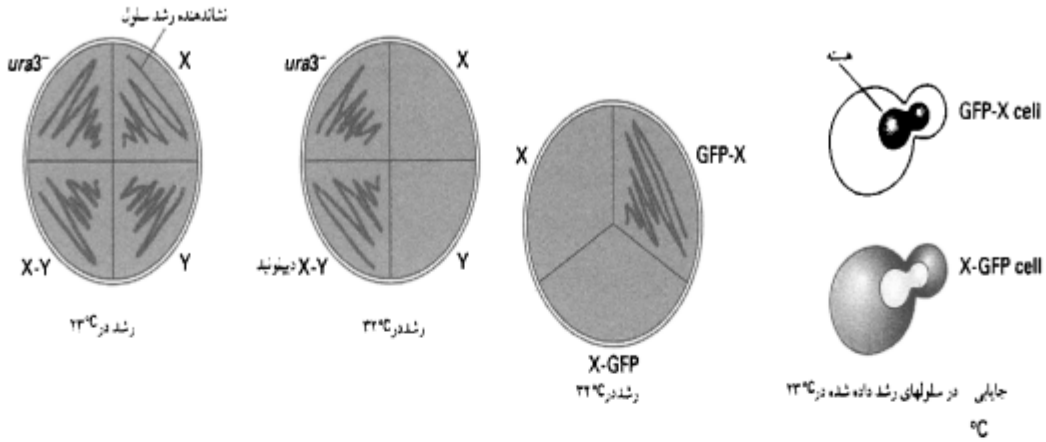
a. چه چیزی می‌توان در مورد جهش یافته‌های X و Y از داده‌های موجود، نتیجه‌گیری کرد؟

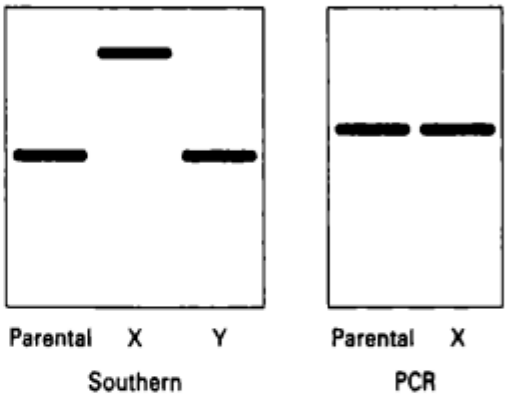
b. یک کتابخانه cDNA مخمری نوع وحشی تهیه شده در یک پلاسمیدی که دارای ژن $URA3^+$ نوع وحشی است، به منظور تغییر شکل به سلول‌های X مورد استفاده قرار گرفت. هر لکه سیاه در زیر نشاندهنده یک کلون منفرد در حال رشد روی پلیت پتری دیش است. اختلافات مولکولی بین کلون‌های رشد یابنده بر روی دو پلیت چیست؟ چگونه آن نتایج می‌توانند به منظور شناسایی ژن رمزدار کننده X مورد استفاده قرار گیرند؟

Growth at 32° C on media lacking uracil

Growth at 23° C on media lacking uracil

c. DNAی استخراج شده از سلول‌های والدی از سلول‌های X و از سلول‌های Y با آنزیم محدودکننده هضم شدند. ترکیب حاصل توسط تجزیه تحلیل لکه گذاری ساترن مورد ارزیابی قرار گرفت، همچنانکه در سمت چپ در زیر نشان داده شده است با استفاده از پروب به دست آمده از ژن رمزدار کننده X، بعلاوه، پرایمرهای PCR برای تشدید ژن رمزدار کننده X در هر دو سلول‌های والدی و X مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای مکمل نقاط خارج از ژن رمزدار کننده X بودند. نتایج PCR در ژل سمت راست نشان داده شده است. چه نتیجه‌ای می‌توان درباره جهش در ژن X از این داده‌ها گرفت؟



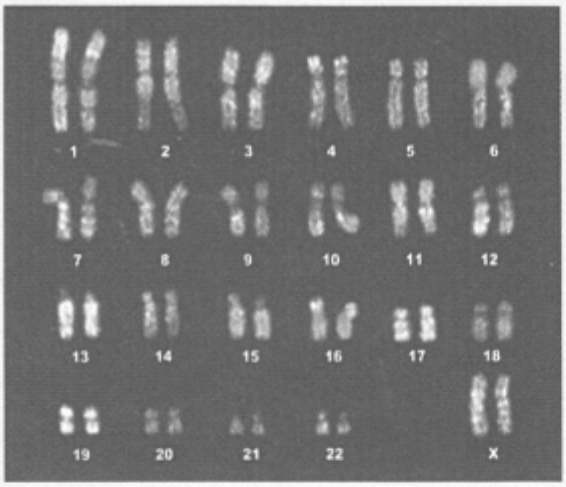


d. یک سازواره از ژن X نوع وحشی به منظور رمزدار کردن یک پروتئین الحاقی که در آن پروتئین با فلورسانس سبز (GFP) در انتهای N(GFP-X) یا انتهای C(X-GFP) از پروتئین موجود است طراحی شد. هر دو سازواره بر روی پلاسمید URA^{3+} موجود بودند و به منظور انتقال ژن به سلول‌های X رشد داده شده در غیاب اوراسیل استفاده شدند. سلول‌های دریافت کننده ژن با رشد در دمای $23^{\circ}C$ که در پائین و طرف چپ نشان داده شده است مشخص شدند. در طرف راست تصاویر فلورسانس از سلول‌های X-GFP و GFP-X رشد داده شده در دمای $32^{\circ}C$ که در آن‌ها رنگ سبز وجود پروتئین با فلورسانس سبز را نشان می‌دهد. توجیه معقول برای رشد GFP-X ولی نه X-GFP در دمای $32^{\circ}C$ چیست؟

e. زاده‌های هاپلوئید از سلول‌های دیپلوئید از قسمت (a) در بالا تولید شده‌اند. جهش یافته‌های دوگانه XY حدود $\frac{1}{4}$ این زاده‌ها را تشکیل می‌دهند. سلول‌های هاپلوئید X و Y و سلول‌های XY در محیط کشت مایع در مرحله قبل از جوانه زنی قرار دارند و سپس از $23^{\circ}C$ به $32^{\circ}C$ جابه جا می‌شوند. بررسی سلول‌ها در ۲۴ ساعت بعد آشکار می‌کند که سلول‌های X با جوانه‌های کوچک ایست می‌کنند و سلول‌های Y با جوانه‌های بزرگ ایست در رشد می‌کنند و سلول‌های XY در مرحله جوانه کوچک دچار ایست می‌شوند. ارتباط بین X و Y چیست؟

فصل ۶

ژن‌ها، ژنومیکس و کروموزوم‌ها



این کروموزومهایی که بصورت روشن با RXFISH رنگ‌آمیزی شده‌اند، هم زیبا هستند و هم مشخص نمودن ناهنجاریهای کروموزومی و مقایسه کاریوتیپ‌های گونه‌های مختلف مفید می‌باشند.

رئوس مطالب

۶-۱- ساختار ژنوم یوکاریوتی

۶-۲- سازمان دهی کروموزوم ژن‌ها و DNA غیر رمزگردان

۶-۳- عناصر DNA قابل انتقال (متحرک)

۶-۴- DNAهای اندامکی

۶-۵- ژنومیکس: آنالیز وسیع ژنوم، ساختار ژن و بیان

۶-۶- سازمان دهی ساختاری کروموزوم‌های یوکاریوتی

۶-۷- ریخت‌شناسی و عناصر عملکردی کروموزوم‌های یوکاریوتی

در فصل‌های قبلی آموختیم چگونه ساختار و ترکیب پروتئین‌ها، به آنها امکان می‌دهد تا دسته وسیعی از اعمال سلولی را انجام دهند. ما همچنین یک ترکیب حیاتی دیگر سلول بنام اسیدهای نوکلئیک و فرآیندی که طی آن اطلاعات رمز شده در توالی DNA بصورت پروتئین ترجمه می‌گردد، را مورد بررسی قرار دادیم. در این فصل، مجددا تمرکز ما بر روی DNA و پروتئین‌ها می‌باشد. همچنین ویژگی‌های هسته یوکاریوتی و ژنوم‌های اندامکی را مورد ملاحظه قرار می‌دهیم. خصوصیات ژن‌ها و توالی DNA که ژنوم را تشکیل می‌دهند و همینطور چگونه این DNA ساختاربندی شده و توسط پروتئین‌ها در داخل سلول سازمان دهی می‌گردد.

با آغاز قرن بیست و یکم زیست شناسان مولکولی، ژنوم کامل صدها ویروس، انبوهی از باکتری‌ها و یک یوکاریوت تک سلولی بنام مخمر جوانه‌زن ساکارومایسس سرویزیه را بطور کامل تعیین توالی کردند. علاوه بر این، بخش عمده توالی ژنوم در مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسس پمبه و چندین یوکاریوت چندسلولی شامل کرم حلقوی الگانس، مگس سرکه دروزوفیلا ملانوگاستر، موش و انسان نیز شناخته شده است. تجزیه و تحلیل جزئیات داده‌های حاصل از این توالی‌یابی‌ها، بینش سازمان دهی ژنوم و عملکرد ژن‌ها را آشکار می‌سازند. این موضوع به محققان امکان می‌دهد تا ژن‌هایی را که قبلا ناشناخته بودند، شناسایی نموده و تعداد کل ژن‌های رمز کننده پروتئین در هر ژنوم را تخمین بزنند. مقایسه میان توالی‌های ژنی، اغلب باعث ایجاد بینش برای اعمال احتمالی ژن‌های تازه شناسایی شده می‌گردد. مقایسه‌ها میان توالی و سازمان‌یابی ژنوم بین گونه‌ها نیز به فهم ما از تکامل موجودات زنده کمک می‌نماید. تعیین توالی DNA نشان می‌دهد، قسمت بزرگی از ژنوم یوکاریوت‌های عالی، mRNA یا RNAهای دیگر مورد نیاز موجود زنده را رمزدهی نمی‌کنند. چنین DNA غیررمزگردان تقریباً ۹۵ درصد از DNA کروموزوم انسان را تشکیل می‌دهد! DNA غیررمزگردان در موجودات پرسلولی، نواحی زیادی را دربرمی‌گیرد، این نواحی مشابه هم بوده ولی یکسان نیستند. تنوع در داخل این گستره از **DNAی تکراری** میان افراد مختلف تا حدی است که هر فردی را می‌توان بوسیله **انگشت‌نگاری**[1] **DNA** و براساس تنوع این توالی‌ها،

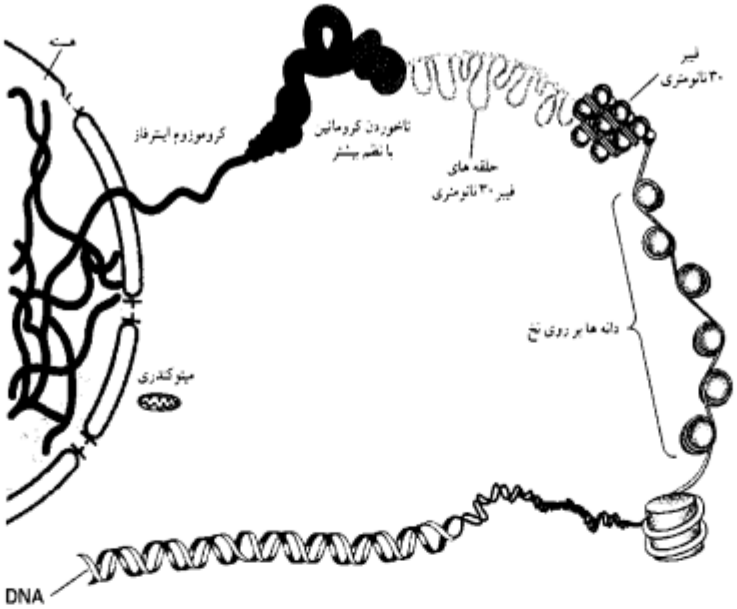
1- Fingerprint

شناسایی نمود. علاوه بر این، چنین توالی‌های تکراری DNA در افراد مختلف یک‌گونه، در موقعیت‌های یکسان یافت نمی‌شوند. همه DNA غیررمزگردان در مجموع DNA به درد نخور[1] نامیده شده و هیچ کاربردی برای آن در نظر گرفته نمی‌شود. اکنون ما اساس تکاملی همه این DNA اضافی و تنوع در موقعیت توالی‌های خاص میان افراد را درک می‌کنیم. ژنوم‌های سلولی حاوی قطعات DNA همزیست می‌باشند. این قطعات **قابل انتقال**[2] بوده و توالی‌هایی هستند که می‌توانند خود را کپی برداری کرده و در سراسر ژنوم جابجا شوند. گرچه بنظر می‌رسد قطعات DNA قابل انتقال در چرخه زندگی یک موجود عملکرد کمی داشته باشند اما در طی دوره تکاملی، آنها ژنوم‌ها را تشکیل داده و باعث تکامل سریع موجودات چندسلولی شده‌اند. در یوکاریوت‌های عالی، نواحی از DNA که پروتئین یا RNAی عملکردی را رمزدهی می‌کنند (یعنی **ژن‌ها**)، در میان این DNAی به ظاهر غیرعملکردی قرار می‌گیرند. علاوه بر DNA غیرعملکردی میان ژن‌ها اینترون‌های غیررمزگردان در داخل ژن‌های گیاهان پرسلولی و حیوانات، بطور معمول وجود دارند. تعیین توالی چنین ژن رمزدهی کننده پروتئین، در دسته‌ای از گونه‌های یوکاریوتی نشان می‌دهد این فشار تکاملی است که حفظ توالی‌های نسبتا مشابه در نواحی رمزدهی کننده یا اگزون‌ها را انتخاب می‌کند. برخلاف اگزون‌ها، اینترون‌ها تنوع توالی گسترده‌ای دارند و این توالی‌ها بعضی مواقع به کلی حذف می‌شوند. این امر بیانگر آن است که اغلب توالی‌های اینترونی اهمیت عملکردی کمی دارند. با وجود این، همانطور که خواهیم دید، اگرچه اغلب توالی DNA اینترون‌ها غیرعملکردی است، وجود اینترون به نفع تکامل پروتئین‌های چند دُمینی[3] است. این پروتئین‌ها در میان یوکاریوت‌ها عالی رایج می‌باشند. اینترون‌ها با ایجاد ترکیبات جدید از دُمین‌های عملکردی، امکان تکامل سریع پروتئین‌ها را فراهم می‌سازند.

میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها نیز حاوی DNA بوده که این DNA پروتئین‌های ضروری برای عمل این اندامک‌های حیاتی را رمزدهی می‌کند. ما خواهیم دید که DNA میتوکندری و کلروپلاست، بقایای تکاملی از منشا این اندامک‌ها می‌باشد. مقایسه توالی‌های DNA میان دسته‌های مختلف ژنوم باکتری‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها نشان می‌دهد این اندامک‌ها از باکتری‌های درون سلولی سرچشمه می‌گیرند که با سلول‌های یوکاریوتی باستان روابط همزیستی داشته‌اند. اندازه DNA سلولی مساله مهمی است و سلول‌ها بایستی با این مساله کنار بیایند. DNA در یک سلول انسانی تقریباً دارای طولی حدود ۲ متر است که باید در داخل سلول‌هایی با قطر کمتر از ۱۰ میکرومتر یعنی با نسبت فشردگی 10^5 به ۱ قرار بگیرد. به اصطلاح نسبی، اگر یک سلول دارای یک سانتی متر قطر باشد، طول DNA بسته بندی شده در هسته آن تقریباً ۲ کیلومتر خواهد بود! در یوکاریوتها پروتئین‌های تخصص یافته به DNA هسته‌ای متصل شده و با ظرافت موجب تا خوردن DNA شده و آن را سازمان دهی کرده و اندازه آن را برای قرارگیری در هسته سلول مناسب می‌سازند. در این حالت نیز بدون تاخوردگی یا شکستگی در مولکول طویل DNA، هر بخش از DNA شدیدا فشرده به آسانی می‌تواند برای انجام رونویسی، همانندسازی DNA و تعمیر DNA آسیب دیده در دسترس قرار گیرد. بنابراین یکپارچگی DNA باید در طی فرآیند تقسیم سلولی و هنگامی که به سلول‌های دختر منتقل می‌شود، حفظ گردد. در یوکاریوت‌ها، کمپلکسی از DNA و پروتئین‌هایی سازمان دهنده آن **کروماتین**[4] نامیده می‌شوند. کروماتین می‌تواند طی تقسیم میتوز بصورت **کروموزوم** مشاهده شود. (شکل آغازین فصل را ملاحظه کنید). همانطور که در این فصل و فصل بعدی خواهیم دید، سازمان دهی DNA بصورت کروماتین مکانیسمی برای تنظیم بیان ژن ایجاد می‌کند. این مکانیسم در باکتری‌ها وجود ندارد.

در پنج قسمت اول این فصل، ما نمایی از ژن‌ها و ژنوم‌های یوکاریوتی را مرور می‌کنیم. در وهله اول، ما ساختار ژن‌های یوکاریوتی و پیچیدگی این ساختار را در موجودات عالی که ناشی از پردازش متناوب mRNAی اولیه به mRNAهای پیرایش شده است مورد بحث قرار می‌دهیم. سپس رده‌های اصلی DNA یوکاریوتی همچون ویژگی‌های خاصی از قطعات DNA قابل انتقال و همچنین چگونگی شکل‌گیری ژنوم‌های امروزی را توضیح می‌دهیم. سپس DNAی اندامک و تفاوت آن با DNA هسته‌ای را موردبررسی قرار می‌دهیم. این توضیحات ما را برای بحث در مورد **ژنومیکس** آماده می‌نماید. ژنومیکس روش‌هایی براساس کامپیوتر برای آنالیز و تفسیر مقادیر هنگفتی از داده‌های توالی می‌باشد. دو قسمت آخر این فصل در مورد چگونگی سازمان‌دهی DNA بصورت فیزیکی در سلول‌های یوکاریوتی است. ما بسته‌بندی DNA و پروتئین‌های هیستونی را بصورت کمپلکس‌های فشرده (نوکلئوزوم‌ها، نوکلئوزوم‌ها واحدهای

1- Junk DNA
2- Transposoble
3- Multi domain
4- Chromatin



انواع اصلی توالی های DNA

DNA با توالی ساده	ژنهای تک نسخه
عناصر DNA قابل انتقال	خانواده ژنی
DNA بینابینی	ژنهای تکراری تصادفی
	اینترون ها

▲ **شکل ۱-۶ مروری بر ساختار ژن‌ها و کروموزوم‌ها.** DNAی یوکاریوت‌های عالی از توالی‌های منحصر به فرد و تکراری تشکیل می‌شود. تقریباً ۱/۵ درصد از DNA انسانی، پروتئین‌ها و RNAهای عملکردی و توالی‌های تنظیمی را رمزدهی می‌نماید. توالی‌های تنظیمی بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند. بقیه DNA از اینترون‌های درون ژنی و DNAی بین ژنی تشکیل شده است. DNAی بین ژنی در انسان تقریباً ۴۵ درصد است و از قطعات DNA قابل انتقال (متحرک) و همزیست‌های ژنتیکی حاصل شده و به تکامل ژنوم‌های امروزی منتهی شده است. هر کروموزوم از یک مولکول منفرد و طویل DNA حاوی تقریباً ۲۸۰ میلیون باز در انسان ساخته شده است و بصورت سطوح بالاتری از تراکم بوسیله پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی که با آن با ظرافت خاصی آمیخته شده‌اند، سازمان‌دهی می‌گردد. مولکول‌های DNA کوچکتر در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها قرار می‌گیرد.

ساختمانی اصلی کروماتین هستند)، و همچنین در مقیاس بالاتر، ساختار کروموزوم‌ها و عناصر عملکردی موردنیاز برای همانندسازی کروموزوم و تفکیک آنها را مورد بررسی قرار می‌دهیم. شکل ۱-۶ مرور کلی بر این موضوعات است. شناخت ژن‌ها، ژنومیکس و کروموزوم‌ها در این فصل ما را برای بررسی دانش کنونی آماده کرده و چگونگی تنظیم سنتز و غلظت هر پروتئین و RNA عملکردی در سلول در دو فصل بعد بررسی می‌شوند.

۶-۱ ساختار ژن‌های یوکاریوتی

از دید مولکولی، یک ژن معمولاً توالی کاملی از اسیدهای نوکلئیک است که برای سنتز یک محصول عملکردی (پلی پپتید یا RNA) ضروری می‌باشد. طبق این تعریف، یک ژن تعداد نوکلئوتید بیشتری از نوکلئوتیدهای رمزدهی‌کننده توالی اسید آمینه‌ای پروتئین یا یک RNA عملکردی (ناحیه رمزکننده) را دارد. یک ژن همچنین شامل همه توالی‌های DNA مورد نیاز برای سنتز یک رونوشت RNA خاص است. فرقی نمی‌کند جایگاه این توالی‌ها نسبت به ناحیه رمزدهی‌کننده در کجا قرار گرفته باشند. برای مثال، در ژن‌های یوکاریوتی، نواحی کنترل رونویسی به نام نواحی **تشدید کننده**[1] می‌توانند ۵۰ کیلوباز یا بیشتر دور از ناحیه رمزدهی‌کننده قرار گیرند. همانطور که در فصل ۴ آموختیم، نواحی غیررمزدهنده مهم در ژن‌های یوکاریوتی شامل پرموتر و همچنین توالی‌های ویژه برش انتهای ′۳ و پلی آدنیلاسیون به نام **جایگاههای پلی A**[2] و توالی‌های پیرایش رونوشت اولیه RNA به نام **جایگاههای پیرایش**[3] می‌باشند. (شکل ۱۵-۴ را ملاحظه کنید). جهش در این توالی‌ها که شروع رونویسی و پردازش RNA را کنترل می‌کنند، بیان طبیعی و

1- Enhamcer
2- Poly (A) Sites
3- Splice sites

عملکرد RNAها را تحت تاثیر قرار داده و فنوتیپ‌های متفاوت در موجودات جهش یافته ایجاد می‌کند. ما این عناصر مختلف کنترل ژن‌ها را با جزئیات بیشتر در فصل‌های ۷ و ۸ بررسی می‌کنیم.

گرچه اغلب ژن‌ها بصورت mRNAهای رمزدهی‌کننده پروتئین‌ها رونویسی می‌شوند، ولی برخی توالی‌های DNA بصورت RNAهایی رونویسی می‌شوند که پروتئین را رمزدهی نمی‌کنند (مثل tRNAها و rRNA شرح داده شده در فصل ۴ و میکرو RNAهاکه پایداری mRNA و ترجمه را تنظیم می‌کنند و در فصل ۸ مورد بحث قرار می‌گیرند). چون DNAیی که tRNAها، rRNAها و میکرو RNAها را رمزدهی می‌کند در صورت جهش فنوتیپ‌های خاص را ایجاد می‌کند، این نواحی از DNA عموما به عنوان ژن‌های tRNA، rRNA و میکرو RNA هستند و محصولات نهایی این ژن‌ها پروتئین نبوده بلکه مولکول‌های RNA می‌باشند. در این قسمت، ما ساختار ژن‌ها در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها را مورد بررسی قرار داده و توضیح می‌دهیم چگونه ساختارهای ژنی مربوط به آنها می‌توانند بیان ژن و تکامل را تحت تاثیر قرا دهند.

اغلب ژن‌های یوکاریوتی دارای اینترون بوده و mRNAهایی را تولید می‌کنند که یک پروتئین را رمزدهی می‌کنند

همانطور که در فصل ۴ بحث شد، تعداد زیادی از mRNAهای باکتریایی (مثل mRNA رمزدهی شده توسط اپرون trp) دارای نواحی رمزدهی‌کننده برای چندین پروتئین هستند. این نواحی در فرآیندهای زیستی با هم عمل می‌کنند. به چنین mRNAهایی **پلی سیسترونیک**[1] گفته می‌شود. یک سیسترون واحد ژنتیکی رمزکننده یک پلی پپتید مجزا است. اغلب mRNAهای یوکاریوتی **مونوسیسترونیک**[2] هستند، یعنی هر مولکول mRNA یک پروتئین مجزا را رمزدهی می‌نماید. اختلاف بین mRNAهای پلی سیسترونیک و مونوسیسترونیک مربوط به تفاوت اساسی در ترجمه آنها است.

در یک mRNA پلی سیسترونیک باکتریایی، جایگاه اتصال ریبوزوم نزدیک جایگاه شروع هر یک از نواحی رمزدهی‌کننده پروتئین یا سیسترون‌ها، در mRNA قرار دارد. ترجمه می‌تواند در هر یک از این جایگاههای درونی چندگانه شروع شده و پروتئین‌های متعددی تولید نماید (شکل ۱۳a-۴ را ملاحظه کنید). در اغلب mRNAهای یوکاریوتی ساختار کلاهک ′۵ باعث اتصال به ریبوزوم شده و ترجمه از نزدیکترین کدون AUG شروع می‌شود. (شکل ۱۳b-۴). در نتیجه ترجمه تنها از این جایگاه شروع می‌شود. در موارد زیادی، رونوشت‌های اولیه ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین یوکاریوتی به نوع خاصی از mRNA پردازش یافته و این mRNA به یک پلی پپتید مجزا ترجمه می‌شود.

برخلاف ژن‌های باکتریایی و مخمر که عموماً فاقد اینترون هستند، اغلب ژن‌ها در جانوران پرسلولی و گیاهان اینترون دارند. اینترون‌ها در طی پردازش RNA در هسته حذف می‌شوند. در موارد زیادی اینترون‌ها در یک ژن بطور چشمگیری بزرگتر از اگزون‌ها هستند، اگرچه تعداد زیادی از اینترون‌ها حدود ۹۰ جفت باز طول دارند ولی طول متوسط اینترون در ژن‌های انسانی ۳/۳kb است. با وجود این برخی اینترون‌ها طویل‌تر هم هستند. طویل‌ترین اینترون انسانی شناخته شده در تیتان[3] دارای ۱۷۱۰۶ جفت باز است. تیتان ژن رمزدهی‌کننده یک پروتئین ساختاری در سلول‌های ماهیچه‌ای است. در مقایسه با اینترون‌ها، اغلب اگزون‌های انسان تنها دارای ۲۰۰-۲۰ جفت باز هستند. ژن انسانی که یک پروتئین با اندازه متوسط را رمزدهی می‌کند، تقریباً ۵۰۰۰۰ جفت باز طول دارد، اما بیش از ۹۵ درصد از توالی آن اینترون‌ها و نواحی غیررمزگردان ′۳ و ′۵ است.

تعداد زیادی از پروتئین‌ها در موجودات عالی دارای دُمین‌های تکراری هستند. این دُمین‌ها بوسیله تکرارهایی از اگزون‌های مشابه که توسط اینترون‌هایی با طول متغیر از هم جدا شده‌اند، از رمزدهی می‌شوند. یک نمونه از این پروتئین‌ها، فیبرونکتین است، این پروتئین جزئی از ماتریکس خارج سلولی است. ژن فیبرونکتین دارای نسخه‌های متعددی از پنج نوع اگزون است. (شکل ۱۶-۴ را ملاحظه کنید) که در شکل ۲a-۶ نشان داده شده است. چنین ژن‌هایی با مضاعف شدن پشت سرهم DNAیی که اگزون تکراری را رمزدهی می‌کند و احتمالا بوسیله کراسینگ آور نابرابر در طی میوز، تکامل یافته‌اند.

واحدهای رونویسی ساده و پیچیده در ژنوم‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند

دسته‌ای از ژن‌های تشکیل دهنده اپرون باکتری، دارای یک **واحد رونویسی**[4] مجزا بوده و این واحد رونویسی از پروموتر در توالی DNA تا جایگاه پایان، رونویسی شده و رونوشت اولیه را تولید

1- Polycistronic
2- Monocistronic
3- Titan
4-Transription unit

می‌کند. به عبارت دیگر، ژن‌ها و واحدهای رونویسی و اغلب در پروکاریوت‌ها قابل شناسایی هستند. چون یک واحد رونویسی مجزا دارای چندین ژن است، این ژن‌ها جزئی از یک اپرون هستند. در مقایسه با ژن‌های پروکاریوتی، اغلب ژن‌های یوکاریوتی از واحدهای رونویسی جداگانه، رونویسی شده و هر mRNA به یک پروتئین خاص ترجمه می‌شود. در نتیجه، واحدهای رونویسی یوکاریوتی با توجه به سرنوشت رونوشت اولیه به دو نوع تقسیم می‌شوند.

رونوشت اولیه از یک ***واحد رونویسی ساده***[1] ایجاد شده و به نوع خاصی از mRNA برای تولید یک پروتئین پردازش می‌شود. جهش در اگزون‌ها، اینترون و نواحی کنترل رونویسی، می‌تواند بیان پروتئین رمزدهی شده بوسیله یک واحد رونویسی ساده را تحت تاثیر قرار دهد (شکل ۳a-۶).

واحدهای رونویسی پیچیده در موجودات پرسلولی رایج هستند، در این واحدها رونوشت اولیه RNA با بیش از یک روش پردازش شده و منجر به تشکیل mRNAهای دارای اگزون‌های مختلف می‌شود. از این رو، هر mRNA متناوب مونوسیسترونی بوده و به یک پلی پپتید خاص ترجمه می‌شود. شروع ترجمه این mRNA از اولین AUG موجود در آن صورت می‌گیرد. همانطور که در شکل ۳b-۶ نشان داده شده است mRNAهای متعدد می‌توانند از یک رونوشت اولیه به سه طریق حاصل شوند.

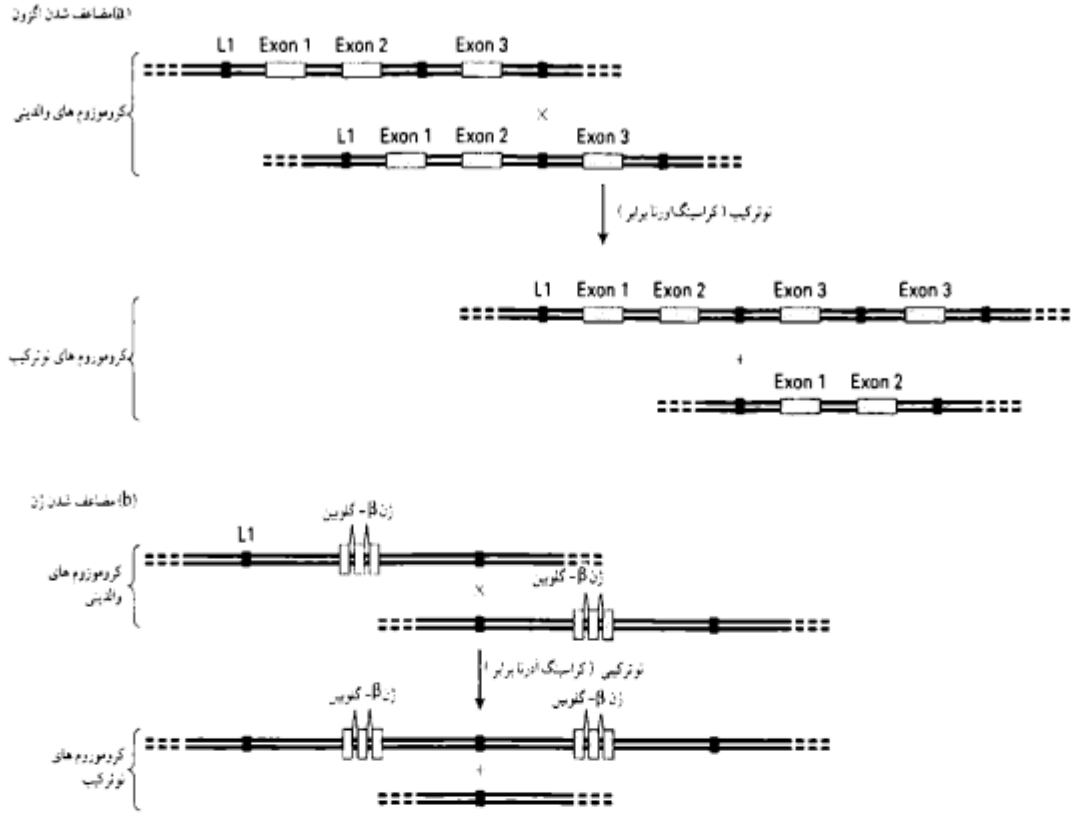
مثال‌هایی از هر سه نوع پردازش متناوب RNA در ژن‌هایی رخ می‌دهد که تمایز جنسی در دروزوفیلا را تنظیم می‌کند. (شکل ۱۶-۸ را ملاحظه کنید). در برخی سلول‌ها یک mRNA از یک واحد کمپلکس رونویسی و در سلول‌های دیگر نوع دیگری mRNA تولید می‌شود. برای مثال، پیرایش متناوب رونوشت اولیه فیبرونکتین و در فیبروبلاست‌ها و هپاتوسیت‌ها بود و نبود دمین‌های اتصال به سطوح سلولی را در پروتئین‌های ترشحی تعیین می‌کند. (شکل ۱۶-۴ را ملاحظه کنید). پدیده پیرایش متناوب به مقدار زیادی تعداد پروتئین‌های رمزدهی شده در ژنوم موجودات عالی را افزایش می‌دهد. تخمین زده می‌شود، تقریباً ۶۰ درصد ژن‌های انسان در داخل واحدهای کمپلکس رونویسی متحمل پیرایش متناوب mRNAها می‌شوند. این mRNAها، پیرایش یافته متناوب پروتئین‌هایی را رمزدهی می‌کنند که اعمال متفاوتی را انجام می‌دهند، مثلاً در مورد فرم‌های فیبروبلاست و هپاتوسیت از فیبرونکتین. رابطه میان یک ژن و یک جهش هنگامیکه در واحدهای رونویسی پیچیده می‌آید، همیشه مستقیم نیست. یک جهش در ناحیه کنترل یا در یک اگزون مشترک mRNAهای پیرایش یافته متناوب، روی پروتئین‌های متناوب رمزدهی شده از یک واحد رونویسی پیچیده، تاثیر خواهد گذاشت. به عبارت دیگر، جهش‌ها در یک اگزون که فقط در یکی از mRNAهای متناوب وجود دارد، فقط روی پروتئین رمزدهی شده بوسیله آن mRNA تاثیر خواهد گذاشت.

همانطور که در فصل ۵ توضیح داده شد، تست‌های **مکمل سازی ژنتیکی**[2] معمولاً برای اینکه آیا دو جهش در ژن‌های یکسان و یا متفاوت رخ داده است، مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۷-۵ را ملاحظه کنید). با وجود این، در واحد رونویسی پیچیده نشان داده شده در شکل ۳b-۶ (وسط)، جهش‌های d و e در یک تست مکمل سازی ژنتیکی با همدیگر مکمل هستند، حتی اگر آن جهش در یک ژن ایجاد شود. این موضوع به این دلیل است که یک کروموزوم با جهش d می‌تواند یک پروتئین رمزدهی‌شده بوسیله mRNA2 را بیان نماید و کروموزوم با جهش e پروتئین طبیعی را که توسط mRNA رمزدهی می‌شود، بیان کند. هر دو mRNA تولید شده از این ژن در یک سلول دیپلوئید که حاوی هر دو جهش است وجود داشته و هر دو محصول پروتئینی تولید شده و در نتیجه فنوتیپ وحشی را ایجاد می‌کنند. با وجود این، کروموزومی با جهش c در اگزون مشترک بین دو mRNA با هیچ یک از دو جهش e و d مکمل نخواهد بود. به عبارت دیگر، جهش c می‌تواند در گروههای مکمل مثل جهش d و e قرار بگیرد حتی اگر e و d خودشان در گروه مکمل یکسان قرار نگیرند! پیچیدگی‌های مذکور معمولاً همراه با تعریف ژنتیکی یک ژن و تعریف ژنومی خلاصه شده در شروع این قسمت معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مورد ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین، یک ژن، توالی DNA رونویسی شده بصورت پیش ساز یک پیش mRNA (برابر با یک واحد رونویسی) بعلاوه هر قطعه تنظیمی دیگر مورد نیاز برای سنتز رونوشت اولیه، می‌باشد. پروتئین‌های مختلف حاصل از mRNAهایی که بطور متناوب از یک ژن ایجاد شده‌اند، **ایزوفرم**[3] نامیده می‌شوند.

ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین ممکن است منفرد بوده و یا متعلق به یک خانواده ژنی باشند

توالی‌های نوکلئوتیدی در داخل DNA کروموزومی همانطور که در جدول ۱-۶ نشان داده شده، می‌توانند براساس ساختار و عملکرد دسته‌بندی شوند. ما با شروع از ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین (این کلاس از دو گروه تشکیل شده است) ویژگی‌های هر دسته را بررسی

1- Simple transcription unit
2- Genetic Complementation
3-Isoform



▲شکل ۲-۶-اگزون و مضاعف شدن ژن. (a) مضاعف شدن اگزون از کراسینگ آور نابرابر در طی میوز حاصل می‌شود. هر کروموزوم والدی حاوی یک ژن اجدادی با سه اگزون (شماره ۱ تا ۳) و دو اینترون است. توالی‌های تکراری L1 غیررمزگردان هومولوگ روی ′۵ یا ′۳ ژن و همچنین در اینترون میان اگزون ۲ و ۳ قرار دارند. همانطور که در قسمت ۳-۶ بحث شد، توالی‌های L1 در ژنوم طی تکامل انسان، بصورت تکراری به جایگاههای جدید منتقل شده‌اند، بطوریکه در نواحی زیادی از همه کروموزوم‌ها قرار گرفته‌اند. کروموزوم‌های والدی نشان داده شده نسبتا از هم جدا شده‌اند تا توالی‌های L1 در یک راستا قرار گیرند. همانطور که نشان داده شده است نوترکیبی هومولوگ میان توالی L1 تولید یک کروموزوم نوترکیب می‌کند که در آن ژن دارای ۴ اگزون است (دو نسخه از اگزون ۳) و در یک کروموزوم دیگر ژن،اگزون ۳ را از دست داده است. (b) کراسینگ آور نابرابر میان توالی L1 نیز می‌تواند منجر به مضاعف شدن تمام ژن‌ها شود. در این مثال، هر کروموزوم والدی حاوی یک ژن β-گلوبین اجدادی است و یکی از کروموزوم‌های نوترکیب حاوی دو ژن β-گلوبین مضاعف شده است. در پی آن جهش‌های مستقل در ژن‌های مضاعف می‌تواند منجر به تغییرات ناچیزی در توالی و در نتیجه در ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های رمزشده، گردد. کراسینگ آور نابرابر همچنین می‌تواند باعث ایجاد توالی‌های غیرمرتبط از نوترکیب‌های کمیاب شود. مقیاس در قسمت (b) خیلی بزرگتر از قسمت (a) است.

خواهیم کرد.

در موجودات پرسلولی، تقریباً ۵۰-۲۵ درصد از ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین تنها یکبار در ژنوم هاپلوئید ارائه می‌شوند و در نتیجه به **ژن‌های منفرد**[1] معروف هستند. یک مثال بخوبی مطالعه شده از ژن منفرد رمزدهی‌کننده پروتئین، ژن لیزوزیم جوجه است. توالی DNA ۱۵ کیلوبازی رمزدهی‌کننده لیزوزیم جوجه، واحد رونویسی ساده با چهار اگزون و سه اینترون تشکیل می‌دهد. نواحی دو طرف که تا ۲۰ کیلوباز از سمت فرادست و فرودست ناحیه رونویسی امتداد یافته‌اند، mRNAی مشخصی را رمزدهی نمی‌کنند. لیزوزیم، آنزیمی است که پلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها را تجزیه می‌کند. لیزوزیم، ترکیب فراوان در پروتئین سفیده تخم مرغ بوده و همچنین در اشک انسان نیز یافت می‌شود. فعالیت لیزوزیم به حفظ حالت استریل سطح چشم و تخم مرغ کمک می‌کند.

ژن‌های مضاعف شده، گروه دوم ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین را تشکیل می‌دهند. ژن‌هایی با توالی‌های مشابه اما غیریکسان وجود دارند که اغلب در ۵۰-۵ کیلوبازی همدیگر قرار گرفته‌اند. دسته‌ای از

1- Solitary genes

جدول ۱-۶ کلاس‌های اصلی DNA هسته‌ای یوکاریوتی و حضور آنها در ژنوم انسان

کلاس	طول	تعداد نسخه در ژنوم انسان	درصد از ژنوم انسان
ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین	۰/۵ ـ ۲۲۰۰kb	≈۲۵۰۰۰	≈۵۵* (۱/۸)†
ژن‌های تکراری بصورت تصادفی			
U_2RNA	۶/۱kb†	≈۲۰	<۰/۰۰۱
rRNAs	۴۳Kb†	≈۳۰۰	۰/۴
DNA تکراری			
DNA با توالی ساده	۱ـ۵۰۰bp	متغیر	≈۶
تکرارهای پراکنده (قطعات DNA متحرک)			
DNA ترانسپوزون‌ها	۲ـ۳kb	۳۰۰۰۰۰	۳
LTR رتروترانسپوزون‌ها	۶ـ۱۱kb	۴۴۰۰۰۰	۸
رتروترانسپوزون‌های غیر LTR			
LINEs	۶ـ۸kb	۸۶۰۰۰۰	۲۱
SINEs	۱۰۰ـ۴۰۰bp	۱۶۰۰۰۰۰	۱۳
ژن‌های کاذب پردازش شده	متغییر	۱ـ ≈ ۱۰۰	≈۰/۴
DNA بینابینی دسته‌بندی نشده§	متغییر	ناشناخته	≈۲۵

* واحد رونویسی کامل با اینترون‌ها

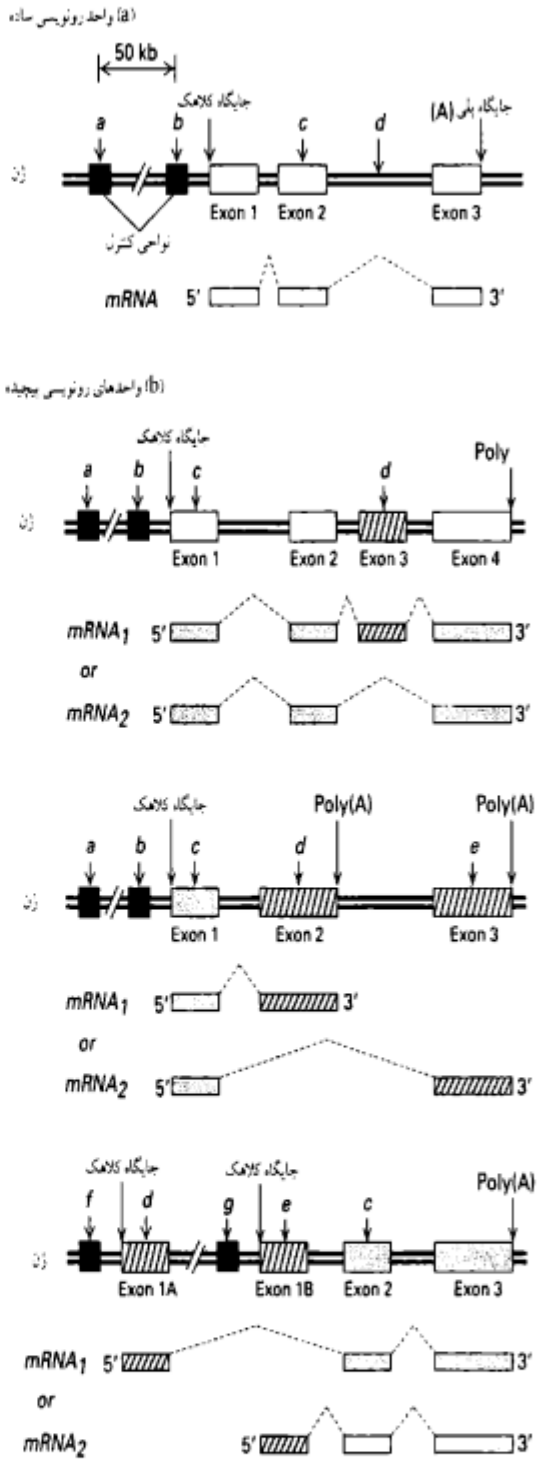
† واحدهای رونویسی بدون اینترون. نواحی رمزدهی کننده پروتئین (اگزون‌ها) ۱/۱٪ از کل ژنوم را تشکیل می‌دهند.

‡ طول توالی‌های تکراری پشت سرهم.

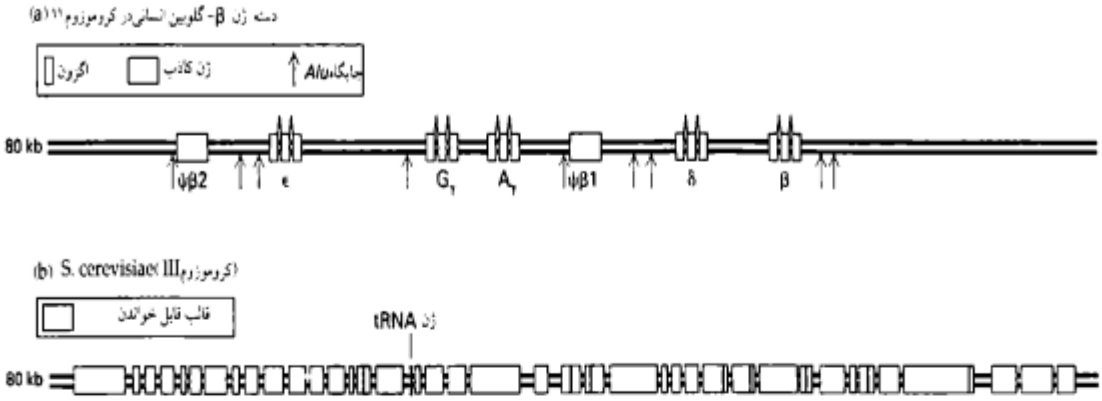
§ توالی‌های بین واحدهای رونویسی که در ژنوم تکرار نمی‌شوند.

ژن‌های مضاعف شده که پروتئین‌هایی با توالی‌های اسید آمینه‌ای مشابه اما غیریکسان را رمزدهی می‌نمایند، **خانواده ژنی**[1] نامیده می‌شوند. پروتئین‌های همولوگ رمزدهی شده هم دارای ارتباط نزدیک با هم، **خانواده پروتئینی**[2] تشکیل می‌دهند. تعدادی از خانواده‌های پروتئینی همچون پروتئین کینازها، ایمنوگلوبولین‌های مهره داران و گیرنده‌های بویایی، دارای صدها عضو می‌باشند. با این حال، اغلب خانواده‌های پروتئینی تنها تعدادی حدود ۳۰ عضو یا مقداری بیشتر را شامل می‌شوند. مثال رایج پروتئین‌های اسکلت سلولی، زنجیره سنگین میوزین و α و β گلوبین‌ها در مهره داران می‌باشند. ژن‌های رمزدهی‌کننده گلوبین شبه β مثال خوبی برای یک خانواده ژنی می‌باشد. همانطور که در شکل a ۴-۶ نشان داده شده است خانواده ژن گلوبولین‌های شبه β حاوی ۵ ژن عملکردی β، δ، $A\gamma$، $G\gamma$ و ε می‌باشد. پلی پپتیدهای رمزدهی شده و بطور مشابه علامتگذاری می‌شوند. دو پلی‌پپتید گلوبین شبه β یکسان، با دو پلی پپتید α گلوبین یکسان (رمزدهی شده بوسیله یک خانواده ژنی دیگر) و چهار گروه هم کوچک تلفیق شده و یک مولکول هموگلوبین را تشکیل می‌دهند. (شکل ۱۳-۳). همه هموگلوبین‌های متشکل از گلوبین‌های شبه β در خون اکسیژن را حمل می‌کنند. با این حال ویژگی‌های آنها تا اندازه‌ای متفاوت است که آنها را برای نقش‌های خاص در فیزیولوژی انسان مناسب می‌سازد. برای مثال، هموگلوبین‌های دارای پلی پپتیدهای $A\gamma$ یا $G\gamma$ تنها در طی حیات جنینی بیان می‌شوند. زیرا این هموگلوبین‌های جنینی نسبت به هموگلبین‌های فرد بالغ تمایل بالاتری به اکسیژن دارند، بنابراین بصورت موثر می‌توانند اکسیژن را از گردش خون مادری در جفت بگیرند. تمایل کمتر به اکسیژن در هموگلوبین‌های افراد بالغ که پس از تولد بیان می‌شوند، باعث رهاسازی بهتر اکسیژن به بافت‌ها (بویژه ماهیچه‌ها) می‌شوند. همانطور که می‌دانیم این بافت (ماهیچه) در حین ورزش نیاز شدیدی به اکسیژن دارد.

1- Gene familiy 2- Protein familiy



شکل ۳-۶- (شکل رنگی) واحدهای رونویسی یوکاریوتی پیچیده و ساده. a) یک واحد رونویسی ساده شامل ناحیه‌ای است که یک پروتئین را رمزدهی می‌نماید و از جایگاه کلاهک ′۵ تا جایگاه پلی A(′۳) امتداد داشته و با نواحی کنترل در ارتباط است. اینترون‌ها بین اگزون‌ها (مستطیل‌های آبی روشن) قرار گرفته و در حین پردازش رونوشت‌های اولیه (خطهای قرمز تیره) برداشته می‌شوند. در نتیجه، آنها در mRNA مونوسیسترونیک عملکردی دیده نمی‌شوند. جهش‌ها در یک ناحیه کنترل رونویسی (a,b) ممکن است رونویسی را کاهش داده و یا از آن جلوگیری کند، در نتیجه سنتز پروتئین کاهش یافته و یا از بین می‌رود. یک جهش در داخل اگزون (c) ممکن است باعث تولید یک پروتئین غیرطبیعی و بدون عملکرد شود. جهشی در اینترون (d) که یک جایگاه پیرایش جدید را ایجاد می‌کند باعث تولید mRNA پیرایش شده غیرطبیعی می‌شود که حاصل آن پروتئین غیرعملکردی است. (b) واحدهای رونویسی پیچیده، رونوشت‌های اولیه را تولید می‌کنند که این رونوشت‌ها در مسیرهای فرعی پردازش می‌شوند. (بالا) اگر یک رونوشت اولیه حاوی جایگاههای پیرایش متناوب باشد، می‌تواند بصورت mRNAهایی با اگزون‌های ′۳ و ′۵ مشابه اما اگزون‌های درونی مختلف پردازش شود. (وسط) اگر یک رونوشت اولیه دارای دو جایگاه پلی (A) باشد می‌تواند به صورت mRNAهایی با اگزون‌های ′۳ متناوب پردازش گردد. (پائین) اگر پروموترهای متناوب (f یا g) در انواع مختلف سلولی فعال باشند، پروموتر f باعث تولید $mRNA_1$ در یک نوع سلول می‌شود. mRNA در اگزون اول (1A) متفاوت از mRNA2 است. $mRNA_2$ در سلولی تولید می‌شود که در آن پروموتور g فعال می‌گردد (در اینجا اگزون 1B مورد استفاده قرار می‌گیرد). جهش‌ها در نواحی کنترل (a,b) و نواحی مشخص شده بصورت c در داخل اگزون‌ها، در تولید mRNAهای متناوب شرکت نموده و رمزدهی شدن پروتئین‌های حاصل از پردازش متناوب در این نواحی mRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهد. برعکس، جهش‌ها (مشخص شده بصورت a و d) در اگزون‌های مخصوص یکی از mRNAهای پیرایش شده بصورت متناوب، تنها پروتئین ترجمه شده از آن mRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهند. برای ژن‌هایی که در انواع مختلف سلول‌ها از پروموتورهای متفاوت رونویسی می‌شوند، جهش‌ها در نواحی کنترل مختلف (g,f) بیان را فقط در آن نوع سلولی تحت تاثیر قرار می‌دهند که ناحیه کنترل مرتبط فعال باشد.



▲ **شکل ۴-۶ (شکل رنگی) ساختار دسته ژنی β-گلوبین و مقایسه دانسیته ژنی در یوکاریوتی عالی و پست.** (a) در دیاگرام، دسته ژن β-گلوبین روی کروموزوم ۱۱ انسانی، جعبه‌های سبز نمایانگر اگزون‌های ژن‌های مربوط به β-گلوبین هستند. اگزون‌هایی که با هم برای تشکیل یک mRNA پیرایش می‌شوند، بوسیله خارهای کارت مانند جدا می‌شوند. ژن β-گلوبین انسانی دارای دو ژن کاذب (سفید) است. این نواحی مربوط به ژن‌های گلوبین عملکردی بوده، اما رونویسی نمی‌شوند. هر پیکان قرمز بیان‌گر موقعیت یک توالی Alu (توالی تکراری غیررمزگردان حدودا ۳۰۰ جفت بازی) می‌باشد که در ژنوم انسان فراوان است. (b) در دیاگرام DNA کروموزوم III در مخمر جعبه‌های سبز، قالب‌های قابل خواندن را نشان می‌دهند. اغلب توالی‌هایی که بطور بالقوه پروتئین رمزدهی می‌کنند، ژن‌های عملکردی بدون اینترون می‌باشند. به یاد داشته باشید که نسبت توالی‌های غیررمزگردان به رمزگردان در DNA انسان، از DNA مخمر خیلی بالاتر است.

ژن‌های β– گلوبین مختلف با مضاعف شدن یک ژن اجدادی و به احتمال زیاد بواسطه یک «کراسینگ آور نابرابر» حین نوترکیبی میوزی در تقسیم سلولی جنسی (اسپرم یا تخمک) بوجود می‌آیند (شکل b ۲-۶). طی دوره تکامل دو نسخه ژن وجود دارند که منجر به تجمع جهش‌های تصادفی شده‌اند: جهش‌های سودمند، باعث اصلاح در عملکرد حمل اکسیژن هموگلوبین شده و طی انتخاب طبیعی محفوظ مانده و منجر به **تغییر در توالی**[1] می‌گردند. تصور می‌شود مضاعف شدن‌های ژن تکراری و تغییر توالی در پی آن، ژن‌های شبه گلوبین امروزی موجود در انسان و سایر پستانداران امروزی را به وجود آورده‌اند.

دو ناحیه در دسته ژنی گلوبین شبه β حاوی توالی غیرعملکردی بنام **ژن‌های کاذب**[2] است وجود دارد که مشابه ژن‌های گلوبین شبه β عملکردی می‌باشد. (شکل a ۴-۶ را ملاحظه کنید). آنالیز توالی نشان می‌دهد این ژن‌های کاذب دارای ساختار اینترون – اگزون با ظاهری مشابه ژن‌های گلوبین شبه β دارای عملکرد می‌باشند و این بیانگر آن است که این ژن‌های کاذب نیز بوسیله مضاعف شدن همان ژن اجدادی حاصل شده‌اند، اما فشار انتخابی کمی برای حفظ عملکرد این ژن‌ها وجود داشته و در پی آن تغییر توالی در طی تکامل، توالی‌هایی را بوجود آورده که یا باعث خاتمه ترجمه شده و یا پردازش mRNA را بلوکه کرده و باعث غیرفعال شدن این نواحی شده است. به دلیل زیان‌آور نبودن این ژن‌های کاذب، آنها در ژنوم باقی مانده و موقعیت یک مضاعف شدگی ژنی را در یکی از اجدادمان نشان می‌دهند. مضاعف شدن‌های قطعه‌هایی از یک کروموزوم (مضاعف شدن قطعه‌ای نامیده می‌شود[3]) غالبا در طی تکامل گیاهان پرسلولی و حیوانات رخ داده است. به عنوان یک پیامد، بخش بزرگی از ژن‌ها در این موجودات، امروزه مضاعف شده و به فرآیند تغییر توالی امکان داده‌اند تا خانواده‌های ژنی و ژن‌های کاذب تولید کنند. میزان واگرایی توالی، میان نسخه‌های مضاعف شده ژنوم و تعیین ویژگی توالی‌های ژنوم همولوگ در موجودات مرتبط، امکان ارزیابی زمان وقوع مضاعف شدگی را می‌دهد. برای مثال، ژن‌های γ-گلوبین جنینی ($A\gamma$,$G\gamma$) بعد از مضاعف شدن ناحیه ۵/۵ کیلوبازی در موقعیت β-گلوبین، تکامل یافته‌اند. این موقعیت ژن منفرد γ-گلوبین را در جد مشترک نخستینیان کاترین[4] (میمون‌ها و انسان‌های دنیای قدیم) و نخستینیان پلاترین[5] (میمون‌های دنیای جدید) در حدود ۵۰ میلیون سال پیش شامل می‌شود.

1- Sequence drift
2- Pseudogenes
3- Segmental duplication
4- Coterrhine Primetes
5- Platyrrhine primates

گرچه اعضای خانواده‌های ژنی که در طی تکامل در دوره نسبتاً معاصری ایجاد شده‌اند، اغلب نزدیک هم و بر روی یک کروموزوم یکسان یافت می‌شوند، (مثل ژن‌های لوکوس β-گلوبین انسانی)، با وجود این اعضای خانواده‌های ژنی ممکن است بر روی کروموزوم‌های مختلف در یک موجود زنده نیز یافت شوند. ژن‌های α-گلوبین انسانی نمونه‌هایی هستند که با یک جابجایی کروموزومی قدیمی از ژن‌های β-گلوبین جداشده‌اند. هر دو ژن α و β-گلوبین با جداشدن از یک ژن گلوبین اجدادی و مضاعف شدن آن (شکل ۲b-۶ را ملاحظه کنید) جهت ایجاد صاحبان قدیمی ژن‌های β و γ-گلوبین امروزی در پستانداران، تکامل یافته‌اند. سپس هر دو ژن α و β-گلوبین اولیه برای ایجاد ژن‌های مختلف دسته‌های β و α-گلوبین موجود در پستانداران امروزی، دچار مضاعف شدن دیگری شده‌اند. چند خانواده ژنی مختلف، پروتئین‌های گوناگونی اسکلت سلولی را رمزدهی می‌کنند. این پروتئین‌ها به میزان متفاوت، تقریباً در همه سلول‌ها وجود دارند. در مهره داران، پروتئین‌های اصلی اسکلت سلولی، یعنی اکتین‌ها، توبولین‌ها و پروتئین‌های رشته‌ای حدواسط مثل کراتین‌ها هستند که در فصل‌های ۱۷، ۱۸ و ۱۹ مورد بحث قرار خواهند گرفت. ما منشا یک چنین خانواده‌ای مثل خانواده توبولین را در قسمت ۵-۶ مورد بررسی قرار می‌دهیم. گرچه منطق فیزیولوژیکی برای خانواده‌های پروتئینی اسکلت سلولی به روشنی گلوبین‌ها نیست، اما در این خانواده‌ها اعضای مختلف یک خانواده احتمالا دارای عملکردهای مشابه با تفاوت‌های خیلی ظریف بوده و برای انواع مختلف سلول‌هایی که در آن‌ها بیان می‌شوند مناسب هستند.

محصولات ژنی پرمصرف بوسیله نسخه‌های متعددی از ژن‌ها رمزدهی می‌شوند

در مهره داران و بی مهرگان، ژن‌هایی که RNAهای ریبوزومی و برخی RNAهای رمزدهی‌کننده غیرپروتئینی دیگر را رمزدهی می‌کنند (مثل RNAهای درگیر در پیرایش RNA) بصورت آرایش‌های تکراری پشت سرهم[1] وجود دارند. این ژن‌ها از ژن‌های مضاعف شده خانواده‌های ژنی که در آن‌ها، ژن‌های تکراری پشت سرهم چندگانه، پروتئین‌های مشابه یا یکسان و یا RNAهای عملکردی را رمزدهی می‌کنند، قابل تشخیص هستند. در اکثر موارد، نسخه‌های یک توالی، یکی پس از دیگری و به صورت سر به دم بر روی رشته DNA ظاهر می‌شوند. در داخل یک آرایش پشت سرهم، ژن‌های rRNA یا هر نسخه تا اندازه زیادی شبیه نسخه‌های دیگر است. اگرچه بخش‌های رونویسی شده از ژن‌های rRNA در یک فرد یکسان هستند ولی نواحی میانی غیرقابل رونویسی که در بین نواحی رونویسی شونده قرار دارند، می‌توانند متغیر باشند.

این ژن‌های DNA پشت سرهم و تکراری برای مرتفع کردن نیاز شدید سلولی به رونوشت‌های آنها، لازم می‌باشند. برای درک مطلب، در نظر بگیرید اگر ژن بطور کامل با RNA پلیمراز پرشود، مقدار مشخصی RNA طی ایجاد سلول، تولید می‌شود. پس اگر نیاز به RNA به قدری زیاد باشد که رونویسی از یک ژن کافی نباشد، ایجاد نسخه‌های چندگانه از ژن ضروری به نظر می‌رسد. به عنوان مثال، در طی تکامل اولیه جنینی در انسان، تعداد زیادی از سلول‌های جنینی طی ۲۴ ساعت تقسیم می‌شوند این سلول‌ها حاوی ۵ تا ۱۰ میلیون ریبوزوم هستند. برای تولید rRNA کافی جهت تشکیل این میزان زیاد ریبوزوم، یک سلول جنینی انسانی لااقل به ۱۰۰ نسخه از ژن‌های rRNA زیرواحدهای کوچک و بزرگ نیاز دارد و اغلب این ژن‌ها باید در حداکثر فعالیت خود باشند تا سلول جنینی بتواند هر ۲۴ ساعت تقسیم شود. یعنی چندین RNA پلیمراز بایستی در آن واحد از ژن‌های rRNA رونویسی نمایند (شکل ۳۳-۸ را ملاحظه کنید). البته، همه یوکاریوتها، مثل مخمرها حاوی ۱۰۰ نسخه و یا بیشتر از ژن‌های رمزدهی‌کننده rRNAهای زیرواحدهای کوچک و بزرگ و 5SrRNA هستند.

چندین نسخه از ژن‌های tRNA و ژن‌هایی که پروتئین‌های هیستونی را رمزدهی می‌کنند، نیز وجود دارند. همانطور که بعدا در این فصل خواهیم دید، هیستون‌ها به DNA هسته‌ای متصل و آن را سازمان دهی می‌نمایند. همانطور که سلول به چندین ژن rRNA و tRNA برای حمایت از ترجمه کارآمد نیاز دارد، چندین نسخه از ژن‌های هیستونی برای تولید کافی پروتئین هیستونی مورد نیاز است تا به مقدار زیادی از DNA هسته‌ای متصل شوند. در حالیکه ژن‌های tRNA و هیستون اغلب بصورت دسته‌هایی وجود دارند، آنها عموماً در ژنوم انسان بصورت پشت سرهم آرایش نمی‌یابند.

ژن‌های رمزدهی‌کننده غیرپروتئینی، RNAهای عملکردی را رمزدهی می‌نمایند

علاوه برژن‌های rRNA و tRNA، صدها ژن دیگر وجود دارند که بصورت RNAهای رمزدهی‌کننده غیرپروتئینی رونویسی می‌شوند که برخی از آن‌ها دارای فعالیت‌های مشخص می‌باشند و تعداد زیادی از آنها، فعالیت‌شان تاکنون مشخص نشده است. برای مثال،

1-Tandem repeated arrays

RNAهای کوچک هسته‌ای[1] یا snRNAsها در پیرایش RNA و **RNAهای کوچک هستکی**[2] یا **snoRNA**ها در پردازش rRNA و تغییرات بازی در هستک فعالیت دارند. RNA در RNaseP در پردازش tRNA نقش دارد و خانواده بزرگی (حدودا ۱۰۰۰ عضو) از **میکرو RNAهای**[3] کوتاه (miRNA)، پایداری و ترجمه mRNAهای خاص را تنظیم می‌کنند. عملکردهای این RNAهای رمزدهی‌کننده غیرپروتئین در فصل ۸ مورد بررسی قرار می‌گیرد. یک RNA یافت شده در تلومراز (فصل ۴) در حفظ توالی در پایانه‌های کروموزوم‌ها نقش دارد و 7SL RNA در ورود پروتئین‌های ترشحی و اغلب پروتئین‌های غشایی به داخل شبکه آندوپلاسمی (فصل ۱۳) فعالیت دارد. این RNAها و RNAهای رمزدهی‌کننده غیرپروتئینی دیگر که در ژنوم انسان رمزدهی می‌شوند و فعالیت آنها چنانچه شناخته شده باشد، در جدول ۲-۶ آمده است.

نکات کلیدی بخش ۱ - ۶

ساختار ژن یوکاریوتی

- از دید مولکولی، یک ژن توالی کاملی از DNA بوده و برای سنتز یک پروتئین عملکردی یا مولکول RNA لازم می‌باشد. علاوه بر نواحی رمزدهی کننده (اگزون‌ها)، یک ژن نواحی کنترل و گاهی اینترون‌ها را شامل می‌شود.
- یک واحد رونویسی ساده یوکاریوتی تولید mRNA مونوسیسترونی منفرد می‌کند که بصورت یک پروتئین خاص ترجمه می‌گردد.
- یک واحد رونویسی پیچیده یوکاریوتی بصورت یک رونوشت اولیه رونویسی می‌گردد. این رونوشت می‌تواند بسته به انتخاب جایگاه پیرایش و یا جایگاه پلی آدنیلاسیون به دو یا چند mRNA مونوسیسترونیک پردازش گردد. یک واحد رونویسی پیچیده با پروتونرهای متناوب نیز می‌تواند دو یا چند mRNA متفاوت را بوجود آورد.
- تعداد زیادی از واحدهای رونویسی پیچیده (مثل ژن فیبرونکتین) در یک نوع سلول یک mRNA و در یک نوع سلول دیگر، یک mRNA دیگری را بیان می‌کنند.
- تقریباً نیمی از ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین در DNA ژنومی مهره داران، ژن‌های انفرادی یا منفرد هستند که هر یک تنها یکبار در ژنوم هاپلوئید وجود دارند. بقیه، ژن‌های مضاعف شده هستند که از مضاعف شدن یک ژن اجدادی و جهش‌های مستقل پی در پی حاصل شده‌اند. (شکل ۲b-۶ را ملاحظه کنید). پروتئین‌های رمزدهی شده بوسیله یک خانواده ژنی دارای توالی‌های اسید آمینه‌ای همولوگ اما غیر یکسان هستند که ویژگی‌های مشابه ولی اندکی متفاوت را نشان می‌دهند.
- در بی‌مهرگان و مهره‌داران، RNAها بوسیله نسخه‌های متعددی از ژن‌ها رمزدهی می‌شوند که در آرایش‌های پشت سرهم در DNA ژنومی قرار می‌گیرند. نسخه‌های متعددی از ژن‌های tRNA و هیستون نیز وجود دارند (اغلب بصورت دسته‌ها) اما عموماً بصورت آرایش‌های پشت سر هم نیستند.
- بیشتر ژن‌ها، RNAهای عملکردی را رمزدهی می‌کنند که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند اما اعمال مهمی را انجام می‌دهند. از این RNAها می‌توان به rRNA و sRNA اشاره کرد. از بین RNAها میکرو RNAها دارای اهمیت زیستی در تنظیم بیان ژن بوده و اخیراً مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

۶-۲ سازمان دهی کروموزومی ژن‌ها و DNA غیر رمزگردان

با مرور رابطه میان واحدهای رونویسی و ژن‌ها، حالا ما سازمان دهی ژن‌ها روی کروموزوم‌ها و رابطه توالی‌های DNA غیررمزگردان با توالی‌های رمزگردان را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

ژنوم تعداد زیادی از موجودات زنده به مقدار زیادی DNA غیرعملکردی دارند

مقایسه DNA کل کروموزوم تام در هر سلول در گونه‌های مختلف، اولین بار پیشنهاد کرد که این مقدار زیاد DNA در موجودات خاص RNA را رمزدهی نمی‌کند یا دارای هیچ فعالیت تنظیمی بارزی نمی‌باشد. برای مثال، مخمرها، مگس‌های سرکه، جوجه‌ها و انسان در کروموزوم‌های هاپلوئید خود دارای DNA زیادی می‌باشند (به ترتیب ۱۲؛ ۱۸۰؛ ۱۳۰۰؛ و ۳۳۰۰ میلیون باز) که این موضوع با پیچیدگی این موجودات نیز همخوانی دارد. تا به امروز در مهره داران، بیشترین میزان DNA در هر سلول مربوط به دوزیستان است که مطمئناً نسبت به انسان دارای پیچیدگی کمتری در ساختار و عمل می‌باشند و جالب‌تر اینکه، گونه پروتوزوآی تک سلولی *Amoeba dubia* ۲۰۰ برابر انسان در هر سلول خود DNA دارد.

1- Small nuclear RNAs
2- Small nuclear RNAs
3- MicroRNAs

جدول ۲-۶ RNAها رمزگردان غیرپروتئین شناخته شده و عملکرد آنها

RNA	تعداد ژن‌ها در ژنوم انسان	عملکرد
rRNAs	≈۳۰۰	سنتز پروتئین
tRNAs	≈۵۰۰	سنتز پروتئین
SnRNAs	≈۸۰	پیرایش mRNA
U7SnRNA	1	پردازش ´۳ mRNA هیستون
SnoRNAs	≈۸۵	تغییر rRNA و پردازش rRNA اولیه
miRNAs	≈۱۰۰۰	تنظیم بیان ژن
Xist	۱	غیرفعال شدن کروموزوم X
7SK	۱	کنترل رونویسی
RNAseP	۱	پردازش ´۵ tRNA
7SL RNA	۳	ترشح پروتئین (ترکیبی از ذره شناسایی نشانه، SRP)
RNAseMRP	۱	پردازش rRNA
RNA تلومراز	۱	الگو برای افزایش تلومرها
Vault RNAs	۳	اجزای ریبونوکلئوپروتئین (Vault (RNAs، عملکرد ناشناخته
hY1, hY3, hY4 , hY5	≈۳۰	اجزای ریبونوکلئوپروتئین‌های (Ro (RNPs، عملکرد ناشناخته
H19	۱	ناشناخته

تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی نیز به مقدار قابل ملاحظه‌ای DNAی بیشتر نسبت به انسان دارند. برای مثال گل لاله در هر سلول خود ۲۰ برابر سلول انسانی، DNA دارد. محتوای DNA در هر سلول تا حد زیادی نیز میان گونه‌های شبیه هم، متغیر می‌باشد. به نظر می‌رسد همه حشرات یا همه دوزیستان تا حد زیادی شبیه هم باشند اما میزان DNA هاپلوئید در گونه و در داخل هر یک از این دسته‌های فیلوژنتیک (تکاملی) بصورت مضربی از ۱۰۰ تغییر می‌کند.

تعیین توالی دقیق و شناسایی اگزون‌ها در DNA کروموزومی شواهد مستقیمی فراهم آورده که نشان می‌دهد ژنوم‌های یوکاریوتهای عالی حاوی مقادیر زیادی از DNA غیررمزگردان هستند. برای مثال، تنها یک بخش کوچکی از دسته ژن β-گلوبین در انسان با طول حدود ۸۰ کیلوباز، پروتئین رمزدهی می‌کند (شکل ۴-۶ a را ملاحظه کنید). در عوض، یک قطعه ۸۰ کیلوبازی DNA از مخمر ساکارومایسیس سرویزیه (یک یوکاریوت تک سلولی)، دارای تعداد زیادی توالی‌های رمزدهی‌کننده پروتئین نزدیک و بدون اینترون بوده و که مقدار DNA غیررمزگردان نیز در آن خیلی کم است. (شکل ۴-۶ b را ملاحظه کنید). علاوه بر این، در مقایسه با نواحی دیگر DNA مهره داران، دسته ژن β-گلوبین بصورت غیرمعمول غنی از توالی‌های رمزدهی‌کننده پروتئین بوده و اینترون‌ها در ژن‌های گلوبین خیلی کوچکتر از اینترون‌ها در مقایسه با تعداد زیادی از ژن‌های انسانی می‌باشند.

دانسیته ژن‌ها شدیدا در نواحی مختلف DNA کروموزومی انسان، از نواحی **غنی از ژن**[1] مثل دسته β-گلوبین گرفته تا نواحی **عاری از ژن**[2]، متغیر می‌باشد. در حدود ۹۶ درصد از DNA ژنومی انسان که تعیین توالی شده، تنها ۱/۵ درصد آن با توالی‌های رمزدهی‌کننده پروتئین (اگزون‌ها) مطابقت دارد. ما در قسمت قبلی آموختیم، توالی‌های اینترون در ژن‌ها، اغلب خیلی بزرگتر از توالی‌های اگزون می‌باشند. تقریباً یک سوم DNA ژنومی انسان گمان می‌رود بصورت mRNA اولیه یا RNA رمزدهی‌کننده غیرپروتئینی در یک سلول

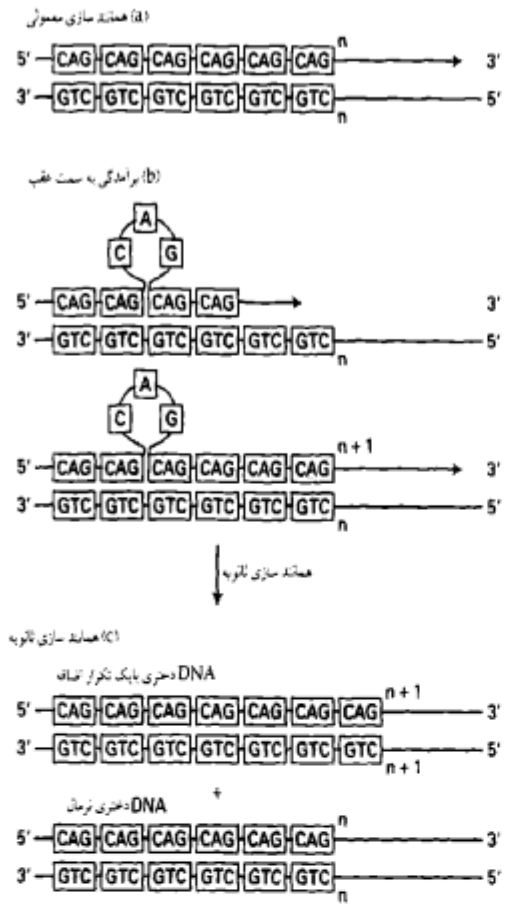
1- Generich 2- Generich

رونویسی شود اما حدود ۹۵ درصد این توالی، اینترون بوده و در نتیجه بوسیله پیرایش RNA برداشته می‌شود. این موضوع، مقدار بزرگی از کل ژنوم را شامل می‌شود. دو سوم بقیه DNA انسان، DNAی غیررمزگردان میان ژن‌ها و همچنین نواحی از توالی‌های DNA تکراری می‌باشند که سانترومرها و تلومرهای کروموزوم‌های انسانی را تشکیل می‌دهند. در نتیجه در حدود ۹۸/۵ درصد از DNA انسان غیررمزگردان است.

فشارهای انتخابی مختلف در طی تکامل ممکن است یکی از دلایل تفاوت چشمگیر در میزان DNA غیرعملکردی در موجودات تک سلولی و پرسلولی باشد. به عنوان مثال میکروارگانیسم‌ها باید برای مقدار محدودی از مواد غذایی در محیطشان رقابت کنند، در نتیجه اقتصاد متابولیکی برای آنها یک ویژگی حیاتی می‌باشد. چون سنتز DNA غیرعملکردی (مثل DNA غیررمزگردان) نیاز به زمان، ماده غذایی و انرژی دارد، احتمالا فشار انتخابی در اینجا باعث از دست رفتن DNA غیرعملکردی در طی تکامل میکروارگانیسم‌ها شده است. به عبارت دیگر، انتخاب طبیعی در مهره داران به میزان زیادی به رفتار آنها وابسته است. انرژی صرف شده در سنتز DNA در مقایسه با انرژی متابولیسمی لازم برای حرکت ماهیچه‌ها، ناچیز است در نتیجه فشار انتخابی کمی برای حذف DNA غیررمزگردان در مهره‌داران وجود داشته است.

اغلب DNAهای با توالی ساده در موقعیت‌های کروموزومی خاص متمرکز شده‌اند

در کنار ژن‌های مضاعف شده رمزدهی‌کننده پروتئین و ژن‌های تکراری پشت سرهم، سلول‌های یوکاریوتی حاوی نسخه‌های متعددی از سایر توالی‌های DNA در ژنوم هستند که عموماً به عنوان DNA تکراری در نظر گرفته می‌شوند. (جدول ۱-۶ را ملاحظه کنید). از دو نوع اصلی DNA تکراری، فراوانی DNA **با توالی ساده**[1] یا DNA **ماهواره‌ای**[2] کمتر است و حدود ۶ درصد از ژنوم انسان را شامل شده و از تکرارهای کامل یا تقریباً کاملی از توالی‌های نسبتا کوتاه تشکیل می‌شود. نوع رایج‌تر DNA تکراری که در مجموع **تکرارهای پراکنده**[3] نامیده می‌شود. از توالی‌های خیلی بزرگتری درست می‌شوند. این توالی‌ها، که چندین نوع عنصر **قابل انتقال**[4] را شامل می‌شوند، در قسمت ۳-۶ مورد بحث قرار می‌گیرند. طول هر تکرار در DNA با توالی ساده می‌تواند از ۱ تا ۵۰۰ جفت باز متغیر باشد. DNAهای با توالی ساده که در آنها تکرارهای حاوی ۱ تا ۱۳ جفت باز می‌باشند، اغلب **ریزماهواره**[5] نامیده می‌شوند. اغلب



▲ **شکل ۵-۶ پیدایش تکرارهای ریزماهواره بوسیله کاهش رو به عقب رشته دختر در حال تشکیل طی همانندسازی DNA** . اگر در حین همانندسازی (a)، رشته دختری در حال تشکیل نسبت به رشته الگو در حدود یک تکرار به عقب برگردد، با ادامه همانندسازی DNA، یک نسخه جدید از تکرار به رشته دختری افزوده می‌شود. (b) این نسخه اضافی از تکرار یک حلقه تک رشته را در مولکول DNA دورشته‌ای دختری تشکیل می‌دهد. اگر این حلقه تک رشته‌ای بوسیله پروتئین‌های ترمیم DNA قبل از دور بعدی همانندسازی برداشته نشود. (c)، نسخه اضافی از تکرار، به یکی از مولکول‌های DNA دورشته‌ای دختری اضافه شده و مولکول دیگر دختری، طبیعی خواهد بود.

DNA ریزماهواره دارای تکرارهایی با طول حدود ۱ تا ۴ جفت باز بوده و معمولاً در تکرارهای پشت سرهم از ۱۵۰ تکرار و یا کمتر تشکیل شده‌اند.

1- Simple-sequence DNA
2- Simple-sequence DNA
3- Interspersed repeus
4- Transposable elements
5- Microsatellite

ریزماهواره‌ها گهگاهی در واحدهای رونویسی دیده می‌شوند. برخی افراد با تعداد زیادی تکرار در ژن‌های خاص نسبت به عامه مردم متولد می‌شوند، این امر احتمالا به دلیل کاهش طول رشته خواهری در حین همانندسازی DNA در یک سلول جنسی است که این سلول‌ها از آن DNAها بوجود آمده‌اند. مشخص شده چنین ریزماهواره‌های گسترده حداقل ۱۴ نوع بیماری ماهیچه‌ای عصبی مختلف برحسب ژن موجود در آن‌ها ایجاد می‌کند. در بعضی موارد، ریزماهواره‌های گسترده مانند یک جهش مغلوب عمل می‌کنند چون آنها در عمل و بیان ژن رمزدهی شده تداخل ایجاد می‌کنند. اما در انواع رایج‌تر بیماریهای مربوط به تکرارهای گسترده ریزماهواره‌ای همچون دیستروفی میتونیک و اسپینوسربلار آتاکسیا[1]، تکرارهای گسترده مانند جهش‌های غالب عمل می‌کنند چون آنها در پردازش همه RNAها در سلول‌های ماهیچه و نورونها تداخل ایجاد کرده و بیان ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. برای مثال، در بیماران با دیستروفی میتونیک، رونوشت‌های ژن DMPK حاوی ۱۰۰ تا ۴۰۰ نسخه تکراری از توالی CUG در ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ هستند، در حالیکه تعداد این تکرارها در افراد طبیعی بین ۵۰ تا ۱۰۰ تکرار است. قطعات امتداد یافته از تکرارهای CUG در افراد بیمار، سنجاق سرهای طویلی از RNA تشکیل می‌دهند (شکل ۹-۴ را ملاحظه کنید) که با پردازش طبیعی RNA و خروج رونوشت‌ها از هسته به سیتوزول تداخل ایجاد می‌کنند. نواحی دورشته‌ای از این سنجاق سرهای طویل RNA به پروتئین‌های هسته‌ای متصل شونده به RNA دورشته‌ای، متصل شده و این امر باعث تداخل در عمل طبیعی این پروتئین‌ها در تنظیم پیرایش متناوب mRNAهای اولیه خاص دیگر می‌شود. این mRNAهای اولیه برای عملکرد طبیعی سلول ماهیچه و عصبی لازم هستند.

اغلب DNA ماهواره‌ای از تکرارهای ۱۴ تا ۵۰۰ جفت بازی بصورت آرایش‌های پشت سرهم ۱۰۰-۲۰ کیلوبازی تشکیل شده‌اند. مطالعات هیبریداسیون درجا[2] با کروموزوم‌های متافاز موقعیت این DNAهای با توالی ساده را در نواحی کروموزومی خاص نشان داده است. این DNA بیشتر نزدیک سانترومرها قرار می‌گیرد. سانترومرها نواحی کروموزومی مجزا بوده و در طی میتوز و میوز به میکروتوبول‌های دوک متصل می‌شوند. (شکل ۶-۶). آزمایشات در مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسس پمبه بیان می‌کنند، این توالی‌ها برای تشکیل یک ساختار کروماتینی خاص بنام هتروکروماتین سانترومری[3] لازم می‌باشند. این ساختار برای تفکیک درست کروموزوم‌ها به سلول‌های دختری در طی میتوز ضروری است. DNA با توالی ساده همچنین در تکرارهای طولی پشت سرهم در انتهاهای کروموزوم‌ها و تلومرها یافت می‌شود. در آنجا، آنها در حفظ انتهاهای کروموزومی نقش داشته و از اتصال آنها به انتهای مولکول‌های DNA دیگر جلوگیری می‌کنند. این مطالب بطور مفصل در آخرین قسمت از این فصل مورد بحث قرار می‌گیرند.

انگشت نگاری DNA به اختلافات طولی DNAهای با توالی ساده وابسته است

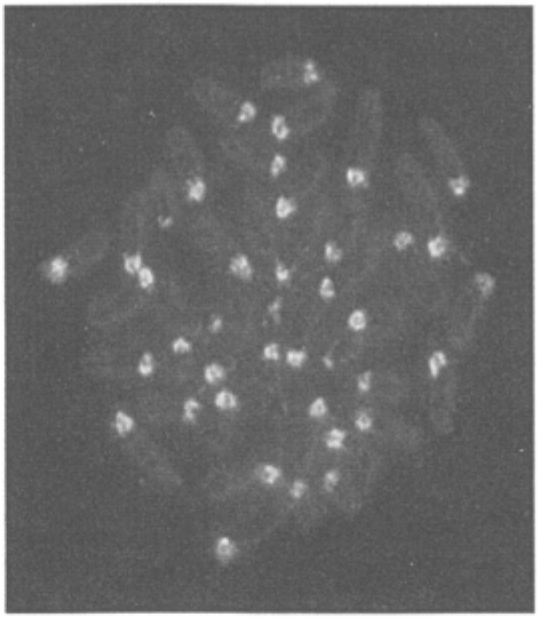
در یک گونه، توالی‌های نوکلئوتیدی واحدهای تکراری که آرایش پشت سرهم DNA با توالی ساده را تشکیل می‌دهند، شدیدا در میان افراد حفاظت شده‌اند. برعکس، تعداد تکرارها و در نتیجه طول آرایش‌های پشت سرهم توالی ساده حاوی واحد تکراری یکسان، کاملا در میان افراد متغیر هستند. این اختلافات در طول، گمان می‌رود در اثر کراسینگ آور نابرابر در نواحی DNA با توالی ساده، در حین میوز ایجاد شده باشند. در نتیجه این کراسینگ آور نابرابر، طول برخی از آرایش‌های پشت سرهم فرد، منحصر به فرد می‌باشند.

در انسان‌ها و پستانداران دیگر، یک سری DNA با توالی ساده در نواحی کوتاهی بین ۱ تا ۵ کیلو باز وجود دارند و از ۲۰ تا ۵۰ واحد تکراری درست شده‌اند که هر یک حاوی ۱۴ تا ۱۰۰ جفت باز می‌باشند. این نواحی **مینی ماهواره**[4] نامیده می‌شوند. حتی اختلاف اندک در طول کامل مینی ماهواره‌ها در افراد مختلف را می‌توان بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از پرایمرهایی که با توالی‌های منحصر به فرد در طرفین مینی ماهواره‌های متعدد هیبرید می‌شوند، تشخیص داد. این پلی مورفیسم‌های DNA (یعنی اختلافات در توالی بین افراد یک گونه)، اساس انگشت نگاری DNA را تشکیل داده و نسبت به انگشت نگاری معمول روش بهتری برای تعیین هویت افراد است (شکل ۷-۶). استفاده از روش‌های PCR، آنالیز مقادیر اندکی از DNA را ممکن ساخته، به طوریکه افراد خیلی دقیق‌تر و مطمئن‌تر از انگشت نگاری معمول، تشخیص داده می‌شوند.

DNA جداکننده دسته بندی نشده، قسمت قابل توجهی از ژنوم را اشغال می‌کند

همانطور که جدول ۱-۶ نشان می‌دهد، تقریباً ۲۵ درصد از DNA

1- Spinocerebellar ataxia
2- In situ hybridization
3- Centreneric heterochromatin
4- Minisatellite



▲ **شکل تجربی ۶-۶ (شکل رنگی) DNA با توالی ساده در کروموزوم‌های موش در سانترومر قرار گرفته است.** DNA با توالی ساده تخلیص شده از سلول‌های موش، در آزمایشگاه بوسیله DNA پلیمراز E.Coli I و dNTPهای نشاندار فلورسانت کپی شد تا یک پروب DNA نشاندار فلورسنت برای DNA با توالی ساده موش تولید نماید. کروموزوم‌ها از سلول‌های کشت داده شده موش بر روی یک اسلاید میکروسکوپی فیکس و دناتوره شدند و سپس DNA کروموزومی بصورت درجا با پروب نشاندار (آبی - سبز) هیبرید شد. اسلاید نیز با DAPI (یک رنگ متصل شونده به DNA) رنگ‌آمیزی شد تا طول کامل کروموزوم مشاهده شود (آبی تیره). میکروسکوپ فلورسنت نشان می‌دهد که پروب توالی ساده اساسا با یک انتها از کروموزوم‌های تلوسنتریک موش هیبرید می‌شود (کروموزوم‌های تلوسنتریک دارای سانترومر در یک انتها یا نزدیک به انتها می‌باشند).

انسانی میان واحدهای رونویسی قرار داشته و هیچ جای دیگری در ژنوم تکرار نمی‌شود. بیشتر این DNA احتمالا از عناصر قابل انتقال باستانی منشا می‌گیرند که جهش‌های زیادی را در طی تکامل انباشته‌اند. بصورتیکه تا مدت زیادی نمی‌توانستند تشخیص بدهند که از این منبع حاصل شده‌اند. (قسمت ۳-۶).

نواحی کنترل رونویسی با طولی حدود ۵۰ تا ۲۰۰ جفت باز که به تنظیم رونویسی از پروموترهای دور کمک می‌کنند نیز در این قطعات بلند از DNA جداکننده دسته بندی نشده، وجود دارند. در برخی موارد، توالی‌هایی از این DNA به ظاهر غیرعملکردی، در طی تکامل حفظ شده‌اند و بیان می‌کنند احتمالا این نواحی عملکرد مهمی دارند که شناخته نشده‌اند. برای مثال، آنها ممکن است در ساختارهای کروموزومی مورد بحث در قسمت ۷-۶ سهیم باشند.

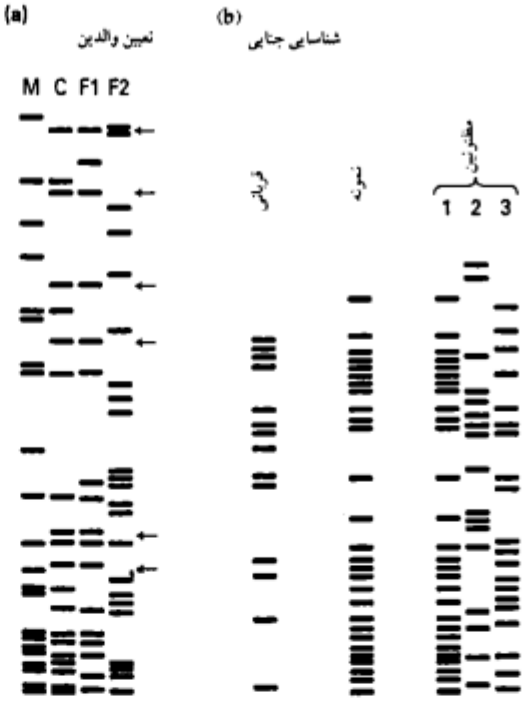
نکات کلیدی بخش ۲ - ۶

سازمان‌دهی کروموزومی ژن‌ها و DNA غیر رمزگردان

- در ژنوم‌های پروکاریوتی و اغلب یوکاریوت‌های پست، که دارای توالی‌های غیر عملکردی هستند، و نواحی رمزدهی کننده بصورت فشرده، در طول DNA ژنومی آرایش یافته‌اند.
- در مقابل، ژنوم‌های مهره‌داران و ژنوم‌های گیاهان عالی حاوی توالی‌های زیادی هستند که RNAای رمزدهی نکرده و یا هیچ فعالیت تنظیمی ندارند. بیشتری این DNAهای غیرعملکردی از توالی‌های تکراری تشکیل شده‌اند. در انسان، تنها در حدود ۱/۵ درصد از کل DNA (اگزون‌ها)، پروتئین‌ها یا RNAهای عملکردی را رمزدهی می‌کنند.
- گوناگونی در مقدار DNA غیر عملکردی در ژنوم‌های گونه‌های مختلف، به مقدار زیادی مسئول نبود رابطه ثابت بین میزان DNA در کروموزوم‌های هاپلوئید یک حیوان یا گیاه و با پیچیدگی تکاملی آنها می‌باشد.
- DNA ژنومی یوکاریوتی از سه دسته توالی اصلی تشکیل شده‌اند: ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین‌ها و RNA عملکردی، DNA تکراری و DNA جداکننده (جدول ۱-۶ را ملاحظه کنید).
- DNA با توالی ساده، توالی‌های کوتاه تکراری با آرایش‌های پشت سرهم طویل بوده و اغلب در سانترومرها، تلومرها و موقعیت‌های خاصی در بازوهای کروموزوم‌های خاص قرار گرفته است.
- طول یک آرایش پشت سرهم توالی ساده خاص، میان افراد یک گونه کاملاً متفاوت بوده و احتمالاً به دلیل کراسینگ‌آور نابرابر در طی میوز ایجاد می‌شوند. اختلافات در طول برخی از آرایش‌های پشت سر هم توالی ساده، اساس انگشت‌نگاری DNA را تشکیل می‌دهند.

۶-۳ عناصر DNA قابل انتقال (متحرک):

تکرارهای **پراکنده**، نوع دومی از DNA تکراری در ژنوم‌های یوکاریوتی بوده و از تعداد خیلی زیادی از نسخه‌های خانواده‌های با توالی‌های نسبتاکم درست می‌شوند. (جدول ۱-۶). DNA پراکنده



▲ **شکل تجربی ۷-۶ انگشت نگاری DNA برای تعیین هویت افراد در مورد بررسی‌های تعیین والدین و تحقیقات جنایی استفاده می‌شود.** در انگشت نگاری DNA، یک واکنش PCR خاص، روی DNA الگو از فرد یا با استفاده از چندین دسته پرایمر برای توالی‌های منحصر به فرد در دو طرف توالی‌های تکراری مینی ماهواره انجام می‌گیرد. ژل الکتروفورز محصولات PCR، انگشت نگاری DNA برای فرد ایجاد می‌کند. یعنی، یک دسته از مینی ماهواره‌ها با طول‌های تکراری مختلف، محصولات PCR با اندازه و مقدار حرکت متفاوت در ژل را ایجاد می‌کنند. (a) در این آنالیز والدینی، ستون M، محصولات با استفاده از DNA مادری به عنوان الگودر واکنش PCR را نشان می‌دهد؛ C. با استفاده از DNA بچه به عنوان الگو؛ و F1 و F2 با استفاده از DNA دو پدر بالقوه را نشان می‌دهند. بچه دارای طول‌های تکراری مینی ماهواره‌ای است که آنها را از مادر یا F_1 به ارث برده است و بیان‌گر این است که F_1 پدر است. پیکان‌ها محصولات PCR از F_1 (نه F_2) را نشان می‌دهند، این محصولات PCR در بچه هم وجود دارند. (b) در این انگشت نگاری DNA نمونه جدا شده از یک قربانی، تجاوز جنسی و سه مرد مظنون نشان داده شده است، واضح است که طول‌های تکرار مینی ماهواره در نمونه با طول تکرار مینی ماهواره مظنون ۱ همخوانی دارد. DNA قربانی مورد آنالیز قرار گرفته تا اطمینان حاصل شود، DNA نمونه با DNA قربانی آلوده نشده است.

همچنین به عنوان DNA با ***تکرار متوسط***[1] یا DNA ***تکرار حدواسط***[2] شناخته می‌شوند. این توالی‌ها در سرتاسر ژنوم پستانداران پراکنده‌اند و ۲۵ تا ۵۰ درصد از DNA پستانداران را تشکیل می‌دهند (در حدود ۴۵ درصد از DNA انسانی).

چون تکرارهای پراکنده دارای توانایی منحصر به فردی برای حرکت در ژنوم هستند، کلاً به عنوان عناصر DNA با قابلیت انتقال یا عناصر DNA متحرک در نظر گرفته می‌شوند. با اینکه عناصر DNA متحرک در ابتدا در یوکاریوت‌ها کشف شدند، ولی آنها در پروکاریوتها نیز یافت می‌شوند. فرآیندی که بوسیله آن این توالی‌ها، کپی شده و بداخل یک جایگاه جدید در ژنوم اضافه می‌شوند، **جابجایی**[3] نامیده می‌شود. عناصر DNA متحرک اساسا همزیست‌های مولکولی بوده و در اغلب موارد به نظر می‌رسد دارای فعالیت خاصی در زیست‌شناسی موجودات میزبان خود نمی‌باشند بلکه وجودشان تنها برای نگهداری خودشان است. به همین دلیل، فرانسیس کریک آنها را DNA **خودخواه**[4] نامید.

هنگامیکه جابجایی در سلول‌های جنسی رخ دهد، توالی‌های انتقال یافته به جایگاه‌های جدید، به نسل بعدی منتقل می‌شوند. با این روش، عناصر متحرک تکثیر یافته و به آرامی در ژنوم‌های یوکاریوتی طی دوره تکامل، تجمع می‌یابند. چون عناصر متحرک از ژنوم‌های یوکاریوتی خیلی آرام حذف می‌شوند، آنها سهم مهمی از ژنوم تعداد زیادی از یوکاریوت‌ها را تشکیل می‌دهند.

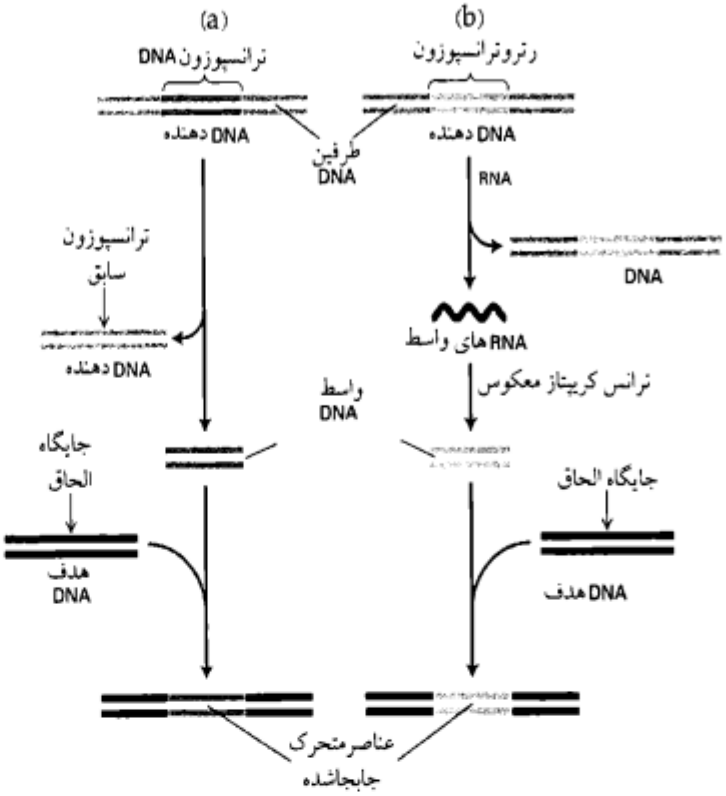
عناصر متحرک نه تنها، منبعی برای مقادیر زیادی از DNA در ژنوم ما می‌باشند بلکه همچنین یک مکانیسم ثانوی را علاوه بر نوترکیبی میوزی برای نوآرایی‌های DNA کروموزومی در طول تکامل، ایجاد می‌کنند. (شکل ۲-۶ را ملاحظه کنید). این نوترکیبی به این دلیل اتفاق می‌افتد که در طی انتقال یک عنصر متحرک خاص، گاهی اوقات DNA مجاور نیز به حرکت درمی‌آید. جابجایی به ندرت در انسان رخ می‌دهد. در حدود یک جابجایی در لایه سلول‌های زایشی جدید بازای هر ۸ نفر. چون ۹۸/۵ درصد از DNA ما غیررمزگردان است، اغلب جابجایی‌ها تاثیرات زیان آور ندارند. اما در طی زمان، آنها نقش حیاتی را در تکامل ژن‌های دارای اگزون‌ها و ژن‌هایی که بیان‌شان محدود به انواع سلولی خاص یا دوره‌های رشد و نمو خاص است، ایفا می‌کنند. به عبارت دیگر، گرچه عناصر متحرک احتمالاً به عنوان همزیست‌های سلولی تکامل یافته‌اند، اما آنها نقش مهمی در تکامل موجودات پرسلولی و پیچیده به عهده دارند.

جابجایی ممکن است در داخل یک سلول سوماتیک نیز اتفاق بیافتد.

1-Moderately repeated DNA

2-Intermediate repeat DNA

3-Transposition 4- Selfish DNA



◀ شکل ۸-۶ (شکل رنگی) دو دسته اصلی از عناصر DNA متحرک: a) DNA ترانسپوزون‌های یوکاریوتی (نارنجی) از طریق یک واسطه DNAیی انتقال می‌یابند. این DNA حدواسط از جایگاه دهنده خارج می‌شود. b) رتروترانسپوزون‌ها اول بصورت یک مولکول RNA رونویسی شده و سپس بصورت یک DNA دورشته‌ای بطور معکوس رونویسی می‌گردند. در هر دو مورد، DNA دو رشته‌ای حدواسط بداخل DNA دو رشته‌ای ادغام می‌شود تا جابجایی را کامل کند. در نتیجه DNA ترانسپوزون‌ها بوسیله یک **مکانیسم برش و اتصال** و رتروترانسپوزون‌ها از طریق **کپی اتصال** جابجا می‌شوند.

در این مورد، توالی جابجا شده تنها به سلول‌های دختری حاصل از آن سلول سوماتیک منتقل می‌شود. در موارد نادر چنین جابجایی در سلول سوماتیک ممکن است منجر به جهش سلول سوماتیک با تاثیرات فنوتیپ زیان‌آور شود. برای مثال می‌توان به غیرفعال سازی یک ژن سرکوبگر تومور اشاره کرد (فصل ۲۵). در این قسمت، ما اول ساختار و مکانیسم‌های جابجایی، انواع اصلی عناصر DNA قابل انتقال را شرح می‌دهیم و سپس نقش احتمالی آنها را در تکامل، بررسی می‌کنیم.

جابجایی عناصر متحرک، شامل یک DNA یا یک RNA حدواسط است.

باربارا مک کلینتوک [1] هنگام انجام آزمایشات کلاسیک ژنتیکی بر روی ذرت در طی دهه ۱۹۴۰ اولین بار عناصر متحرک را کشف کرد. او ویژگی‌های عناصر ژنتیکی را که می‌توانند به داخل یا خارج از ژن‌ها جابجا شده و فنوتیپ دانه‌های ذرت را تغییر دهند تعیین نمود. نظریه‌های او بسیار بحث‌انگیز شد تا اینکه عناصر متحرک مشابهی در باکتری کشف شد. در باکتری‌ها این عناصر به صورت توالی DNA خاص تعیین ویژگی شده و پایه مولکولی جابجایی آنهامشخص شد.

وقتی تحقیق بر روی عناصر متحرک توسعه یافت، مشخص شد که این عناصر در دو گروه قرار می‌گیرند: (۱) عناصری که مستقیما بصورت DNA منتقل می‌شوند و (۲) عناصری که از طریق یک RNA حدواسط جابجا می‌شوند. این RNA حدواسط بوسیله RNA پلیمراز از روی عضو متحرک رونویسی شده و سپس بوسیله یک **ترانس کریپتاز معکوس** به DNA دورشته‌ای تبدیل می‌شود. (شکل ۸-۶). عناصر متحرک که بطور مستقیم و بصورت DNA منتقل می‌گردد، و عموما به عنوان **DNAترانسپوزون** یا به صورت ساده‌تر **ترانسپوزون**[2] شناخته می‌شود. DNA ترانسپوزون‌های یوکاریوتی خودشان را از یک محل در ژنوم بریده، و آن جایگاه را ترک کرده و به یک جایگاه دیگر منتقل می‌شوند. عناصر متحرک که به جایگاههای جدید در ژنوم از طریق یک RNA حدواسط جابجا می‌شوند را **رتروترانسپوزون‌ها**[3] می‌گویند.

رتروترانسپوزون‌ها یک نسخه RNA از خودشان ساخته و این نسخه جدید را به یک جایگاه دیگر در ژنوم معرفی می‌کنند در حالیکه در

1-Barbara Mcclintock 2- Trans poson
3- Retrotrans posons

موقعیت اولیه شان نیز باقی می‌مانند. جابجایی رتروترانسپوزون‌ها مشابه به فرآیند آلوده سازی رتروویروس‌ها است. البته، رتروویروس‌ها می‌توانند به عنوان رتروترانسپوزون‌هایی در نظر گرفته شوند که ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین پوشش ویروسی را نداشته و در نتیجه امکان انتقال بین سلول‌ها در آنها وجود ندارد. رتروترانسپوزون‌ها می‌توانند براساس مکانیسم خاص جابجایی‌شان بیشتر طبقه بندی شوند. بطور خلاصه، DNA ترانسپوزون‌ها می‌توانند بوسیله یک مکانیسم **برش و اتصال**[1] به عنوان جابجایی در نظر گرفته شوند در حالیکه رتروترانسپوزون‌ها بوسیله یک **مکانیسم کپی و اتصال**[2] جابجا می‌شوند که در این مکانیسم، کپی یک RNA حدواسط می‌باشد.

DNAهای ترانسپوزونی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارند.

اغلب عناصر متحرک در باکتری‌ها مستقیماً بصورت DNA منتقل می‌شوند. در مقابل اغلب عناصر متحرک در یوکاریوت‌ها، رتروترانسپوزون‌ها هستند. DNAهای ترانسپوزون یوکاریوتی نیز وجود دارند. در حقیقت، عناصر متحرک اولیه کشف شده بوسیله باربارا مک کلینتوک، DNAهای ترانسپوزون هستند.

توالی‌های الحاق باکتریایی: اولین فهم مولکولی درباره عناصر متحرک از مطالعه جهش‌های خاص در *E.Coli* حاصل شد. این جهش‌ها از طریق الحاق خودبخودی یک توالی DNA با طول تقریبی ۱ تا ۲ کیلو باز، به میانه یک ژن ایجاد می‌شوند. این قطعات الحاق DNA، ***توالی‌های الحاق***[3] یا ***عناصر IS***[4] نامیده می‌شوند. تاکنون، بیش از ۲۰ عنصر IS متفاوت در E.Coli و باکتری‌های دیگر یافت شده است.

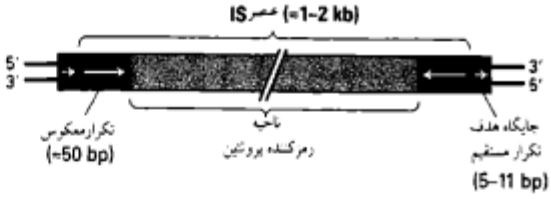
جابجایی عناصر IS یک رویداد خیلی نادر بوده و بازای یک در 10^{-7}-10^{-5} سلول در هر نسل رخ می‌دهد و بسته به عنصر IS، اغلب جابجایی‌ها ژن‌های ضروری را غیرفعال کرده و در نتیجه سلول میزبان و سلول‌های حاوی این عناصر متحرک را از بین می‌برند. بنابراین سرعت بالای جابجایی احتمالا منجر به افزایش زیاد در سرعت جهش می‌شود تا موجود زنده، بتواند زنده بماند. با وجود این، چون عناصر IS کم و بیش بطور تصادفی جابجا می‌شوند، برخی توالی‌های جابجا شده به نواحی غیرضروری از ژنوم (مثل نواحی میان ژن‌ها) وارد شده و به سلول امکان می‌دهند تا زنده بماند. در میزان خیلی پائین از جابجایی، اغلب سلول‌های میزبان زنده می‌مانند و بنابراین عناصر IS همزیست تکثیر پیدا می‌کنند. عناصر IS می‌توانند بداخل پلاسمیدها یا ویروس‌های لیزوژنیک نیز وارد شده و در نتیجه به سلول‌های دیگر انتقال یابند. عناصر IS به این طریق می‌توانند بداخل کروموزوم‌های سلول‌های دست نخورده نیز جابجا شوند. ساختار کلی عناصر IS در شکل ۹-۶ رسم شده است. یک تکرار معکوس حدودا ۵۰ جفت بازی بصورت غیرقابل تغییر در هر انتها از توالی الحاق وجود دارد. در یک تکرار معکوس، توالی ′۳→′۵ روی یک رشته دیگر تکرار می‌گردد مثلاً:

```
5′ GAGc ——— GcTc3′
3′CTCG ——— CGAG5′
```

میان توالی‌های معکوس یک ناحیه وجود دارد که **ترانسپوزاز**[5] را رمزدهی می‌کند که آنزیم به منظور جابجایی عناصر به جایگاه جدید مورد نیاز می‌باشد. ترانسپوزاز خیلی بندرت بیان می‌شود و جوابگوی میزان خیلی پائین جابجایی است. یک نشانه مهم عناصر IS، وجود ***توالی تکراری مستقیم***[6] کوتاه با ۱۱-۵ جفت باز می‌باشد که بلافاصله در کنار هر دو انتهای عنصر الحاق یافته قرار دارند. طول توالی تکراری مستقیم، مشخصه هر نوع از عناصر IS بوده و توالی آن به جایگاه هدفی بستگی دارد که به آن یک نسخه از عنصر IS ملحق می‌گردد. وقتی توالی یک ژن جهش یافته حاوی یک عنصر IS با توالی ژن وحشی مقایسه می‌شود، تنها یک نسخه از توالی تکراری مستقیم کوتاه در ژن وحشی یافت می‌گردد. مضاعف شدن این توالی با جایگاه هدف برای ایجاد تکرار مستقیم ثانویه در مجاورت عنصر IS در طی فرآیند الحاق رخ می‌دهد.

همانطور که در شکل ۱۰-۶ اشاره شده، جابجایی یک عنصر IS بوسیله مکانیسم برش و اتصال صورت می‌گیرد. ترانسپوزاز در این فرآیند سه نقش دارد: (۱) بطور خیلی دقیق عنصر IS در DNA دهنده را برش می‌دهد. (۲) یک توالی کوتاه در DNA هدف، برش‌های با انتهای چسبان ایجاد می‌کند (۳) انتهاهای ′۳ عناصر IS را به انتهاهای ′۵ DNA دهنده برش یافته، متصل می‌کند. در نهایت، یک DNA پلیمراز سلول میزبان، شکاف‌های تک رشته‌ای را پرکرده و تکرارهای کوتاه مستقیم تولید می‌نماید که در دو طرف عناصر IS قرار دارد و DNA لیگاز انتهاهای آزاد را به هم متصل می‌کند.

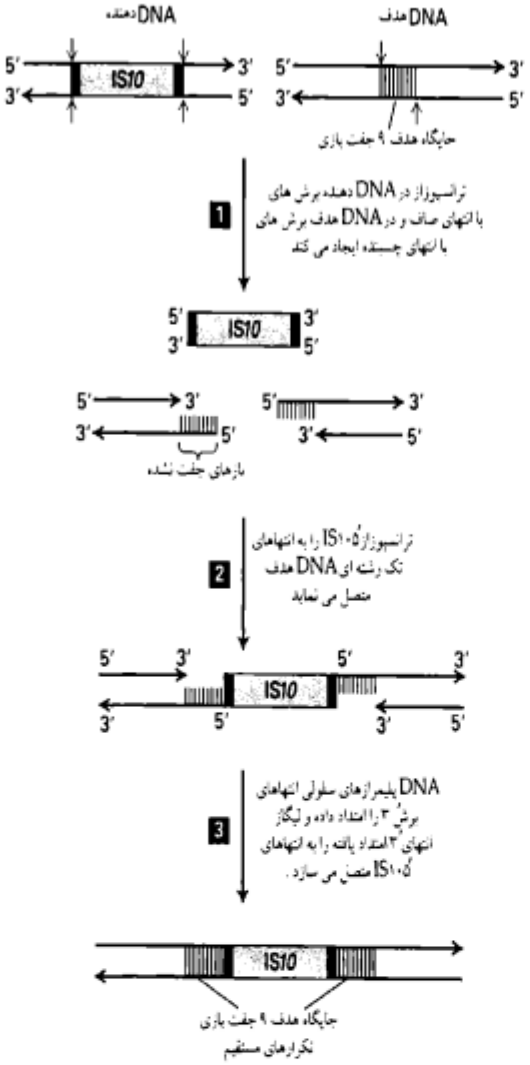
1- Cut-paste
2-Copy-and-paste
3- Insertion sequences
4- Is elements
5- Transposase
6- Direct-repeat sequence



▲ **شکل ۹-۶ ساختار کلی عناصر IS در باکتری‌ها.** در اطراف دو انتهای ناحیه مرکزی نسبتاً بزرگ در یک عنصر IS که یک یا دو آنزیم موردنیاز برای جابجایی را رمزدهی می‌کند، تکرارهای معکوس وجود دارد. توالی تکرارهای معکوس تقریباً یکسان بوده اما در جهات مخالف هم آرایش می‌یابند. توالی تکراری معکوس خصوصیت یک عنصر IS است. تکرارهای مستقیم و کوتاه ′۵ و ′۳ (معکوس هم هستند) با عنصر الحاق جابجا نمی‌شوند، بلکه آنها توالی‌های جایگاه الحاق بوده و طی الحاق یک قطعه متحرک مضاعف می‌شوند (یک نسخه در هر انتها). طول تکرارهای مستقیم برای یک عنصر IS ثابت بوده اما توالی‌های آنها به جایگاه الحاق وابسته بوده و بنابراین با هر انتقال عنصر IS تغییر می‌کند. پیکان‌ها جهت توالی را نشان می‌دهند. ناحیه رمزدهی‌کننده، بیشتر طول عنصر IS را تشکیل می‌دهد.

ترانسپوزون‌های DNAیی یوکاریوتی. کشف اولیه مک کلینتوک درباره عناصر متحرک از مشاهده جهش‌های خودبخودی در ذرت ناشی شد که در آن تولید آنزیم‌های لازم برای ساخت آنتوسیانین (یک رنگدانه ارغوانی در دانه‌های ذرت) تحت تاثیر قرار می‌گیرد. یک دسته از این جهش‌ها در فرکانس خیلی بالا برگشت‌پذیر هستند در حالیکه دسته دوم جهش‌ها، برنمی‌گردند مگر اینکه در حضور دسته اول جهش‌ها، اتفاق بیافتند. مک کلینتوک عامل مسئول اولین دسته از جهش‌ها را عنصر فعال کننده[1] نامید و عامل مسئول دسته دوم جهش‌ها را عناصر جداکننده[2] خواند چون آنها تمایل دارند به شکست‌های کروموزومی متصل شوند. عناصر Ds، فرم‌های حذف شده از عنصر Ac می‌باشد که در آن‌ها یک بخش از توالی که رمزدهی‌کننده ترانسپوزاز می‌باشد، از دست رفته است. چون عنصر Ds یک ترانسپوزاز عملکردی را رمزدهی نمی‌کند، پس نمی‌تواند به تنهایی جابجا شود. با وجود این، در گیاهان که حاوی عنصر Ac هستند و در نتیجه یک ترانسپوزاز عملکردی را بیان می‌کنند، عناصر Ds می‌توانند جابجا شوند زیرا آنها تکرارهای پایانی معکوس مورد تشخیص ترانسپوزاز را حفظ می‌نمایند.

از کار اولیه مک کلینتوک بر روی عناصر متحرک در ذرت ، ترانس پوزون‌ها در یوکاریوتهای دیگر نیز شناسایی شدند. برای مثال، تقریباً



▲ **شکل ۱۰-۶ (شکل رنگی) مدلی برای جابجایی توالی‌های الحاق باکتریایی.** مرحله (1): ترانسپوزازی که بوسیله عنصر IS (IS10 در این مثال) رمزدهی می‌شود، هر دو رشته DNA دهنده را بعد از تکرارهای معکوس برش داده (قرمز تیره) و عنصر IS10 را جدا می‌کند. ترانسپوزاز DNA هدف را در جایگاههای تصادفی بریده و باعث ایجاد DNA با انتهای چسبنده می‌شود. در مورد IS10 انتهاهای برش یافته ۹ جفت باز از هم فاصله دارند. مرحله (2): اتصال انتهاهای ′۳ عنصر IS جداشده به جایگاههای موجود در DNA هدف نیز بوسیله ترانسپوزاز کاتالیز می‌گردد. مرحله (3): شکاف‌های ۹ جفت بازی DNA تک رشته‌ای در DNA حدواسط بوسیله یک DNA پلیمراز سلولی پر می‌شوند. در نهایت DNA لیگاز سلولی پیوندهای فسفودی استر ′۵→′۳ را میان انتهاهای ′۳ رشته‌های DNA هدف امتداد یافته و انتهاهای ′۵ رشته‌های IS10 برقرار می‌کند. این فرآیند منجر به مضاعف شدن توالی جایگاه هدف در دو طرف از عنصر IS ملحق شده می‌گردد. به خاطر داشته باشید که طول جایگاه هدف و IS10 بر اساس مقیاس نیست.

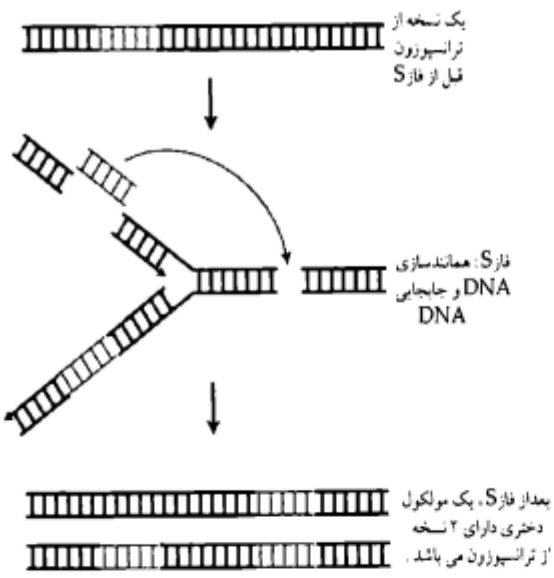
1- Activator (AC) element

2- Dissociation (DS) elements

نیمی از جهش‌های خودبخودی در دروزوفیلا بواسطه الحاق عناصر متحرک می‌باشند. اگرچه اغلب عناصر متحرک در دروزوفیلا بصورت رتروترانسپوزون عمل می‌کنند، حداقل عنصر P[1] به عنوان یک DNA ترانسپوزون عمل کرده و از طریق مکانیسم مشابه با مکانیسم مورد استفاده الحاق توالی در باکتری‌ها، جابجا می‌شود. همانطورکه در فصل ۵ بحث شده است روش‌های مرسوم برای ایجاد دروزوفیلای ترانس ژنیک به بیان در سطح بالای ترانسپوزاز عنصر P مهندسی شده و استفاده از تکرارهای معکوس انتهایی عنصر P به عنوان هدف برای رونویسی بستگی دارند.

جابجایی DNA بوسیله مکانیسم برش اتصال در صورتیکه در طی فاز S چرخه سلولی صورت گیرد، یعنی هنگامی که سنتز DNA رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به افزایش تعداد نسخه یک ترانسپوزون شود. افزایش در تعداد نسخه وقتی اتفاق می‌افتد که DNA دهنده از یکی از دو مولکول DNA دختری در ناحیه‌ای از یک کروموزوم باشد که همانندسازی شده و DNA هدف در ناحیه‌ای باشد که هنوز همانندسازی نشده است. وقتی همانندسازی DNA در پایان S کامل شد، DNA هدف در موقعیت جدید خود نیز همانندسازی شده و منجر به افزایش در تعداد کلی این ترانسپوزون‌ها در سلول می‌شود (شکل ۱۱-۶).

وقتی این جابجایی در فاز S قبل از میوز اتفاق می‌افتد، یکی از چهار سلول جنسی تولید شده، حاوی نسخه اضافی از ترانسپوزون می‌باشد. تکرار این فرآیند در دوره تکاملی به تجمع تعداد زیادی از DNA ترانسپوزون‌ها در ژنوم‌های برخی موجودات منجر شده است. DNA انسان در حدود ۳۰۰/۰۰۰ نسخه از DNA ترانسپوزون‌های با طول کامل و حذف شده را دربر می‌گیرد که در حدود ۳ درصد از DNA انسان را شامل می‌شود. همانطورکه بصورت خلاصه خواهیم دید، این مکانیسم می‌تواند علاوه بر خود ترانسپوزون به جابجایی DNA ژنومی نیز منجر شود.



▲ **شکل ۱۱-۶ مکانیسم افزایش تعداد کپی در DNA ترانسپوزون‌ها.** در این مدل DNA ترانسپوزون از طریق مکانیسم برش و اتصال حرکت می‌کند (شکل ۱۰-۶ را ملاحظه کنید) و در طی فاز S از یک ناحیه در کروموزوم همانندسازی شده به یک ناحیه در کروموزومی که همانندسازی نکرده، منتقل می‌شود. اگر این امر اتفاق بیافتد، یکی از دو کروموزوم دختری هنگامیکه همانندسازی کروموزومی تکمیل شد، یک ترانسپوزون الحاقی اضافی خواهد داشت.

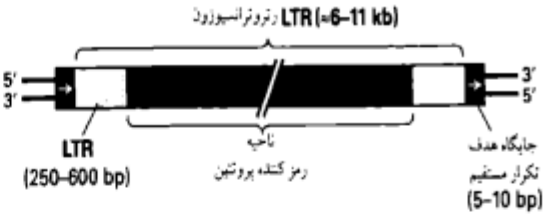
رتروترانسپوزون‌های LTR مانند رتروویروس‌های درون سلولی عمل می‌نمایند

ژنوم همه یوکاریوتهای مطالعه شده از مخمر گرفته تا انسان، دارای رتروترانسپوزون هستند. این عناصر DNAی متحرک می‌باشند و از طریق یک RNA حدواسط و با استفاده از ترانس کریپتاز معکوس جابجا می‌شوند (شکل ۸b-۶ را ملاحظه کنید). این عناصر متحرک به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند، عناصر دارای تکرارهای انتهایی‌بلند یا LTRs[2] هستند و عناصری که فاقد آن می‌باشند.

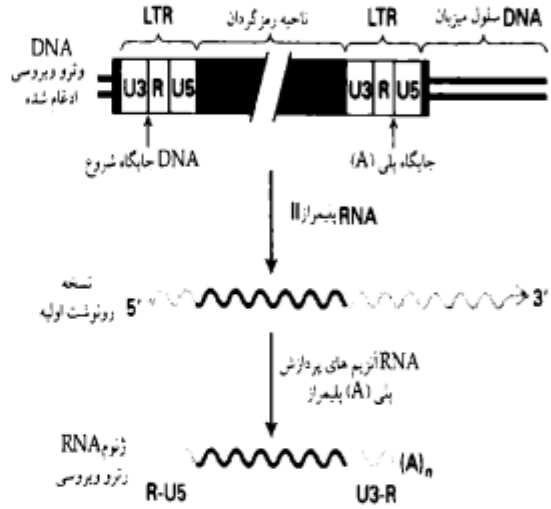
رتروترانسپوزون‌های LTR که در اینجا بررسی می‌کنیم، در مخمر (مثل عناصر T_y) و در دروزوفیلا (مثل عناصر copia) رایج می‌باشند. گرچه رتروترانسپوزون‌های LTR در پستانداران نسبت به رتروترانسپوزون‌های غیر LTR فراوانی کمتری دارند، ولی در حدود ۸ درصد از DNA ژنومی انسان را تشکیل می‌دهند. در پستانداران، رتروترانسپوزون‌های فاقد LTR، رایج‌ترین نوع عناصر متحرک می‌باشند. این عناصر در قسمت بعدی شرح داده می‌شوند.

ساختار کلی رتروترانسپوزون‌های LTR یافت شده در یوکاریوت‌ها در شکل ۱۲-۶ نشان داده شده است. علاوه بر تکرارهای کوتاه مستقیم ′۳ و ′۵ که مختص همه ترانسپوزون‌ها هستند، این ترانسپوزون‌ها از طریق حضور LTRهایی در اطراف ناحیه مرکزی رمزدهی‌کننده پروتئین، شناسایی می‌شوند. این تکرارهای انتهایی بلند مستقیم، بسته به نوع رتروترانسپوزون LTR حاوی ۲۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز بوده، و خصوصیت DNA رتروویرسی ادغام شده را داشته و برای چرخه زندگی رتروویروس‌ها ضروری می‌باشند. علاوه

1- Pelement 2- Long terminal repeats



▲ **شکل ۱۲-۶ ساختار کلی LTR رتروترانسپوزون‌ها.** در اطراف ناحیه رمزدهی‌کننده پروتئین دو تکرار انتهایی طویل (LTRs) که تکرارهای مستقیم با عناصر ویژه هستند، قرار می‌گیرند. همچون سایر عناصر متحرک، رترو ترانسپوزون‌های ادغام شده در هر انتها، تکرارهای مستقیم با جایگاه هدف دارند. نواحی رمزدهی‌کننده پروتئین حدود ۸۰ درصد و یا بیشتر از ترانسپوزون‌ها را تشکیل داده و آنزیم‌های ترانس کریپتاز معکوس، اینتگراز و پروتئین‌های رتروویروس دیگر را رمزدهی می‌کنند.



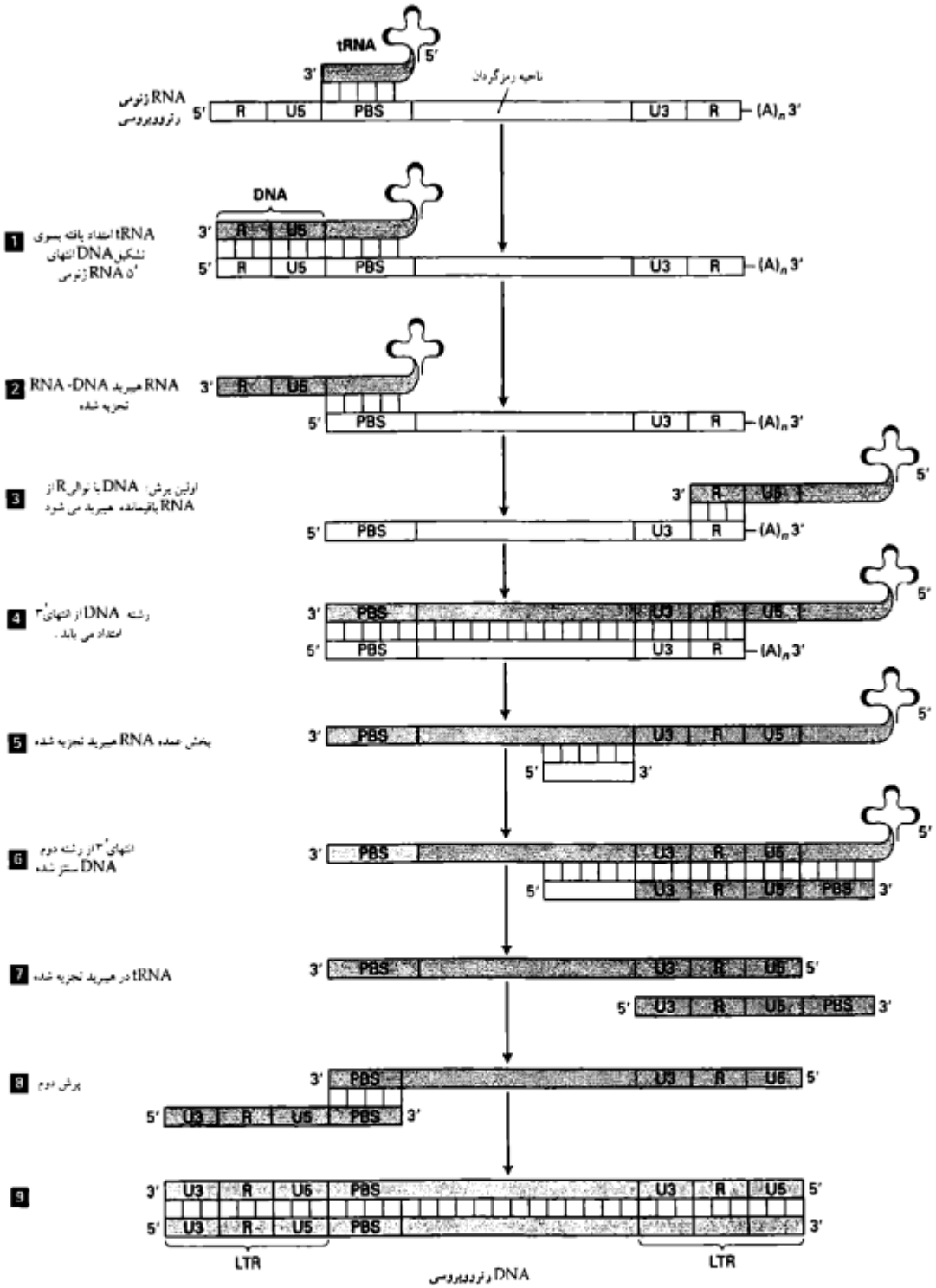
▲ **شکل ۱۳-۶ تولید RNA ژنوم رتروویروسی از DNA رتروویروسی ادغام شده.** LTR در سمت چپ RNA پلیمراز را برای شروع رونویسی در اولین نوکلئوتید از سمت چپ ناحیه R هدایت می‌کند. رونوشت اولیه حاصل تا بعد از LTR سمت راست امتداد می‌یابد. LTR سمت راست، که حالا در رونوشت اولیه RNA وجود دارد، آنزیم‌های سلولی را برای شکست رونوشت اولیه در آخرین نوکلئوتید از سمت راست ناحیه R و افزودن یک دم پلی A هدایت نموده و باعث ایجاد یک ژنوم RNA رتروویروسی با ساختار نشان داده شده در بالای شکل ۱۴-۶ می‌شوند. گمان می‌رود مکانیسم مشابه در طی جابجایی رتروترانسپوزون‌ها، RNA حدواسط تولید می‌کند. توالی‌های تکرار مستقیم (سیاه) موجود در DNA هدف در حین قرارگیری DNA رتروویروسی در داخل ژنوم سلول میزبان تولید می‌شوند.

برمشارکت LTRها با رتروویروس‌ها، LTR رتروترانسپوزون‌ها، همه پروتئین‌های رتروویروس‌های معروف به استثنای پروتئین‌های پوشش آنها را رمزدهی می‌نمایند. در نبود این پروتئین‌های پوششی LTR رتروترانسپوزون‌ها نمی‌توانند از سلول میزبان خود خارج شده و سلول‌های دیگر را آلوده کنند. با وجود این می‌توانند به جایگاههای جدید در DNA سلول میزبان خود جابجا شوند. بخاطر خویشاوندی واضح آنها با رتروویروس‌ها، این دسته از رتروترانسپوزون‌ها اغلب **عناصر شبه رتروویروس**[1] نامیده می‌شوند.

مرحله کلیدی در چرخه زندگی رتروویروسی، تشکیل RNA ژنومی رتروویروسی از DNA رتروویروسی ادغام شده (در ژنوم میزبان) می‌باشد. (شکل ۴۹-۴ را ملاحظه کنید). این فرآیند به عنوان مدلی برای تولید RNA حدواسط در حین جابجایی LTR رتروترانسپوزون‌ها به کار می‌رود. همانطور که در شکل ۱۳-۶ اشاره شده است، LTR رتروویروس‌های موجود در سمت چپ به عنوان یک پروموتر عمل نموده و RNA پلیمرازهای سلول میزبان را به شروع رونویسی در نوکلئوتید ′۵ توالی R هدایت می‌نمایند. بعد از اینکه تمام DNA رتروویروسی فرودست رونویسی شد، توالی RNA مرتبط با LTR در سمت راست، آنزیم‌های پردازش کننده RNA سلول میزبان را به سمت شکست رونوشت اولیه سوق داده و باعث افزودن یک دم پلی A در انتهای ′۳ توالی R می‌گردند. ژنوم RNA رتروویروسی حاصل که فاقد یک LTR کامل است، از هسته خارج شده و بصورت یک ویریون (Virion) بسته بندی و از سلول میزبان خارج می‌شود.

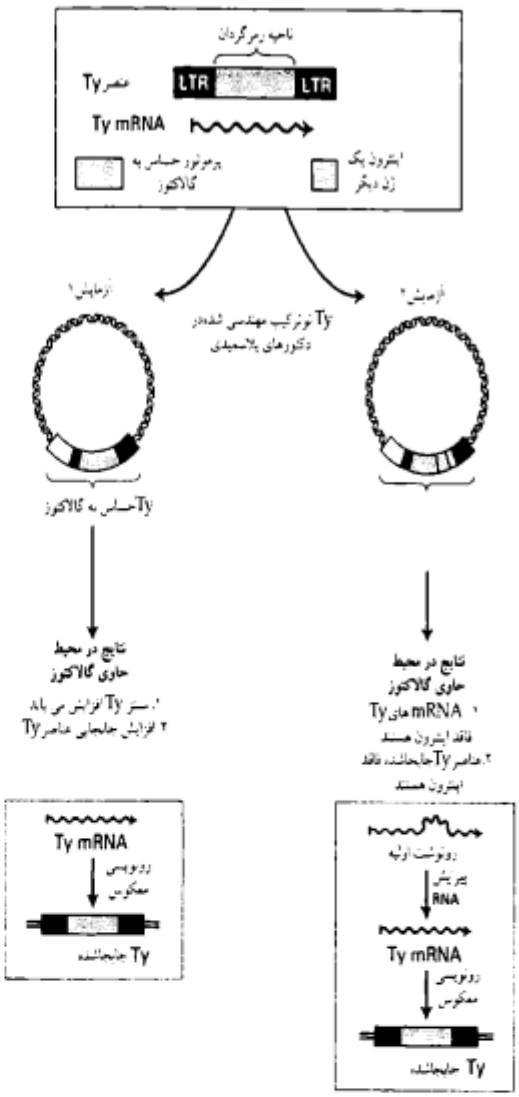
بعد از اینکه یک رتروویروس، سلولی را آلوده کرد، رونویسی معکوس ژنوم RNAی آن توسط ترانس کریپتاز معکوس (که توسط رتروویروس رمزدهی می‌شود) یک DNA دورشته‌ای حاوی LTR در هر انتها ایجاد می‌کند. سنتز این DNA در سیتوزول رخ داده، و سپس به همراه یک آنزیم رمزدهی شده توسط رتروویروس بنام **اینتگراز** به داخل هسته منتقل می‌شود. اینتگرازهای رتروویروسی به ترانسپوزازهای رمزدهی شده توسط DNA ترانسپوزون‌ها، خیلی شبیه بوده و از مکانیسمی مشابه برای ورود DNA رتروویروسی دورشته‌ای بداخل ژنوم سلول میزبان استفاده می‌کنند. در این فرآیند، تکرارهای مستقیم کوتاه توالی جایگاه هدف، در هر دو انتهای توالی DNA ویروسی وارد شده ایجاد می‌گردد. هر چند مکانیسم رونویسی معکوس پیچیده است ولی قسمت حیاتی چرخه زندگی رتروویروس می‌باشد. فرآیند تولید ′۵LTR کامل به عنوان پروموتری برای شروع رونویسی دقیق از نوکلئوتید ′۵ توالی R عمل می‌نمایند. در حالیکه ′۳LTR کامل به عنوان جایگاه پلی (A)، باعث پلی آدنیله

1- Retrovirus-like elements



▲ **شکل ۱۴-۶ مدل برای رونویسی معکوس RNA ژنومی رتروویروسی بصورت DNA.** در این مدل، مجموعه‌ای پیچیده از ۹ پدیده، نسخه DNA دورشته از ژنوم RNA تک رشته یک رتروویروس (بالا) تولید می‌کند. RNA ژنومی با یک tRNA سلولی ویژه رتروویروس بسته بندی می‌شود. این tRNA با توالی مکمل در نزدیکی انتهای '۵ ژنوم به نام جایگاه اتصال پرایمر[1] هیبرید می‌شود. RNA رتروویروسی یک توالی پایانی کوتاه با تکرار مستقیم (R) در هر انتها دارد. واکنش کلی بوسیله ترانس کریپتاز معکوس صورت می‌گیرد که دئوکسی ریبونوکلئوتیدها را پلیمریزه می‌کند. RNaseH، رشته RNA را در هیبرید RNA-DNA می‌برد در آخر یک مولکول DNA دورشته‌ای ایجاد می‌شود. DNA دورشته‌ای طویل‌تر از RNA الگو بوده و دارای یک تکرار بلند پایانی (LTR) در هر انتها می‌باشد. نواحی PBS و R در حقیقت خیلی کوتاه‌تر از نواحی u3 و u5 بوده و ناحیه رمزدهی‌کننده مرکزی خیلی طویل‌تر از نواحی دیگر می‌باشند.

1- Primer-binding site



◀ شکل تجربی ۱۵-۶ عنصر T_y مخمر از طریق یک RNA واسط جابجا می‌شود. وقتی سلول‌های مخمر با یک پلاسمید حاوی T_y آلوده می‌شوند (ترانسفورم)، عنصر T_y می‌تواند به جایگاههای جدید منتقل شود (اگرچه این عمل بصورت طبیعی به میزان پائین رخ می‌دهد). با استفاده از عناصر رسم شده در بالا، محققین دو وکتور پلاسمیدی نوترکیب مختلف طراحی کردند که حاوی عناصر T_y در مجاورت پروموتر حساس به گالاکتوز بود. این پلاسمیدها بداخل سلول‌های مخمر منتقل شده و این سلول‌ها در یک محیط حاوی گالاکتوز و محیط غیرگالاکتوز کشت داده شدند. در آزمایش اول، رشد سلول‌ها در محیط حاوی گالاکتوز به جابجایی‌های بیشتری نسبت به محیط غیرگالاکتوز منجر شد و این مطلب بیانگر این است که رونویسی بصورت یک RNA حدواسط در جابجایی T_y لازم است. در آزمایش ۲، یک اینترون از یک ژن غیرمرتبط مخمر بداخل ناحیه رمزدهی‌کننده پروتئین از عنصر T_y حساس به گالاکتوز نوترکیب افزوده شد. مشاهده نبود اینترون در عناصر T_y جابجا شده شاهدی قوی است بر اینکه جابجایی از طریق یک RNA حدواسط صورت می‌گیرد، و اینترون RNA واسط بوسیله پیرایش RNA برداشته شده است. (همانطور که در کادر پائین سمت راست، اشاره شده است). در مقابل، ترانسپوزون‌های یوکاریوتی مثل عنصر AC ذرت، حاوی اینترون‌هایی در داخل ژن ترانسپوزاز است که این موضوع بیان می‌کند که جابجایی از طریق RNA حدواسط صورت نمی‌گیرد.

شدن دقیق توالی R در نوکلئوتید ۳′ می‌شود. در نتیجه وقتی‌رتروترانسپوزون‌های LTR دردفعات پی در پی دستخوش الحاق، رونویسی، رونویسی معکوس و الحاق مجدد در یک جایگاه جدید می‌شوند، هیچ نوکلئوتیدی را از دست ندهند.

همانطور که در بالا اشاره شد، LTR رتروترانسپوزون‌ها، ترانس کریپتاز معکوس و اینتگراز را رمزدهی می‌کنند. همچون رتروویروس‌ها، این عناصر متحرک با مکانیسم کپی اتصال جابجا شده و از طریق ترانس کریپتاز معکوس یک نسخه RNA از یک عنصر دهنده را به DNA تبدیل کرده و آن را بوسیله اینتگراز به داخل جایگاه هدف وارد می‌کنند. آزمایشات اشاره شده در شکل ۱۵-۶ شواهد قوی برای نقش یک RNA حد واسط در جابجایی عناصر T_y فراهم می‌آورند.

رایج‌ترین LTR رتروترانسپوزون‌ها در انسان ERV نامیده می‌شوند. اغلب ۴۴۳/۰۰۰ توالی DNA مرتبط با ERV در ژنوم انسان، تنها از LTRهای جداشده تشکیل می‌شوند. این توالی‌ها از DNA پرووویروسی با طول کامل و بوسیله نوترکیبی هومولوگ میان دو LTR منشاگرفته و منجر به حذف توالی‌های رتروویروسی درونی می‌گردند. این LTRها نمی‌توانند به موقعیت جدید در ژنوم منتقل شوند اما نوترکیبی میان LTRهای هومولوگ در موقعیت‌های مختلف ژنوم، احتمالا به نوآرایی‌های DNA کروموزومی نسبت داده می‌شود که منجر به مضاعف شدن ژن و اگزون و تکامل پروتئین‌ها با ترکیبات جدیدی از اگزون‌ها شده و همانطور که در بخش ۷ خواهیم دید، باعث تکامل کنترل پیچیده بیان ژن می‌شوند.

رتروترانسپوزون‌های غیر LTR از طریق مکانیسم متفاوتی جابجا می‌شوند.

فراوانترین عناصر متحرک در پستانداران رتروترانسپوزون‌هایی هستند که فاقد LTR بوده و گاهی اوقات **رتروترانسپوزون‌های**

غیرویروسی[1] نامیده می‌شوند. این توالی‌های DNA با تکرار متوسط، در ژنوم‌های پستانداران دو دسته تشکیل می‌دهند: LINEها[2] و SINEها[3] در انسان LINE با طول کامل تقریباً ۶ کیلوباز و SINEها در حدود ۳۰۰ جفت باز طول دارند (جدول ۱-۶ را ملاحظه کنید). توالی‌های تکراری با خصوصیات LINEها در پروتوزوآها، حشرات و گیاهان مشاهده شده است اما این توالی‌ها به دلایل ناشناخته و به خصوص در ژنوم پستانداران فراوان هستند. SINEها اساسا در DNA پستانداران نیز یافت می‌شوند. مقادیر بالای LINE و SINEها در یوکاریوت‌های عالی طی دوره تکاملی از طریق کپی برداری مکرر توالی‌ها در موقعیت‌های کمی از ژنوم و اضافه شدن کپی‌ها به موقعیت‌های جدید، انباشته شده‌اند.

LINEها: DNA انسان سه خانواده اصلی از توالی‌های LINE را دربرمی‌گیرد L1، L2 و L3 این خانواده‌ها از لحاظ مکانیسم جابجایی مشابه اما در توالی‌هایشان متفاوت هستند: تنها اعضای خانواده L1 در ژنوم انسان معاصر جابجا می‌شود. ظاهرا هیچ نسخه عملکردی از L2 یا L3 باقی نمانده است. توالی‌های LINE در ۹۰۰/۰۰۰ جایگاه از DNA انسان وجود دارند که ۲۱ درصد از DNA انسان می‌باشند. ساختار کلی یک LINE کامل در شکل ۱۶-۶ رسم شده است. LINEها معمولاً دارای تکرارهای کوتاه مستقیم در دو طرف خود بوده (شاخص عناصر متحرک) و حاوی دو قالب قابل خواندن یا ORF هستند. ORF1 تقریباً یک کیلوباز طول داشته و یک پروتئین متصل شونده به RNA را رمزدهی می‌کند. ORF2 در حدود ۴ کیلوباز طول داشته و پروتئینی را رمزدهی می‌کند که دارای یک ناحیه طویل هُمولوگ با ترانس کریپتاز معکوس رتروویروس‌ها و LTR رتروترانسپوزون‌ها بوده و فعالیت DNA اگزونوکلئازی نیز از خود نشان می‌دهد.

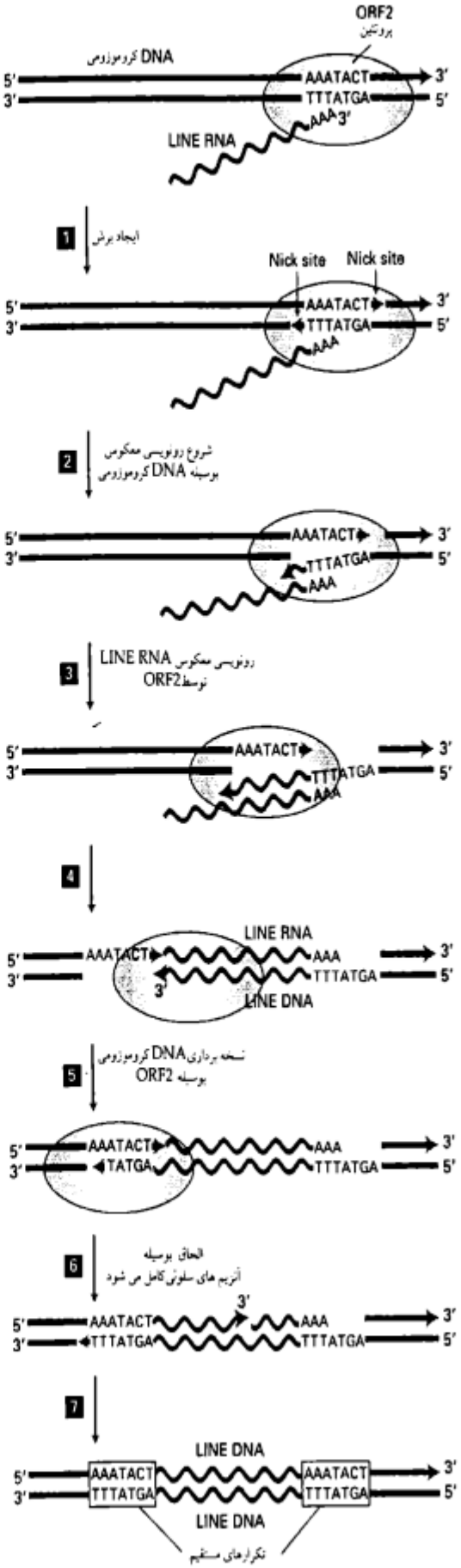
شواهد برای حرکت عناصر L1 اولین بار از آنالیز DNA کلون شده از افرادی با بیماریهای ژنتیکی خاص مثل هموفیلی و دیستروفی ماهیچه‌ای بدست آمد. با مطالعه DNAی این افراد بیمار مشخص شد، DNA آنها حاوی جهش‌هایی است که حاصل ورود یک عنصر L1 بداخل یک ژن است، در حالیکه چنین عنصری در داخل این ژن در هیچ کدام از والدین وجود ندارد. حدودا از ۶۰۰ جهشی که منجر به بیماری قابل توجه در انسان می‌شوند، جهش در اثر جابجایی‌های L1 یا SINE است که بوسیله پروتئین‌های رمزدهی شده توسط L1 کاتالیز می‌شود. آزمایشات بعدی مشابه آزمایش‌های شرح داده شده با عناصر T_y مخمر (شکل ۱۵-۶ را ملاحظه کنید) تایید کردند که عناصر L1 از طریق RNA حدواسط جابجا می‌شوند. در این

▲ **شکل ۱۶-۶ ساختار کلی LINE. یک رتروترانسپوزون بدون LTR.** DNA پستانداران حاوی دو دسته از رتروترانسپوزون‌های بدون LTR بنام LINEs و SINEs است (نشان داده نشده). طول تکرارهای مستقیم جایگاه هدف در میان نسخه‌های یک LINE در جایگاههای مختلف در ژنوم متغیر می‌باشد. اگرچه توالی L1 با طول کامل دارای ۶ کیلوباز است، مقادیر متغیر انتهای طرف چپ در بیش از ۹۰ درصد از جایگاهها غایب بوده و در این محل‌ها عنصر متحرک یافت می‌شود. قالب قابل خواندن کوتاه‌تر (ORF1) با ۱ کیلوباز طول، یک پروتئین متصل‌شونده به RNA را رمزدهی می‌کند. ORF2 طویل‌تر با ۴kb طول، یک پروتئین دوعملکردی با فعالیت ترانس کریپتاز معکوس و DNA اندونوکلئاز را رمزدهی می‌کند. دقت داشته باشید که LINEها فاقد تکرارهای طویل پایانی موجود در LTR رتروترانسپوزون‌ها می‌باشند.

آزمایشات، یک اینترون بداخل عنصر L1 موش وارد و عنصر L1 نوترکیب حاصل به داخل سلول‌های کشت داده شده هامستر منتقل شد. بعد از چندین بار مضاعف شدن سلول‌ها، با انجام PCR و ازدیاد توالی مورد نظر، قطعه‌ای در این سلول‌ها دیده شد که مربوط به عنصر L1 بود اما اینترون اضافه شده را نداشت. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند در طول زمان، عنصر L1 نوترکیب که حاوی اینترون الحاق یافته است از طریق RNA حدواسط به جایگاههای جدید در ژنوم هامستر جابجا شده و این RNA حدواسط، متحمل پیرایش گردیده و اینترون آن برداشته می‌شود.

از آنجایی که LINEها حاوی LTRها نیستند، مکانیسم جابجایی آنها از طریق یک RNA حدواسط، با جابجایی رتروترانسپوزون‌های LTR متفاوت است. پروتئین‌های ORF1 و ORF2 از روی یک LINE RNA ترجمه می‌شوند. مطالعات در شرایط آزمایشگاهی نشان داد، رونویسی با RNA پلیمراز و بوسیله توالی‌های پروموتر موجود در انتهای چپ LINE DNA ادغام شده، انجام می‌شود. LINE RNA بوسیله مکانیسم پس از ترجمه پلی آدنیله شدن مثل سایر mRNAها، پلی آدنیله می‌شود. LINE RNA به سیتوزول

1- Nonviral retvotransposons
2- Long interpersed elements
3- Short interpersed elements



▶ شکل (شکل رنگی) ۱۷-۶ مکانیسم پیشنهادی رونویسی معکوس LINE و الحاق آن. بعد از سنتز ORF1 و ORF2 در سیتوزول، کمپلکسی از RNA LINE (قرمز)، چندین نسخه از ORF1 و یک نسخه از ORF2 متصل به دم پلی A بداخل هسته منتقل می‌شود. تنها پروتئین ORF2 (یک ترانس کریپتاز معکوس) نشان داده شده است، LINE DNAی تازه سنتز شده به رنگ سیاه نشان داده شده است. مرحله ❶: ORF2 در DNA کروموزومی برروی دو طرف هر توالی در دسترس غنی از A/T، برش‌های ناصاف ایجاد می‌کند. مرحله ❷: رونویسی معکوس LINE RNA بوسیله ORF2 با توالی تک رشته‌ای غنی از T حاصل از برش در رشته پائینی، شروع و رشته پائینی با دم پلی Aی LINE هیبرید می‌شود. مرحله (❸ تا ❺): ORF2، RNAی LINE را رونویسی معکوس نموده و سپس این رشته DNAی جدید را ادامه داده و به سوی ناحیه تک رشته‌ای از رشته کروموزومی بالایی به عنوان الگو، تغییر جهت می‌دهد. مرحله ❻: آنزیم‌های سلولی سپس RNA را هیدرولیز کرده و انتهای ′۳ از رشته بالایی DNA کروموزومی را امتداد داده و RNA LINE را با DNA جایگزین می‌کنند. مرحله ❼: در نهایت، انتهای ′۵ و ′۳ رشته‌های DNA به هم متصل شده و الحاق کامل می‌شود. دو مرحله آخر احتمالاً بوسیله آنزیم‌های سلولی مشترکی کاتالیز می‌شوند. این آنزیم‌ها پرایمرهای RNA را برداشته و قطعات اکازاکی را در طی همانندسازی DNA به هم متصل می‌کند.

منتقل و در آنجا به صورت پروتئین‌های ORF1 و ORF2 ترجمه می‌شود. نسخه‌های متعدد از پروتئین ORF1 به LINE RNA و پروتئین ORF2 به دم پلی A متصل می‌شوند. RNA LINE سپس به همراه پروتئین‌های ORF1 و ORF2 به هسته بازگشته و در آنجا بوسیله ORF_2 بصورت LINE DNA رونویسی معکوس می‌شود. این مکانیسم شامل شکست و ایجاد DNA سلولی با انتهای ناصاف [چسبان] در جایگاه الحاق بوده و بعد از آن رونویسی معکوس بوسیله DNA سلولی شکسته شده (همانطور که در شکل ۱۷-۶ اشاره شده است) شروع می‌شود. فرآیند کامل منجر به الحاق یک نسخه از LINE رتروترانسپوزون اصلی بداخل موقعیت جدید در DNA کروموزومی می‌شود. به دلیل شکست با انتهای ناصاف اولیه در دو رشته DNA کروموزومی، یک تکرار مستقیم کوتاه در جایگاه الحاق ایجاد می‌شود.

همانطور که اشاره شد، فرم DNAی LTR رتروترانسپوزون از فرم RNAاش در سیتوزول سنتز (شکل ۱۴-۶ را ملاحظه کنید) و سپس

به داخل هسته منتقل و در آنجا بوسیله یک اینتگراز رمزدهی و توسط رتروترانسپوزون به داخل DNA کروموزومی ملحق می‌شود. در مقابل، فرم DNAی یک رتروترانسپوزون غیر LTR سنتز اولین رشته از DNAی رتروویروسی غیر LTR بوسیله ORF2 (یک ترانس کریپتاز معکوس) توسط انتهای ′۳DNA کروموزومی برش یافته شده، آغاز می‌شود. این انتهای ′۳ با دم پلی A در هر RNA رتروویروسی غیر LTR جفت می‌گردد (شکل ۱۷-۶را ملاحظه کنید مرحله ۲). چون سنتز DNA با برش انتهای کروموزومی شکسته شده، شروع می‌شود و سنتز رشته دیگر از DNA رتروترانسپوزون‌های غیر LTR از انتهای ′۳ کروموزومی در سمت دیگر برش اولیه در DNA کروموزومی آغاز می‌شود (مرحله 6)، مکانیسم سنتز منجر به افزوده شدن DNA رتروترانسپوزون غیر LTR می‌گردد. برای الحاق DNA رتروترانسپوزون، نیازی به اینتگراز نیست.

اکثر LINEها در ژنوم انسان در انتهای ′۵ خود کوتاه شده‌اند، و این موضوع بیانگر این است که رونویسی معکوس قبل از تکمیل شدن، پایان می‌یابد و قطعات حاوی طول‌های متغیری از دم پلی A ایجاد شده و به ژنوم ملحق می‌شوند. بدلیل این کوتاه شدن، اندازه متوسط عناصر LINE تنها در حدود ۹۰۰ جفت باز است با اینکه احتمال می‌رود طول کامل توالی در حدود ۶ کیلوباز باشد. عناصر LINE کوتاه شده، وقتی تشکیل می‌شوند، احتمالا دیگر جابجا نمی‌شوند چون فاقد پروموتر برای تشکیل RNA حدواسط در جابجایی هستند. علاوه بر این حقیقت که اکثر الحاق‌های L1 کوتاه شده هستند، تقریباً همه عناصر با طول کامل، حاوی کدون‌های توقف و جهش‌های تغییر قالب در ORF1 و ORF2 می‌باشند: این جهش‌ها احتمالا طی دوره تکاملی در اغلب توالی‌های LINE انباشته شده است. به عنوان یک پیامد، تنها در حدود ۰/۰۱ درصد از توالی‌های LINE در ژنوم انسان، دارای طول کامل با قالب‌های قابل خواندن دست نخورده برای ORF1 و ORF2 بوده و در کل ۶۰الی ۱۰۰ عدد را از کل تعدادها [LINE ها] را شامل می‌شوند.

SINEها: دومین دسته فراوان از عناصر متحرک در ژنوم انسان بوده و در حدود ۱۳ درصد از کل DNAی ژنومی انسان را تشکیل می‌دهند. طولشان در حدود ۱۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز است، این رتروترانسپوزون‌ها، پروتئین رمزدهی نمی‌کنند بلکه همچون LINEها اغلب حاوی توالی ′۳ غنی از A/T می‌باشند. SINEها بوسیله همان RNA پلیمراز هسته‌ای رونویسی می‌گردند که ژن‌های رمزدهی‌کننده tRNAها، 5SrRNAها و RNAهای پایدار کوچک دیگر را رونویسی می‌نمایند. به احتمال زیاد، پروتئین‌های ORF1 و ORF2 بیان شده از روی LINEها با طول کامل، بوسیله مکانیسم نشان داده شده در شکل ۱۷-۶ رونویسی معکوس و افزودن SINEها را انجام می‌دهند. در نتیجه، SINEها می‌توانند به عنوان انگل‌های همزیست LINE در نظر گرفته شوند و با LINE RNAها برای اتصال رونویسی معکوس/ الحاق بوسیله LINE رمزدهی‌کننده ORF1 و ORF2، رقابت کنند.

SINEها حدودا ۱/۶ میلیون جایگاه را در ژنوم انسان اشغال می‌کنند. از این تعداد در حدود ۱/۱ میلیون عناصر Alu[1] بوده و به این نام موسوم‌اند، چون اغلب آنها حاوی یک جایگاه شناسایی منفرد برای آنزیم محدود کننده AluI می‌باشند. عناصر Alu تا حد زیادی با 7SL RNA همولوژی توالی نشان داده و احتمالا از آن تکامل یافته‌اند. RNA77SL RNA سیتوزولی بوده و در یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی بنام جز تشخیص سیگنال (SRP)[2] یا می‌باشد. این جز ریبونوکلئوپروتئینی سیتوزولی، به هدف یابی پلی پپتیدهای خاص، بسوی غشاهای شبکه آندوپلاسمی کمک می‌کند (فصل ۱۳). عناصر Alu در سرتاسر ژنوم انسان در جایگاههایی پراکنده‌اند که الحاق آنها بیان ژن را از بین نمی‌برد، یعنی میان ژن‌ها، در داخل اینترون‌ها و در نواحی غیرقابل ترجمه ′۳ برخی از mRNAها الحاق می‌شوند. برای مثال ۹ عنصر Alu در داخل دسته ژنی β-گلوبین انسانی قرار گرفته‌اند. (شکل ۴a-۶). از یک رتروترانسپوزیشن غیر LTR در سلول‌های لایه زایشی جدید که تخمین زده می‌شود بازای هر ۸ فرد یکی وجود داشته باشند، تقریباً ۴۰ درصد حاوی L1 و ۶۰ درصد حاوی SINE هستند و از بین SINEها، حدود ۹۰ درصد عناصر Alu می‌باشند (به یاد داشته باشید، تقریباً همه الحاق‌های جدید در DNA انسانی، شامل رتروترانسپوزون‌ها هستند).

اغلب SINEها همچون عناصر متحرک دیگر، از زمان الحاق‌شان در لایه زایشی جدکهن انسان‌های مدرن، تجمع پیدا کرده‌اند. مثل LINEها، تعداد زیادی از SINEها نیز در انتهای ′۵ خود کوتاه شده‌اند.

RNAهای رتروترانسپوز شده دیگری در DNA ژنومی یافت می‌شوند

علاوه بر عناصر متحرک فهرست شده در جدول ۱-۶ به نظر

1- Alu elements

2- Signal Recognition Particle

می‌رسد نسخه‌های DNA از دسته وسیعی از mRNAها، به داخل DNA کروموزومی اضافه شده‌اند. چون این توالی‌ها فاقد اینترون‌ها بوده و توالی‌های دو طرف آنها همچون توالی‌های دو طرف موجود در نسخه‌های ژن عملکردی را ندارند، همانطور که قبلا مورد بحث قرار گرفت (شکل ۶-۴a را ملاحظه کنید) به وضوح می‌گوید این ژن‌ها حاصل مضاعف شدن ساده نیستند که طی آن بصورت غیرعملکردی درآمده و ژن‌های کاذب را تشکیل داده باشند. در عوض بنظر می‌رسد این قطعات DNA نسخه‌های رتروترانسپوز شده از mRNA پیرایش و پلی آدنیله شده باشند. در مقایسه با ژن‌های طبیعی رمزدهی‌کننده mRNAها، این قطعات افزوده شده عموما حاوی جهش‌های متعددی بوده و گمان می‌رود این جهش‌ها انباشته شده باشند، چون mRNAهای آنها اولین بار رونویسی معکوس شده و بصورت تصادفی بداخل ژنوم سلول جنسی در یک جد باستانی ادغام شده‌اند. این نسخه‌های ژنومی غیرعملکردی از mRNAها به عنوان **ژن‌های کاذب پردازش شده**[1] شناخته می‌شوند. اغلب ژن‌های کاذب پردازش شده بوسیله تکرارهای مستقیم کوتاه از دو طرف احاطه شده‌اند و از این فرضیه حمایت می‌کند که این ژن‌های کاذب بوسیله رویدادهای رتروترانسپوز شدن نادر که mRNAهای سلولی را دربرمی‌گیرند، به وجود آمده‌اند. تکرارهای پراکنده دیگر که نشان دهنده نسخه‌های ناقص یا جهش یافته ژن‌های رمزدهی‌کننده RNAهای کوچک هسته‌ای (snRNAs) و tRNAها می‌باشند، در ژنوم پستانداران یافت می‌شوند. همانند ژن‌های کاذب حاصل از mRNAها، این نسخه‌های غیرعملکردی از ژن‌های RNA کوچک، بوسیله تکرارهای مستقیم کوچک از دو طرف احاطه شده و به احتمال زیاد از وقایع رتروترانسپوز شدن نادر که در طی تکامل انباشته شده‌اند، حاصل می‌شوند. تصور می‌شود آنزیم‌های بیان شده از یک LINE همه این رویدادهای رتروترانسپوز شدن را که خود شامل mRNAها، SnRNAها و tRNAها است را انجام داده‌اند.

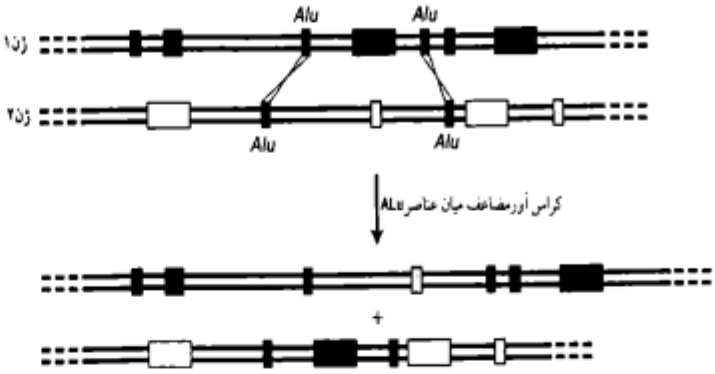
عناصر DNA متحرک بطور چشم‌گیری تکامل را تحت تاثیر قرار داده‌اند

اگرچه بنظر می‌رسد عناصر DNA متحرک دارای هیچ عملکرد مستقیمی بجز حفظ بقای خود نیستند اما وجود آنها تاثیر عمیقی روی تکامل موجودات زنده امروزی داشته است. همانطور که قبلا ذکر شد، تقریباً نیمی از جهش‌های خودبخودی در دروزوفیلا از اضافه شدن یک عنصر DNA متحرک بداخل یا نزدیک یک واحد رونویسی حاصل شده‌اند. در پستانداران، عناصر متحرک سهم خیلی کمتری از جهش‌های خودبخودی را به خود اختصاص می‌دهند: تقریباً ۱۰ درصد در موش و تنها ۰/۲-۰/۱ درصد در انسان. با وجود این، عناصر متحرک در آلل‌های جهش یافته با چندین بیماری ژنتیکی انسان مرتبط هستند. برای مثال، الحاق به داخل ژن IX فاکتور انعقاد خون، باعث هموفیلی شده و افزوده شدن به داخل ژن رمزدهی‌کننده پروتئین ماهیچه‌ای دیستروفین منجر به دیستروفی میوتونیک معروف به دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن می‌شود. ژن‌های رمزدهی‌کننده فاکتور IX و دیستروفین هر دو روی کروموزم X هستند. چون ژنوم جنس نر تنها دارای یک نسخه از کروموزوم X است، الحاق به داخل این ژن‌ها بصورت غالب بر جنس نر تاثیر دارد. در اجداد یوکاریوت‌های عالی، نوترکیبی همولوگ میان عناصر DNA متحرک پراکنده در سرتاسر ژنوم اجدادی ممکن است، مضاعف شدن ژن و نوآرایی‌های دیگر DNA را در طی تکامل ایجاد کرده باشد. (شکل ۶-۲b را ملاحظه کنید). برای مثال، کلون کردن و تعیین توالی دسته ژن β-گلوبین از گونه‌های مختلف نخستینیای شواهد محکمی دال بر ایجاد ژن‌های $G\gamma$ و $A\gamma$ انسان از یک کراسینگ‌آور همولوگ نابرابر بین دو توالی L1 موجود در دو طرف ژن گلوبین اجدادی، فراهم کرده است. واگرایی بعدی این ژن‌های مضاعف شده می‌تواند منجر به کسب عملکردهای سودمند و متفاوت مرتبط با هر عضو از یک خانواده ژنی شود. کراسینگ آور نابرابر بین عناصر متحرک قرار گرفته در داخل اینترون‌های یک ژن، می‌تواند باعث مضاعف شدن اگزون‌ها در داخل آن ژن شود (شکل ۶-۲a را ملاحظه کنید). این فرآیند به احتمال زیاد تکامل ژن‌هایی را تحت تاثیر قرار داد که حاوی نسخه‌های متعدد از اگزون‌های مشابه بوده و دمین‌های پروتئینی مشابه را رمزدهی می‌نمایند، مثل ژن فیبرونکتین (شکل ۱۶-۴ را ملاحظه کنید).

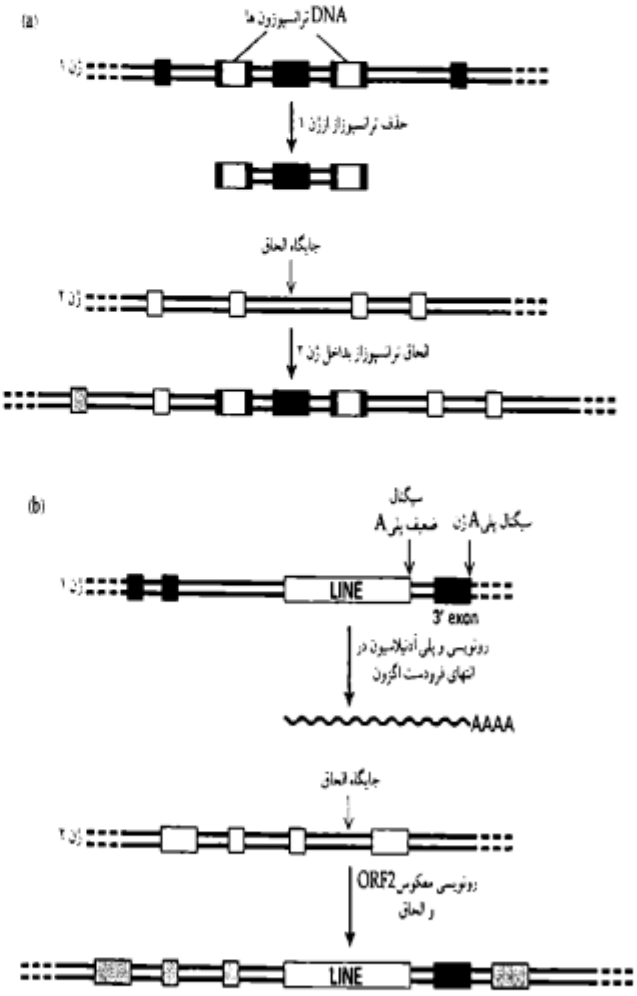
برخی شواهد حاکی از آن هستند که در طی تکامل یوکاریوت‌های عالی، نوترکیبی میان عناصر DNA متحرک (مثل عناصر Alu) در اینترون‌های دو ژن مجزا نیز اتفاق افتاده و باعث ایجاد ژن‌های جدیدی شده که از نوترکیبی‌های جدید اگزون‌های از پیش موجود حاصل شده‌اند. (شکل ۱۸-۶). این فرآیند تکاملی که **تلاطم اگزونی**[2] نامیده شده و احتمالا در طی تکامل ژن‌های رمزدهی‌کننده گیرنده Neu، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی و فاکتور رشد اپیدرمال رخ داده است که همگی دارای دمین EGF هستند. (شکل ۱۱-۳ را

1- Processed pseudogenes

2- Exon shoffling



◀ شکل ۱۸-۶ (شکل رنگی) تلاطم اگزونی از طریق نوترکیبی میان تکرارهای پراکنده هومولوگ. رونویسی میان تکرارهای پراکنده در اینترون‌های ژن‌های جداگانه، واحدهای رونویسی با یک ترکیب جدید از اگزون را ایجاد می‌نماید (سبز و آبی). در مثال نشان داده شده در اینجا، یک کراسینگ آور مضاعف بین دو سری از عناصر Alu (فراوانترین SINEها در انسان) به تبادل اگزون‌ها میان دو ژن منجر می‌شود.



◀ شکل ۱۹-۶ (شکل رنگی) تلاطم اگزونی از طریق جابجایی یک DNA ترانسپوزون یا LINE رتروترانسپوزون (a) جابجایی یک اگزون (آبی) احاطه شده بوسیله DNA ترانسپوزون‌های هومولوگ به داخل یک اینترون از ژن دوم. همانطور که در شکل ۱۰-۶ دید. مرحله (۱) دیدیم، ترانسپوزاز می‌تواند DNA را در انتهاهای تکرارهای معکوس ترانسپوزون شناسایی کرده و بشکند. در ژن ۱، اگر ترانسپوزاز در انتهای چپ ترانسپوزون در سمت چپ و در انتهای راست ترانسپوزون در سمت راست شکست ایجاد کند، هر DNA موجود در بین این دو قسمت که شامل اگزون از ژن ۱ جایگاه جدید در اینترون ژن ۲ جابجا می‌کند. نتیجه خالص این امر، الحاق اگزون از ژن ۱ به ژن ۲ می‌باشد. (b) قرارگیری اگزون در داخل یک ژن دیگر، از طریق جابجایی یک LINE حاوی یک سیگنال پلی A ضعیف. اگر یک چنین LINE در انتهایی‌ترین اینترون ′۳ از ژن ۱ باشد، رونویسی LINE بصورت یک RNA واسط ممکن است به بیرون از جایگاه پلی A آن ادامه و به داخل اگزون ′۳ امتداد یابد و جایگاه شکست و پلی آدنیله شدن خود ژن ۱ را رونویسی نماید. این RNA می‌تواند سپس رونویسی معکوس شده و بوسیله پروتئین LINE ORF2 (شکل ۱۷-۶ را ملاحظه کنید) در داخل اینترون ژن ۲ قرار گرفته و اگزون ′۳ جدیدی را (از ژن ۱) در داخل ژن ۲ ایجاد نماید.

ملاحظه کنید). در این مورد، تلاطم اگزونی بصورت فرضی منجر به افزوده شدن یک اگزون رمزدهی‌کننده دمین EGF به داخل اینترون شکل اجدادی هر یک از این ژن‌ها شده است.

هم DNA ترانسپوزون‌ها و هم LINE رتروترانسپوزون‌ها نشان داده شده که هنگام جابجا شدن به جایگاههای جدید، به وسیله مکانیسم‌های رسم شده در شکل ۱۹-۶ گهگاهی توالی‌های کناری بی‌ارتباط را حمل می‌کنند. این مکانیسم‌ها نیز احتمالا با تلاطم اگزونی در طی تکامل ژن‌های معاصر در ارتباط هستند.

علاوه بر ایجاد تغییرات در توالی‌های رمزدهی‌کنندهٔ ژنوم، نوترکیبی میان عناصر متحرک و ترانسپوز شدن DNA مجاور DNA ترانسپوزون‌ها و رتروترانسپوزون‌ها احتمالا نقش مهمی را در تکامل توالی‌های تنظیمی، که بیان ژن را کنترل می‌کنند، ایفا می‌نمایند. همانطوریکه قبلا ذکر شد، ژن‌های یوکاریوتی دارای نواحی کنترل رونویسی بنام تشدید کننده‌ها هستند. تشدید کننده‌ها می‌توانند از فواصل ده‌ها یا هزاران جفت باز دورتر عمل کنند. رونویسی تعداد زیادی از ژن‌ها از طریق تاثیرات تلفیقی چندین عنصر تشدید کننده کنترل می‌شود. اضافه شدن عناصر متحرک نزدیک چنین نواحی کنترل رونویسی، احتمالا با تکامل ترکیبات جدیدی از توالی‌های تشدید کننده، مرتبط می‌باشد. همانطور که در فصل بعدی خواهیم دید، این عناصر بیان ژن‌های خاصی را در سلول‌های خاص و همچنین میزان پروتئین رمزدهی شده تولیدی در موجودات زنده کنونی را کنترل می‌کنند.

این بررسی‌ها پیشنهاد می‌کنند، نگرش اولیه به عناصر DNA متحرک به عنوان انگل‌های مولکولی کاملا خودخواه اهمیت خود را از دست می‌دهد. اخیرا دیده شده این عناصر سهم عمده‌ای را در تکامل موجودات عالی از طریق: ۱) ایجاد خانواده‌های ژنی از طریق مضاعف شدن ژنی، ۲) خلق نسخه‌های جدید از طریق تلاطم اگزونهای از پیش موجود و ۳) تشکیل نواحی تنظیمی پیچیده‌تر که کنترل چند جانبه بیان ژن را باعث می‌شوند، داشته‌اند. امروزه، محققان در تلاش هستند تا مکانیسم جابجایی را برای افزودن ژن‌های درمانی به بیماران به عنوان شکلی از ژن درمانی، به خدمت بگیرند.

نکات کلیدی بخش ۳ - ۶

عناصر DNA قابل انتقال (متحرک)

■ عناصر DNA با قابلیت تحرک، توالی‌های نسبتاً تکرار شده‌ای هستند که در جایگاههای متعدد سرتاسر ژنوم یوکاریوت‌های عالی پراکنده‌اند. این عناصر در ژنوم‌های پروکاریوتی از فراوانی کمتری برخوردار هستند.

■ DNA ترانسپوزون‌ها بصورت DNA مستقیماً به جایگاههای جدیدی جابجا می‌شوند. رتروترانسپوزون‌ها اول بصورت یک نسخه RNA از عنصر رونویسی شده، سپس بصورت DNA رونویسی معکوس می‌شوند. (شکل ۸-۶ را ملاحظه کنید).

■ ویژگی مشترک همه عناصر متحرک، وجود تکرارهای مستقیم کوتاه در طرفین توالی می‌باشد.

■ آنزیم‌های رمزدهی شده توسط ترانسپوزون‌ها، خودشان الحاق این توالی‌ها را در جایگاههای جدید در DNA ژنومی کاتالیز می‌نمایند.

■ اگر چه DNA ترانسپوزون‌ها از لحاظ ساختاری شبیه عناصر IS باکتریایی هستند .اما در یوکاریوتها وجود دارند (مثل عنصر P در دروزوفیلا)، رتروترانسپوزون‌ها بویژه در مهره‌داران خیلی فراوان هستند.

■ LTR رتروترانسپوزون‌ها بوسیله تکرارهای پایانی طویل (LTRs)، مشابه تکرارهای موجود در DNA رتروویروسی، از طرفین احاطه شده‌اند. LTRها، ترانس کریپتاز معکوس و اینتگراز را رمزدهی می‌نمایند. آنها در ژنوم بوسیله رونویسی بصورت RNA جابجا می‌گردند و سپس این RNA در سیتوزول دستخوش رونویسی معکوس شده و DNA حاصل دارای LTRها به هسته وارد شده و در داخل کروموزوم سلول میزبان قرار می‌گیرد. (شکل ۱۴-۶ راملاحظه کنید).

■ رتروترانسپوزون‌های غیر LTR که LINEها و SINEها را در برمی‌گیرند، فاقد LTR بوده و دارای یک بخش غنی از A/T در یک انتهای خود هستند. تصور می‌شود آنها بوسیله یک مکانیسم جابجایی غیر ویروسی و با واسطه پروتئین‌های رمزدهی شده توسط LINE جابجا می‌شوند که شامل شروع رونویسی بوسیله DNA کروموزومی است. (شکل ۱۷-۶ را ملاحظه کنید).

■ توالی‌های SINEهومولوژی زیادی با RNAهای سلولی نشان داده و بوسیله RNA پلیمراز رونویسی کننده RNAهای سلولی، رونویسی می‌شوند. عناصر Alu (رایج‌ترین SINEها در انسان) توالی‌ها حدوداً ۳۰۰ جفت بازی بوده و بطور پراکنده در سراسر ژنوم انسانی یافت می‌شوند.

■ برخی تکرارهای پراکنده از RNAهای سلولی مشتق می‌شوند که رونویسی معکوس شده و در DNA ژنومی در دوره‌ای از تاریخ تکاملی قرار گرفته‌اند. ژن‌های کاذب پردازش

شده از mRNAهای فاقد اینترون حاصل می‌شوند و این ویژگی است که آنها را از ژن‌های کاذب پدید آمده بوسیله تغییر توالی ژن‌ها، متمایز می‌سازد.

■ عناصر DNA متحرک به احتمال زیاد با به کار گرفته شدن به عنوان جایگاههای نوترکیبی و به حرکت درآوردن توالی‌های DNAمجاور، تکامل را بطور چشمگیری تحت تأثیر قرار داده‌اند.

۶-۴ DNAهای اندامکی

اگرچه اکثریت قریب به اتفاق DNA در اغلب یوکاریوت‌ها در هسته یافت می‌شود، مقداری DNA نیز در داخل میتوکندری حیوانات، گیاهان و قارچ‌ها و در داخل کلروپلاست‌های گیاهان وجود دارد. این اندامک‌ها جایگاههای اصلی سلولی برای تشکیل ATP در طی فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و فتوسنتز در کلروپلاست‌ها، هستند (فصل ۱۲). شواهد زیادی حاکی از آن است که میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، از باکتری‌هایی بوجود آمده‌اند که به داخل سلول‌های اجدادی دارای هسته یوکاریوتی اندوسیتوز شده‌اند و **درون همزیست‌ها**[1] را تشکیل داده‌اند (شکل ۲۰-۶). در طی دوره تکاملی، اغلب ژن‌های باکتریایی از DNAهای اندامکی حذف شده‌اند. برخی مثل ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین‌های درگیر در سنتز نوکلئوتید، لیپید و اسید آمینه از دست رفته‌اند زیرا عملکرد آنها بوسیله ژن‌های موجود در هسته سلول یوکاریوتی انجام می‌شود. ژن‌های دیگر رمزدهی‌کننده اجزای اندامک‌های امروزی به هسته منتقل شده‌اند. با وجود این، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها در یوکاریوتهای امروزی DNA رمزدهی‌کننده برخی پروتئین‌های ضروری برای عملکرد اندامک و همچنین rRNAها و tRNAهای لازم برای سنتز این پروتئین‌ها را حفظ کرده‌اند. در نتیجه، سلول‌های یوکاریوتی دارای سیستم‌های ژنتیکی چندگانه هستند: یک سیستم هسته‌ای غالب و سیستم ثانویه با DNA، ریبوزوم‌ها و tRNAهای خاص خود در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها.

میتوکندری‌ها، حاوی مولکولهای mtDNA متعددی هستند

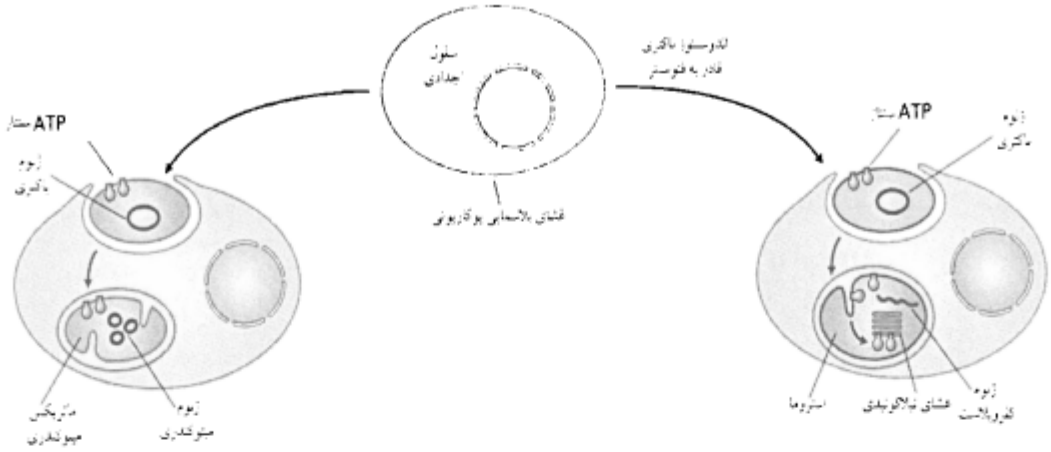
میتوکندری‌های افراد به اندازه‌ای بزرگ هستند که زیر میکروسکوپ نوری دیده شده و حتی DNA میتوکندریایی (mtDNA) می‌تواند بوسیله میکروسکوپ فلورسانس تشخیص داده شود. mtDNA در فضای درونی میتوکندری که به ماتریکس معروف است، قرار گرفته است. (شکل ۶-۱۲ را ملاحظه کنید). همان طور از روی تعداد نقاط فلورسنت زرد mtDNA دیده می‌شود، یک سلول *Euglena gracilis* (**اوگلنا**) حداقل ۳۰ مولکول mtDNA دارند. (شکل ۲۱-۶).

همانندسازی mtDNA و تقسیم شبکه میتوکندریایی در سلول‌های زنده را می‌توان با استفاده از میکروسکوپ دنبال کرد. چنین مطالعاتی نشان می‌دهد که در اغلب موجودات، mtDNA در اینترفاز همانندسازی می‌نماید. در میتوز، هر سلول دختر تقریباً به تعداد مساوی میتوکندری را دریافت می‌کند اما چون هیچ مکانیسمی برای تقسیم دقیقاً مساوی میتوکندری‌ها به سلول‌های دختر وجود ندارند، برخی سلول‌ها نسبت به سلول‌های دیگر mtDNAی بیشتری را دارند. با جداسازی میتوکندری‌ها از سلول‌ها و آنالیز DNA استخراج شده از آنها، می‌توان مشاهده نمود که هر میتوکندری، مولکول‌های mtDNA متعددی را دارند. بنابراین میزان کل mtDNA در یک سلول به تعداد میتوکندری‌ها، اندازه mtDNA و تعداد مولکول‌های mtDNA در هر میتوکندری بستگی دارد. هر یک از این پارامترها بین انواع سلولی مختلف، متفاوت می‌باشند.

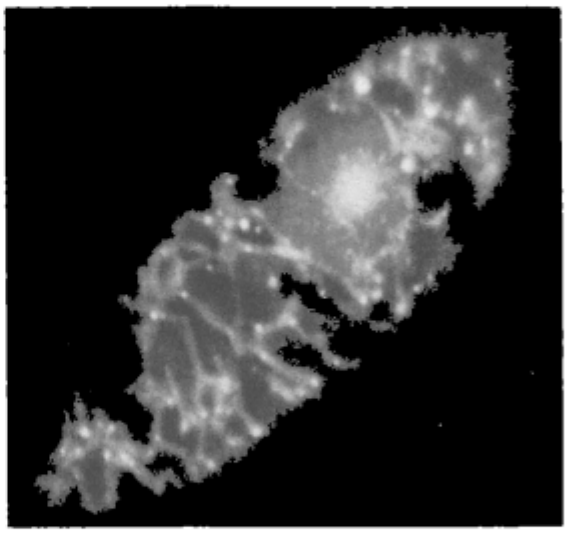
mtDNA از طریق سیتوپلاسم به نسل بعد منتقل می‌شود.

مطالعات جهش یافته‌ها در مخمرها و موجودات تک سلولی دیگر اولین بار بیان کرد میتوکندری دارای **توارث سیتوپلاسمی**[2] می‌باشد و در نتیجه باید سیستم ژنتیکی خاص خود را دارا باشد. (شکل ۲۲-۶). برای مثال، جهش یافته‌های Petite از نظر ساختاری، میتوکندری غیرمعمول دارند. این میتوکندری‌ها قادر به فسفریلاسیون اکسیداتیو نیستند و در نتیجه سلول‌های Petite کندتر از مخمرهای نوع وحشی رشد کرده و کلونی‌های کوچکتری را تشکیل می‌دهند. آمیزش‌های ژنتیکی میان سوش‌های مختلف مخمر (هاپلوئید) نشان داد که جهش Petite به هیچ ژن یا کروموزوم هسته‌ای مربوط نمی‌شود. در مطالعات بعدی، مشخص شد اغلب جهش یافته‌های Petite دارای حذف‌هایی در mtDNA هستند. در جفت‌گیری بوسیله **ادغام**[3] سلول‌های مخمر هاپلوئید، هر دو والد بطور یکسان در سیتوپلاسم حاصل، سهیم هستند. در نتیجه وراثت میتوکندری دو والدی است. با وجود این در پستانداران و موجودات پرسلولی دیگر، اسپرم سیتوپلاسم خیلی کمی را به سلول تخم ارائه داده و تقریباً همه میتوکندری‌ها در جنین از میتوکندری‌های تخمک

1- Endosymbionts
2- Cytoplasmic inheritance
3- Fusion



▲ **شکل ۲۰-۶ (شکل رنگی) مدلی برای منشا درون همزیستی میتوکندری و کلروپلاست.** درون همزیستی یک باکتری بوسیله یک سلول یوکاریوتی اجدادی، یک اندامک با دو غشا بوجود می‌آورد. غشای خارجی از غشای پلاسمایی (خاکستری) و غشای درونی از غشای پلاسمایی باکتری (قرمز) مشتق می‌گیرند. پروتئین‌های واقع شده در غشای پلاسمایی باکتری‌های اجدادی، جهت‌گیری خود را حفظ کرده‌اند، بطوریکه بخشی از پروتئین که قبلا با فضای خارج سلولی مواجه بوده‌اند اکنون در معرض فضای بین غشایی قرار می‌گیرند. جوانه زنی وزیکول‌ها از غشا داخلی کلروپلاست که برای مثال در طی تکاملی کلروپلاست‌ها در گیاهان امروزی رخ می‌دهد، غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست‌ها را بوجود آورده است. DNAهای اندامکی نشان داده شده است.



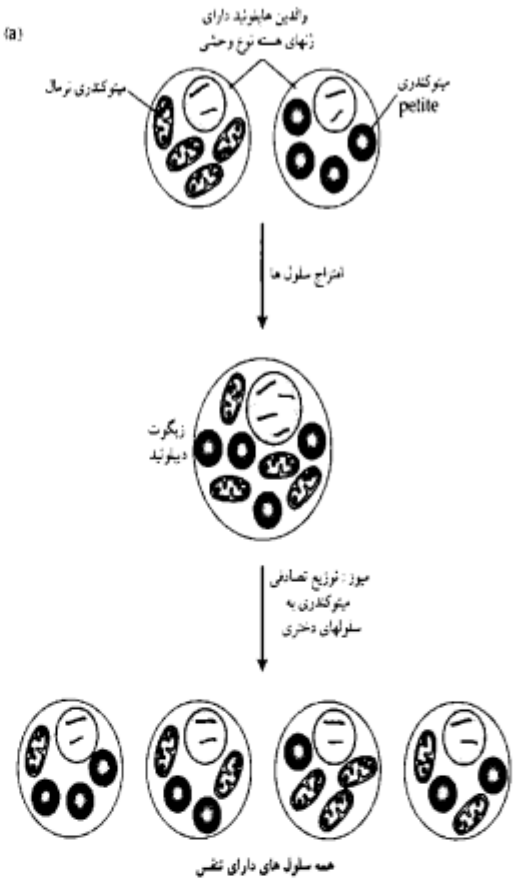
◀**شکل تجربی ۲۱-۶ (شکل رنگی) رنگ‌آمیزی، مولکولهای DNA میتوکندریایی متعددی را در سلول *Euglena gracilis* نشان می‌دهد.** سلول‌ها با مخلوطی از دو رنگ تیمار شدند: اتیدیوم بروماید، که به DNA متصل شده و یک فلورسانس قرمز ساطع می‌کند و رنگ Dioc6، این رنگ بصورت اختصاصی در داخل میتوکندری قرار می‌گیرد و فلورسانس سبز ساطع می‌نماید. در نتیجه هسته فلورسانس قرمز ساطع کرده و نواحی غنی از DNA میتوکندریایی رنگ زرد را ساطع می‌کند. یعنی ترکیبی از فلورسانس قرمز DNA و سبز میتوکندری.

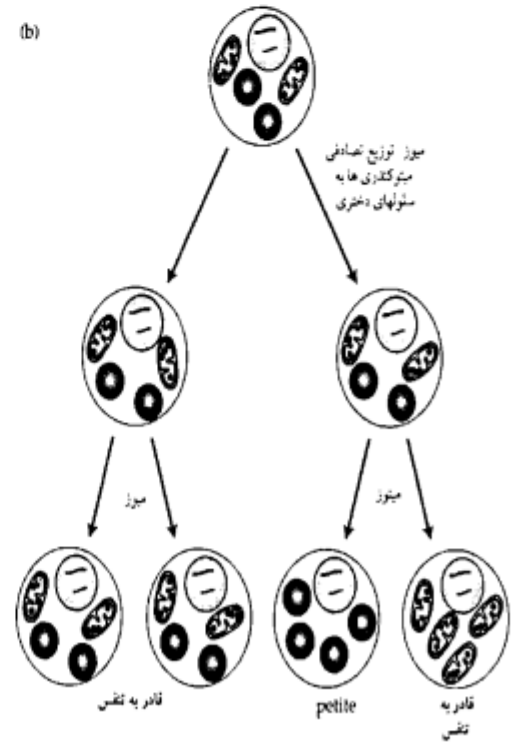
منشا می‌گیرند. مطالعات بر روی موش نشان داده است که ۹۹/۹۹ درصد از mtDNA از طریق مادر و بخش کوچکی در حدود ۰/۰۱ درصد از والد پدری به ارث می‌رسد. در گیاهان عالی، mtDNA استثناءاً به صورت تک والدی و از طریق والد مادری (تخمک) و نه پدری (گرده) به ارث می‌رسد.

اندازه، ساختار و ظرفیت رمزدار کردن mtDNA میان موجودات زنده بصورت قابل ملاحظه‌ای متغیر است

بطور شگفت آوری، اندازه mtDNA، تعداد و طبیعت پروتئین‌هایی که رمزدهی می‌کند و حتی خود رمز ژنتیکی میتوکندریایی، بین موجودات زنده مختلف، متفاوت است. mtDNAهای اغلب حیوانات پرسلولی مولکول‌های حلقوی حدودا ۱۶ کیلوبازی بوده و ژن‌های فاقد اینترون که بصورت فشرده بر روی هر رشته DNA آرایش یافته‌اند، را رمزدهی می‌کنند. mtDNAهای مهره‌داران، دو rRNA موجود در ریبوزوم‌های میتوکندریایی، ۲۲ تا tRNA مورد استفاده برای ترجمه mRNAهای میتوکندری و ۱۳ پروتئین درگیر در انتقال الکترون و سنتز ATP را رمزدهی می‌نمایند (بخش ۱۲). کوچکترین ژنوم میتوکندریایی شناخته شده در **پلاسمودیوم**[1] وجود دارد.

1- Plasmodium



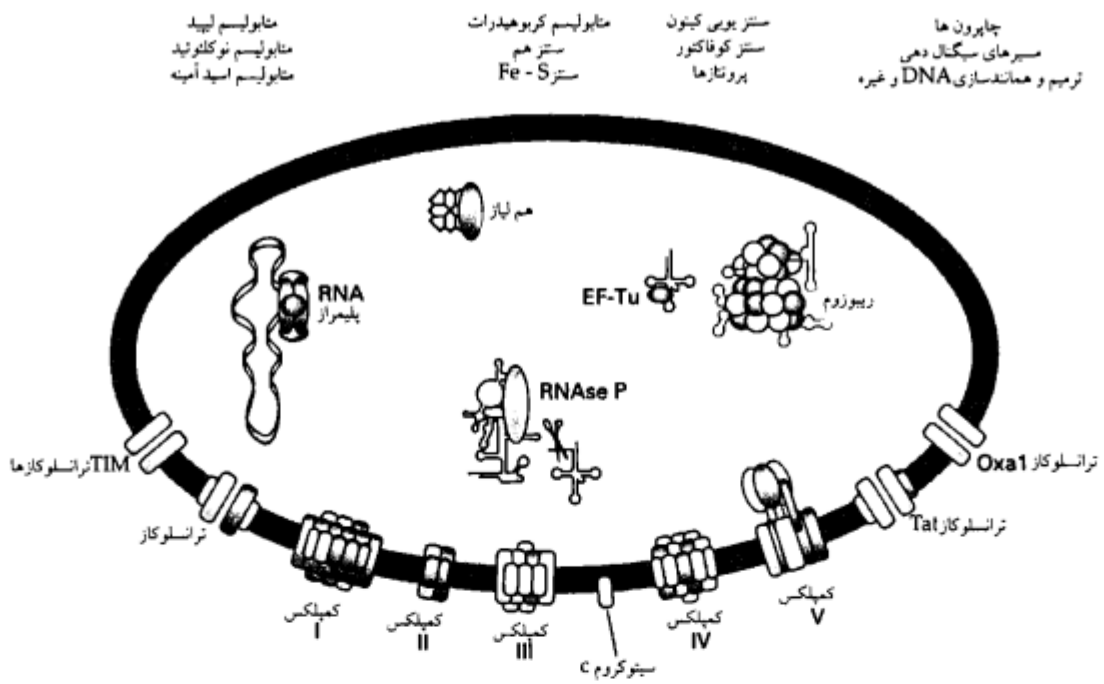


▶ شکل ۲۲-۶ (شکل رنگی) توارث سیتوپلاسمی جهش Petite در مخمر. میتوکندری‌های سوش Petite بواسطه حذفی در mtDNA دارای نقص در فسفریلاسیون اکسیداتیو هستند. (a) سلول‌های هاپلوئید ادغام شده‌اند تا یک سلول دیپلوئید تولید کنند. این سلول دیپلوئید دستخوش میوز شده و طی آن کروموزوم‌های والدینی و میتوکندری‌های حاوی mtDNA بطور تصادفی تفکیک می‌شوند. به خاطر داشته باشید، آلل‌ها در ژن‌های DNA هسته‌ای بوسیله کروموزوم‌های هسته‌ای کوچک و بزرگ به رنگ قرمز و آبی نشان داده شده‌اند و در طی میوز بصورت ۲:۲ تفکیک می‌شوند. (شکل ۵-۵ را ملاحظه کنید) چون مخمر بصورت طبیعی حدودا دارای ۵۰ مولکول mtDNA در هر سلول است، همه محصولات میوز بطور معمول حاوی هر دو mtDNA طبیعی و Petite بوده و قادر به تنفس می‌باشند. (b) وقتی این سلول‌های هاپلوئید رشد کرده و بصورت میتوز تقسیم شدند، سیتوپلاسم (حاوی میتوکندری‌ها) بصورت تصادفی در سلول‌های دختری توزیع می‌گردد. گاهی اوقات، سلولی تولید می‌شود که تنها حاوی mtDNA ناقص Petite بوده و یک کلونی Petite را ایجاد می‌کند. در نتیجه، تشکیل این سلول‌های Petite مستقل از هر عامل ژنتیکی هسته‌ای می‌باشد.

پلاسمودیوم، تک سلولی بوده و انگل اجباری درون سلولی است که در انسان باعث مالاریا می‌شود. mtDNAهای پلاسمودیوم تنها حدود ۶ کیلوباز طول داشته و ۵ پروتئین و rRNAهای میتوکندریایی را رمزدهی می‌کنند.

کل ژنوم میتوکندریایی تعدادی از موجودات متازوآی مختلف تاکنون کلون و تعیین توالی شده و mtDNAهای همه این منابع پروتئین‌های میتوکندریایی ضروری را رمزدهی می‌کنند. (شکل ۲۳-۶). همه پروتئین‌های رمزدهی شده بوسیله mtDNA توسط ریبوزوم‌های میتوکندری سنتز می‌شوند.

اغلب پلی پپتیدهای سنتز شده توسط میتوکندری که تا به امروز شناسایی شده‌اند، زیرواحدهایی از کمپلکس‌های چند زیرواحدی بوده و در انتقال الکترون، سنتز ATP یا قرار دادن پروتئین‌ها در داخل غشای داخلی میتوکندری یا فضای بین غشایی، به کار می‌روند. با وجود این، اغلب پروتئین‌های قرار گرفته در میتوکندری مثل پروتئین‌های درگیر در فرآیندهای مذکور در بالای شکل ۲۳-۶، بوسیله ژن‌های هسته‌ای رمزدهی و در ریبوزوم‌های سیتوزولی سنتز و بوسیله فرآیندهای بررسی شده در فصل ۱۳ به داخل اندامک منتقل می‌شوند.



▲ **شکل ۲۳-۶ (شکل رنگی) پروتئین‌های رمزدهی شده در DNA میتوکندری و نقش آنها در فرآیندهای میتوکندریایی.** تنها ماتریکس و غشای داخلی میتوکندری نشان داده شده است. اغلب اجزای میتوکندری بوسیله هسته رمزدهی می‌شوند. (آبی)؛ فرآیندهای میتوکندری که فقط بوسیله ترکیبات رمزدهی شده توسط هسته انجام می‌شوند، در بالا آورده شده‌اند. ترکیبات میتوکندری نشان داده شده به رنگ صورتی، در برخی یوکاریوت‌ها بوسیله mtDNA ولی در برخی دیگر بوسیله ژنوم هسته‌ای رمزدهی می‌شوند. ترکیبات نسبتا کمی که بصورت یکنواخت در mtDNA رمزدهی می‌شوند به رنگ نارنجی نشان داده شده‌اند. کمپلکس‌های ۱ تا ۴ در انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیو نقش دارند. TIM، Sec، Tat و Oxal ترانسلوکازها در خارج و داخل شدن پروتئین و افزودن پروتئین‌ها به داخل غشای داخلی نقش دارند (فصل ۱۳). RNaseP ریبوزیمی است که انتهای ′۵ tRNAها را پردازش می‌نماید. (فصل ۸). بایستی توجه کرد اکثر یوکاریوت‌ها دارای یک کمپلکس I چند زیرواحدی هستند، این کمپلکس سه زیرواحد داشته و بصورت یکنواخت بوسیله mtDNA رمزدهی می‌شود. با این حال در تعداد کمی از موجودات زنده (مثل سا کارومایسیس اسکیزوسا کارومایسیس و پلاسمودیوم)، این کمپلکس با یک آنزیم تک پلی پپتیدی و رمزدهی شده بوسیله هسته جایگزین می‌شود. برای جزئیات بیشتر در مورد متابولیسم میتوکندری و انتقال، فصل‌های ۱۲ و ۱۳ را ملاحظه کنید.

در مقایسه با mtDNAهای متازوآیی، mtDNAهای گیاهی چند برابر بزرگتر بوده و بیشتر DNA، پروتئین رمزدهی می‌کند. برای مثال، mtDNA در سلول مهم گیاهی *آرابیدوپسیس تالیانا* دارای ۳۶۶/۹۲۴ جفت باز است و بزرگترین mtDNA شناخته شده تقریباً دارای ۲ میلیون باز داشته و در گیاهانی همچون خیار و خربزه یافت می‌شود. بخش عمده mtDNA گیاهی حاوی اینترون‌های طویل، ژن‌های کاذب و عناصر DNA متحرک محدود به اتاقک میتوکندری و بخش‌هایی از DNA خارجی (کلروپلاست، هسته‌ای ویروسی) بوده که احتمالا در طی تکامل‌شان بداخل ژنوم میتوکندری گیاهی وارد شده‌اند. توالی‌های مضاعف شده نیز در mtDNAهای طویل‌تر وجود دارند.

اختلاف در تعداد ژن‌های رمزدهی شده بوسیله mtDNA از موجودات مختلف به احتمال زیاد جابجایی DNA میان میتوکندری و هسته را در طی تکامل نشان می‌دهد: شاهد مستقیم برای این جابجایی از این مشاهدات برمی‌آید که چندین پروتئین رمزدهی شده توسط mtDNA در برخی گونه‌ها در گونه‌های دیگر (گونه‌های خیلی نزدیک) بوسیله DNA هسته‌ای رمزدهی می‌شوند. جالب‌ترین مثال این پدیده ژن coxII است، این ژن، زیرواحد ۲ از زنجیره انتقال الکترون میتوکندری را رمزدهی می‌نماید (شکل ۱۶-۱۲ را ملاحظه کنید). ژن coxII در mtDNA همه گیاهان پرسلولی مطالعه شده، به استثنای گونه‌های خاص از حبوبات شامل سویا و لوبیای مونگ که در آنها ژن coxII هسته‌ای است یافت می‌شود.. ژن coxII کاملا از mtDNAی لوبیای مونگ حذف شده اما ژن کاذب و معیوب coxII که متحمل جهش‌های زیادی شده را می‌توان هنوز هم در

mtDNAی سویا تشخیص داد.

تعداد زیادی از رونوشت‌های RNA از ژن‌های میتوکندری گیاهی ویرایش می‌شوند، این عمل عمدتا بوسیله کاتالیز آنزیمی تبدیل ریشه‌های سیتوزین به یوریدین و گاهی تبدیل یوریدین به سیتوزین، انجام می‌گیرد (ویرایش RNA در فصل ۸ مورد بررسی قرار می‌گیرد). ژن هسته‌ای coxII از لوبیای مونگ به رونوشت‌های RNA coxII ویرایش شده، بیشتر از ژن‌های coxII میتوکندریایی موجود در حبوبات دیگر، شباهت دارد. این مشاهدات دلیل قوی بر این هستند که ژن coxII از میتوکندری بسوی هسته در طی تکامل لوبیای مونگ از طریق فرآیند دارای RNA حدواسط جابجا شده است. بصورت فرضی این جابجایی بواسطه مکانیسم رونویسی معکوس صورت می‌گیرد. این مکانیسم مشابه مکانیسمی است که طی آن ژن‌های کاذب پردازش شده در ژنوم هسته‌ای از mRNAهای رمزدهی شده توسط هسته تولید می‌شوند.

علاوه بر تفاوت‌های زیاد در اندازه mtDNAها در یوکاریوت‌های مختلف، ساختار mtDNA نیز شدیداً متغیر است. همانطور که قبلا اشاره شد، mtDNA در اغلب حیوانات یک مولکول حلقوی با حدود ۱۶ کیلوباز طول می‌باشد. با وجود این، mtDNA تعداد زیادی از موجودات زنده مثل **تتراهیمنا**[1] بصورت کنکاتامرهای سر به دم خطی از توالی تکراری وجود دارند. در یک مثال خیلی جالب، mtDNAی *Amoebidium Parasiticum* از چند صد مولکول خطی و کوتاه متفاوت درست شده و mtDNA تتراهیمنا از چندین **حلقه بزرگ**[2] در هم پیچیده با صدها **حلقه کوچک**[3] که RNAهای راهنما را رمزدهی می‌نماید، درست شده است. این RNA**های راهنما** در ویرایش توالی mRNAهای میتوکندریایی رمزدهی شده در حلقه‌های بزرگ، نقش دارند.

محصولات ژن‌های میتوکندری از آن خارج نمی‌شوند

تا جایی که شناخته شده، همه رونوشت‌های RNAی mtDNA و محصولات ترجمه آنها در جایی که تولید می‌شوند یعنی میتوکندری، باقی مانده و همه پروتئین‌های رمزدهی شده توسط mtDNA در ریبوزوم‌های میتوکندری سنتز می‌شوند. DNA میتوکندری rRNAهای تشکیل دهنده ریبوزوم میتوکندریایی را رمزدهی می‌کند، اما اغلب پروتئین‌های ریبوزومی از سیتوزول وارد می‌شوند. در حیوانات و قارچ‌ها، همه tRNAهای مورد استفاده سنتز پروتئین در میتوکندری نیز بوسیله mtDNAها رمزدهی می‌شوند. با وجود این، در گیاهان و تعداد زیادی از پروتوزوآها، اغلب tRNAهای میتوکندری بوسیله DNA هسته‌ای رمزدهی شده و بداخل میتوکندری وارد می‌شوند.

با توجه به جد باکتریایی میتوکندری، ریبوزوم‌های میتوکندری شبیه به ریبوزوم‌های باکتریایی بوده و از نظر RNA، ترکیبات پروتئینی، اندازه و حساسیت‌شان به آنتی بیوتیک‌های خاص متفاوت از ریبوزوم‌های سیتوزولی یوکاریوتی می‌باشند. (شکل ۲۲-۴ را ملاحظه کنید). برای مثال، کلرامفنیکل سنتز پروتئین بوسیله ریبوزوم‌های باکتری و میتوکندری اغلب موجودات را مهار می‌کند اما سیکلوهگزامید این اثر مهاری را ندارد. این حساسیت ریبوزوم‌های میتوکندریایی به گروه آمینوگلیکوزیدها از آنتی بیوتیک‌ها که کلرامفنیکل نیز جز آنهاست، دلیل اصلی سمیت این ترکیبات است. برعکس، ریبوزوم‌های سیتوزولی به سیکلوهگزآمید حساس و به کلرامفنیکل مقاوم می‌باشند.

میتوکندری‌ها از درون همزیستی باکتری ریکتسیا مانندی ایجاد شده‌اند

تجزیه و تحلیل توالی‌های mRNAی یوکاریوت‌های مختلف همچون پروتیست‌های تک سلولی جدا شده از یوکاریوت‌های دیگر در مراحل ابتدایی تکامل، حامی قوی این ادعا است که میتوکندری‌ها دارای یک منشا منفرد هستند. میتوکندری‌ها به احتمال زیاد از یک باکتری همزیست منشا گرفتند که نزدیک‌ترین خویشاوند امروزی آن، گروه **ریکتسیاها**[4] می‌باشند. باکتری‌های این گروه، انگل‌های درون سلولی اجباری می‌باشند. در نتیجه، جد میتوکندری نیز به احتمال زیاد یک نوع زندگی درون سلولی داشته و به منظور تکامل بصورت یک همزیست درون سلولی، در موقعیت مناسبی قرار گرفته است. mtDNAیی که بیشترین تعداد ژن‌های رمزگردان را داراست، تاکنون در گونه **رکلیناموناس آمریکانا**[5] یافت شده است. همه mtDNAهای دیگر دارای زیرمجموعه‌ای از ژن‌های رکلیناموناس آمریکانا بوده و قویا نشان می‌دهد، آنها از یک جد مشترک با رکلیناموناس آمریکانا تکامل یافته‌اند و گروههای مختلف ژن‌های میتوکندری با حذف یا انتقال به هسته در طی زمان از دست رفته‌اند. در موجوداتی که mtDNA آنها تنها تعداد محدودی ژن دارد، همان دسته از ژن‌های میتوکندری باقیمانده و مستقل از شجره تکاملی‌شان حفظ می‌شوند. (شکل ۲۳-۶، پروتئین‌های نارنجی را ملاحظه کنید).

1- Tetrahymena
2- Maxicireles
3- Minicirele
4- Rickettiace
5- ReclinoMonas Amenicaca

جدول ۳-۶ جایگزین‌های رمز ژنتیکی در میتوکندری

کدون	رمز استاندارد*	میتوکندری				
		پستانداران	دروزوفیلا	نوروسپورا	مخمر	گیاهان
UGA	خاتمه	Trp	Trp	Trp	Trp	خاتمه
AGA,AGG	Arg	خاتمه	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	ILe	Met	Met	ILe	Met	iLe
AUU	ILe	Met	Met	Met	Met	ILe
CUU, CUC, CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

* برای پروتئین‌های رمزدهی شده توسط هسته

یک فرضیه برای اینکه چرا این ژن‌ها هرگز بصورت موفقیت‌آمیز به ژنوم هسته منتقل نمی‌شوند این است که پلی پپتیدهای رمزدهی شده توسط آنها به قدری آب گریز هستند که نمی‌تواند از غشای خارجی میتوکندری عبور کرده و بنابراین در صورتیکه در سیتوزول سنتز شوند به میتوکندری برنخواهند گشت. همچنین، اندازه بزرگ rRNAها ممکن است با انتقال آنها از هسته به میتوکندری تداخل نماید. از طرف دیگر، این ژن‌ها ممکن است در طی تکامل به هسته منتقل نشده باشند چون تنظیم بیان آنها در پاسخ به شرایط در داخل میتوکندری ممکن است مزیت داشته باشد. در حالیکه اگر این ژن‌ها در هسته قرار گرفته بودند، شرایط در داخل هر میتوکندری نمی‌توانست بر بیان پروتئین‌های موجود در آن میتوکندری خاص تاثیر بگذارد.

رمزهای ژنتیکی میتوکندری متفاوت از رمز هسته‌ای استاندارد هستند

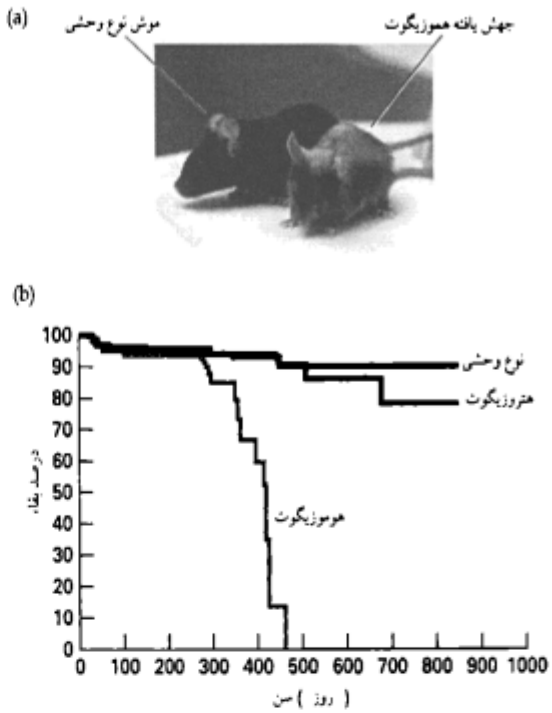
رمز ژنتیکی مورد استفاده در میتوکندری‌های حیوانات و قارچ‌ها از رمز استاندارد مورد استفاده در همه پروکاریوت‌ها و ژن‌های هسته یوکاریوت‌ها متفاوت می‌باشد. جالب اینکه، رمز حتی در میتوکندری گونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد (جدول ۳-۶). اما اینکه چرا و چگونه این اختلافات در طی تکامل پدید می‌آیند، بصورت یک راز باقی مانده است. برای مثال UGA معمولاً کدون توقف است اما توسط سیستم‌های ترجمه میتوکندری قارچ و انسان به عنوان تریپتوفان خوانده می‌شود. با وجود این، در میتوکندری‌های گیاهی هم، UGA به عنوان یک کدون توقف تشخیص داده می‌شود. AGA و AGG کدون‌های هسته‌ای استاندارد برای آرژنین هستند اما در mtDNA پستانداران، کدون توقف می‌باشند. کدون‌های سرین نیز در mtDNA دروزوفیلا، کدون توقف می‌باشند.

همانطور که در جدول ۳-۶ نشان داده شده است، به‌نظر می‌رسد میتوکندری گیاهی رمز ژنتیکی استاندارد را مورد استفاده قرار می‌دهد. با این حال، مقایسه توالی‌های اسیدآمینه‌ای بین پروتئین‌های میتوکندری گیاهی با توالی‌های نوکلئوتیدی mtDNAهای گیاهی، پیشنهاد می‌کند که CGG می‌تواند هم کدون آرژنین (اسیدآمینه استاندارد) و هم کدون تریپتوفان باشد. این غیراختصاصی بودن ظاهری رمز میتوکندری گیاهی بوسیله ویرایش رونوشت‌های RNA میتوکندری قابل توجیه است. ریشه‌های سیتوزین طی ویرایش RNA به ریشه‌های یوراسیل تبدیل می‌شود و اگر یک توالی CGG به UGG ویرایش یابد، تبدیل به کدون اختصاصی تریپتوفان می‌شود (اسید آمینه استاندارد برای UGG)، در حالیکه کدون‌های CGG ویرایش نشده آرژنین استاندارد را رمزدهی می‌کند. در نتیجه، سیستم ترجمه در میتوکندری‌های گیاهی، رمز ژنتیکی استاندارد را مورد استفاده قرا نمی‌دهد. [رمز ژنتیکی استاندارد ویرایش یافته و سپس مورد استفاده قرار می‌گیرد].

جهش در DNAمیتوکندری باعث ایجاد چندین بیماری ژنتیکی در انسان می‌شوند

شدت بیماریهای ایجاد شده توسط یک جهش در mtDNA به نوع جهش و نسبت mtDNAهای جهش یافته و نوع وحشی در یک نوع سلول خاص بستگی دارد. بطورکلی،وقتی جهش‌ها در mtDNA یافت می‌شوند، سلول‌ها مخلوطی از mtDNAهای نوع وحشی و جهش یافته را دارد. (این حالتی به **هتروپلاسمی**[1] موسوم است). هر وقت یک سلول جنسی یا سوماتیک پستانداران تقسیم می‌شود و

1- Heteroplasmy



▲ **شکل تجربی ۲۴-۶- موش‌هایی با یک DNA پلیمراز میتوکندریایی ناقص در غلط‌گیری، پیری زودرس را نشان می‌دهند** یک دسته از موش‌های Knock-in شده بوسیله روش‌های گفته شده در فصل ۵ با جهش در ژن رمزدهی کننده DNA پلیمراز میتوکندری ایجاد شدند. این جهش عمل غلط‌گیری پلیمراز را غیرفعال می‌سازد، (a) موش جهش یافته هموزیگوت و نوع وحشی ۳۹۰ روز (۱۳ ماه) سن دارند. موش جهش یافته بسیاری از ویژگی‌های یک موش پیر (با بیشتر از ۷۲۰ روز یا ۲۴ ماه سن) را نشان می‌دهد. (b) نموداری از بقا بازای سن موش نوع وحشی و جهش یافته‌های هتروزیگوت و هموزیگوت. جهش یافته‌های هموزیگوت به وضوح دارای طول عمر، خیلی کمتری نسبت به موش‌های نوع وحشی هستند.

mtDNAهای نوع وحشی و جهش یافته بصورت تصادفی بین سلول‌های دختر تقسیم می‌گردند، این پدیده در سلول‌های مخمر نیز اتفاق می‌افتد. (شکل ۲۲b-۶ را ملاحظه کنید). در نتیجه، ژنوتیپ mtDNA که از یک نسل و یک نسل و یا از تقسیم سلولی به تقسیم سلولی بعدی نوسان می‌کند، می‌تواند بصورت mtDNAهای غالبا وحشی و یا جهش یافته تغییر نماید. چون همه آنزیم‌های لازم برای همانندسازی و رشد میتوکندری پستانداران، همچون DNA پلیمرازها و RNA پلیمرازهای میتوکندری، در هسته رمزدهی شده و از سیتوزول وارد میتوکندری می‌شوند، یک mtDNA جهش یافته نبایستی در همانندسازی نقصی داشته باشد. جهش یافته‌هایی که حذف‌های بزرگی در mtDNA را دارند حتی ممکن است دارای مزیت انتخابی در همانندسازی باشند زیرا می‌توانند سریع‌تر همانندسازی کنند.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد، تجمع جهش‌ها در mtDNA عامل مهمی در پیری پستانداران است. دیده شده به موازات پیرشدن، جهش‌ها در mtDNA تجمع پیدا می‌کنند. این امر شاید به دلیل کاهش در توانایی **غلط‌گیری** DNA پلیمراز باشد. برای مطالعه این فرضیه محققان تکنیک‌های Knock-in ژن را برای جایگزین نمودن ژن هسته‌ای رمزدهی کننده DNA پلیمراز میتوکندری (دارای فعالیت غلط‌گیری) با یک ژن جهش یافته رمزکننده پلیمراز معیوب در عمل غلط‌گیری، استفاده کردند. (شکل ۳۴-۴ را ملاحظه کنید). جهش‌ها در mtDNA موش جهش یافته هموزیگوس نسبت به موش وحشی با سرعت خیلی بیشتری تجمع یافت و موش جهش یافته با سرعت زیادی پیر شد (شکل ۲۴-۶).

به استثنای موارد اندک، همه سلول‌های انسان دارای میتوکندری هستند و جهش در mtDNA، تنها برخی بافت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بافت‌هایی که اغلب تحت تاثیر قرار می‌گیرند، یا نیاز بالایی به ATP تولید شده توسط فسفریلاسیون اکسیداتیو دارند، و یا برای سنتز مقادیر کافی از پروتئین‌های عملکردی میتوکندریایی به بخش عمده یا همه mtDNA در سلول نیاز دارند. برای مثال **نوروپاتی چشمی وراثتی لبر**[1] یا تخریب عصب چشمی توسط جهش با معنی نامناسب (missense) در ژن mtDNA رمزدهی کننده زیرواحد ۴ از NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I) ایجاد می‌شود، این پروتئین برای تولید ATP بوسیله میتوکندری، لازم است. چندین حذف بزرگ در mtDNA باعث دسته دیگری از بیماریها شامل chronic progressive external optamoplegia (ویژگی نقص چشمی) و سندروم کرنر-سایرک[2] (با ویژگی نقص چشمی) زنش غیرطبیعی قلب و تخریب سیستم عصبی مرکزی، می‌گردد. در یک سوم مواردی که باعث ایجاد رشته‌های ماهیچه‌ای ناصاف (میتوکندری‌ها با آرایش نامناسب) شده و حرکات تشنج مانند و بدون کنترل رخ می‌دهد، جهشی منفرد در لوپ TψCG لیزیل tRNA میتوکندریایی رخ می‌دهد. در اثر این جهش، ترجمه چندین پروتئین میتوکندریایی مهار می‌شود.

1- Lebrs hereditary optic neuropathy

2- Kearns.sayrc sgndrome

کلروپلاست‌ها حاوی DNAهای بزرگی بوده و اغلب بیش از یکصد پروتئین را رمزدهی می‌کنند

عقیده بر این است که کلروپلاست‌ها همچون میتوکندری‌ها، از باکتری فتوسنتزی درون همزیست اجدادی پدید آمده باشند (شکل ۲۰-۶ را ملاحظه کنید). با این حال، پدیده درون همزیستی که باعث ایجاد کلروپلاست‌ها شده‌اند، خیلی بعد از تکامل میتوکندری‌ها (۱/۵-۱/۲ بیلیون سال پیش) رخ داده است. در نتیجه، DNAهای کلروپلاست امروزی تنوع ساختاری کمتری را نسبت به mtDNAها نشان می‌دهند. همچنین مشابه میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها نسخه‌های متعددی از DNA اندامکی و ریبوزوم‌ها را دارا هستند، که این ریبوزوم‌ها بعضی از پروتئین‌های رمزدهی شده کلروپلاست را با استفاده از رمز ژنتیکی استاندارد سنتز می‌کنند. مثل mtDNA گیاهی، DNA کلروپلاست منحصرا به سبک تک والدی و از طریق والد ماده (تخمک) به ارث می‌رسد. پروتئین‌های دیگر کلروپلاست که بوسیله ژن‌های هسته‌ای رمزدهی می‌شوند، در ریبوزوم‌های سیتوزولی سنتز و سپس به داخل اندامک وارد می‌شوند (فصل ۱۳).

در گیاهان عالی، DNAهای کلروپلاست بسته به گونه بین ۱۶۰-۱۲۰ کیلوباز طول دارند. در ابتدا تصور می‌شد که DNAهای کلروپلاست‌ها مولکول‌های DNA حلقوی باشند چون در گیاه پروتوزوآیی مدل یعنی ***کلامیدوموناس رینباردتی***، نقشه ژنتیکی حلقوی است. با این حال، مطالعات اخیر نشان داده است، DNA کلروپلاست گیاهان در حقیقت کونکاتامرهای خطی و طویل سر به دم به علاوه حدواسطهای نوترکیبی بین این مولکول‌های خطی طویل می‌باشند. در این مطالعات، محققان تکنیک‌هایی را بکار برده‌اند که شکست مکانیکی مولکول‌های طویل DNA در حین جداسازی و ژل الکتروفورز را به حداقل می‌رساند و فرصت آنالیز DNA با اندازه مگاباز را فراهم می‌آورد.

توالی کامل چندین DNA کلروپلاستی از گیاهان عالی در چند سال گذشته تعیین شده است. آنها دارای ۱۳۵-۱۲۰ و در مدل مهم گیاهی ***آرابیدوپسیس تالیانا***، ۱۳۰ ژن می‌باشند. یک DNA کلروپلاست تالیانا در ۷۶ ژن رمزدهی‌کننده پروتئین و ۵۴ ژن با محصولات RNA مثل rRNAها و tRNAها را رمزدهی می‌کند. DNAهای کلروپلاست زیرواحدهای RNA پلیمراز شبه باکتریایی را رمزدهی نموده و همچون باکتری‌ها، بسیاری از ژن‌هایشان بوسیله اپرون‌های پلی سیسترونیک، بیان می‌شوند. (شکل a ۱۳-۴ را ملاحظه کنید). برخی از ژن‌های کلروپلاست حاوی اینترون هستند اما این اینترون‌ها شباهت بیشتری به اینترون‌های تخصص یافته در برخی ژن‌های باکتریایی و ژن‌های میتوکندری قارچ‌ها و پرتوزوآها نسبت به اینترون‌های ژن‌های هسته‌ای دارند. همچنین بسیاری از ژن‌ها در کلروپلاست‌همزیست اجدادی که سرشار از ژن‌های هسته‌ای بودند، مثل تکامل ژنوم میتوکندری از DNA کلروپلاست حذف شده‌اند. همچنین، بسیاری از ژن‌های حیاتی برای عمل کلروپلاست در طی دوره تکاملی به ژنوم هسته گیاهان منتقل شده‌اند. برآوردهای اخیر از آنالیز توالی ژنوم تالیانا و سیانوباکتری‌ها نشان می‌دهد که در حدود ۴۵۰۰ ژن از همزیست‌های اولیه به ژنوم هسته‌ای منتقل شده‌اند. روش‌های شبیه به روش‌های مورد استفاده برای ترانسفورماسیون سلول‌های مخمر (فصل ۵) برای وارد نمودن پایدار DNA خارجی به داخل کلروپلاست‌های گیاهان عالی ابداع شده‌اند. شمار زیادی از مولکول‌های DNA کلروپلاست در هر سلول وارد نمودن هزاران نسخه از یک ژن مهندسی شده به داخل هر سلول را ممکن ساخته و باعث تولید مقادیر زیادی پروتئین خارجی می‌شوند. ترانسفورماسیون کلروپلاست اخیرا به مهندسی گیاهانی منجر شده است که به آلودگی‌های قارچی و باکتریایی، خشکی و علف کش‌ها مقاوم هستند. سطح تولید پروتئین‌های خارجی با سطح تولید در باکتری‌های مهندسی شده قابل مقایسه بوده و به نظر می‌رسد ترانسفورماسیون کلروپلاست برای تولید داروهای انسانی و احتمالا برای مهندسی محصولات غذایی با مقدار بالا از همه اسیدهای آمینه ضروری برای انسان‌ها مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

نکات کلیدی بخش ۴-۶

DNAهای اندامکی

- میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها به احتمال زیاد از باکتری‌هایی پدید آمده‌اند که رابطه همزیستی با سلول‌های اجدادی دارای هسته یوکاریوتی تشکیل داده‌اند. (شکل ۲۰-۶ را ملاحظه کنید).
- اغلب ژن هایی که اول در داخل میتوکندری و کلروپلاست‌ها بودند از بین رفته‌اند زیرا عملکردشان با وجود ژن‌های هسته‌ای زیادی بوده و یا طی تکامل به ژنوم هسته‌ای منتقل شده و مجموعه‌های ژنی مختلفی را در DNAهای اندامکی موجودات مختلف به جا گذاشتند (شکل ۲۳-۶ را ملاحظه کنید).
- همه mtDNAهای جانوری، مولکول‌های حلقوی بوده و این نشان دهنده منشا باکتریایی آنها است. mtDNAهای

گیاهی و DNAهای کلروپلاست عموماً طویل‌تر از mtDNAهای یوکاریوت‌های دیگر هستند، چون حاوی نواحی رمزگردان زیاد و توالی‌های تکرای هستند.

■ همه mtDNAها و DNAهای کلروپلاست، rRNA و برخی از پروتئین‌های درگیر در انتقال الکترون فتوسنتزی یا میتوکندریایی و سنتز ATP را رمزدهی می‌کنند. اغلب mtDNAهای جانوری و DNAهای کلروپلاست نیز tRNAهای لازم برای ترجمه mtRNAهای اندامکی را رمزدهی می‌نمایند.

■ چون اغلب mtDNA از سلول‌های تخمک به ارث می‌رسند تا اسپرم، جهش‌ها در mtDNA الگوی سیتوپلاسمی مادری از وراثت را نشان می‌دهد. همچنین DNA کلروپلاست منحصراً از والد مادر به ارث می‌رسد.

■ ریبوزوم‌های میتوکندری از نظر ساختاری شبیه به ریبوزوم‌های باکتری بوده، به کلرامفنیکل و حساس و نسبت به سیکلوهگزامید مقاوم می‌باشند.

■ رمز ژنتیکی mtDNAهای جانوری و قارچی کمی از ژنوم باکتری و هسته‌ای متفاوت بوده و بین جانوران و قارچ‌های مختلف متفاوت می‌باشد. در مقابل، mtDNAهای گیاهی و DNAهای کلروپلاست بنظر می‌رسد که مطابق رمز ژنتیکی استاندار می‌باشند.

■ چندین بیماری عصبی ماهیچه‌ای انسان از طریق جهش در mtDNA حاصل می‌شوند. والدین عموماً دارای مخلوطی از mtDNA نوع وحشی و جهش یافته در سلول‌هایشان هستند (هتروپلاسمی): هر اندازه mtDNA جهش یافته بیشتر باشد، فنوتیپ جهش یافته نیز حادتر است.

۶-۵ ژنومیکس: آنالیز گسترده ژنومی، ساختار و بیان ژن

با استفاده از تکنیک‌های تعیین توالی خودکار DNA، روش‌های کلون نمودن قطعات DNA تا حدود طول ۱۰۰ کیلوباز و الگوریتم‌های کامپیوتری برای به هم وصل کردن داده‌های توالی‌های ذخیره شده، محققان مقادیر خیلی زیاد از توالی DNA همچون توالی تقریباً کاملی از ژنوم انسان و بسیاری از موجودات آزمایشگاهی مهم را تعیین کرده‌اند. این حجم عظیم از داده‌ها که با سرعت بالایی در حال رشد هستند، بصورت دو بانک اطلاعاتی اولیه ذخیره و سازمان دهی شده‌اند: بانک ژن در موسسات ملی سلامت، بتیسدا و مریلند، و پایگاه داده‌های توالی EMBL در آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی اروپا در هایدلبرگ آلمان. این پایگاههای اطلاعاتی دائما توالی‌های تازه گزارش شده را تبادل کرده و این اطلاعات را در سرتاسر دنیا از طریق اینترنت در اختیار دانشمندان قرار می‌دهند. تا به حال، توالی‌های ژنومی بطور کامل یا تقریباً کامل برای صدها ویروس و باکتری، مخمر (یوکاریوت‌ها) و یوکاریوتهای پرسلولی مثل کرم حلقوی الگانس، مگس سرکه دروزوفیلا ملانوگاستر، موش و انسان تعیین شده است.

هزینه تعیین توالی مگابازهایی از DNA بقدری کاهش یافته که پروژه‌ها در حد تعیین توالی کل ژنوم در سلول‌های سرطانی و مقایسه آن با ژنوم سلول‌های طبیعی از همان بیمار می‌باشند تا بتوانند همه جهش‌هایی که در سلول‌های توموری بیمار انباشته شده‌اند، را تعیین کنند. این روش ممکن است ژن‌هایی را آشکار سازد که بطور معمول در همه سرطان‌ها جهش می‌یابند و همچنین ژن‌هایی که معمولاً در سلول‌های توموری از بیماران مختلف با یک نوع سرطان (مثل سرطان سینه در برابر سرطان روده بزرگ) جهش یافته‌اند را مشخص سازد. این اطلاعات نیز ممکن است سرانجام به درمان‌های سرطان شدیدا اختصاصی حاصل از جهش‌های اختصاصی در سلول‌های توموری از یک بیمار خاص، منجر شود.

در این قسمت، ما برخی از روش‌هایی که محققان در حال بهره برداری از این گنج بی‌صاحب از داده‌ها هستند را آزمایش نموده تا نگرش‌هایی در مورد عملکرد ژن و روابط تکاملی پیدا کنیم. همچنین از این روش‌ها می‌توان برای شناسایی ژن‌های جدیدی که پروتئین رمزدهی شده آنها هرگز جدا نشده و برای تعیین اینکه چه موقع و کجا این ژن‌ها بیان می‌شوند استفاده نمود. استفاده از کامپیوتر در ارزیابی داده‌های توالی به ظهور زمینه جدید در زیست‌شناسی بنام ***بیوانفورماتیک***[1] منجر شده است.

توالی‌های ذخیره شده، عملکردهای ژن‌ها و پروتئین‌های تازه شناسایی شده را پیش بینی می‌کنند

همانطور که در فصل ۳ گفته شد، پروتئین‌های دارای عملکردهای مشابه اغلب حاوی توالی‌های اسیدآمینه‌ای مشابه بوده و با دُمین‌های عملکردی مهم در ساختار سه بعدی پروتئین‌ها مرتبط می‌باشند. با مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین رمزدهی شده توسط یک ژن تازه کلون شده با توالی پروتئین‌های دارای عملکرد مشخص، یک

1- Bioinformatics

محقق می‌تواند تشابهات توالی را جستجو کند تا سرنخ‌هایی درباره عملکرد پروتئین رمزدهی شده به دست آورد. به دلیل انحراف در رمز ژنتیکی، پروتئین‌های مرتبط با هم، توالی اسیدآمینه‌ای‌شان شباهت بیشتری نسبت به توالی ژن‌های رمزدهی کننده‌شان نشان می‌دهد. به این علت، معمولاً توالی‌های پروتئینی بجای توالی‌های DNA مقایسه می‌شود. برنامه کامپیوتری که بصورت گسترده برای این منظور مورد استفاده می‌گیرد به بلاست (BLAST)[1] معروف است. الگوریتم بلاست توالی پروتئین جدید را (بصورت توالی معمول) به قطعات کوچکتری تقسیم نموده و سپس در پایگاههایی اطلاعاتی به دنبال همتای معنی‌دار از بین توالی‌های ذخیره شده می‌گردد. برنامه جفت سازی امتیاز بالا به اسیدهای‌آمینه بصورت جفت شده یکسان و امتیاز پائینی به جفت‌های حاصل بین اسیدهای‌آمینه مرتبط با هم (مثل اسیدهای‌آمینه آبگریز، قطبی، باردار مثبت و باردار منفی) اختصاص می‌دهد. وقتی یک جفت معنی‌دار برای یک قطعه پیدا شده، الگوریتم بلاست بطور موضعی جستجو می‌کند تا ناحیه دارای تشابه را گسترش دهد. بعد از اینکه جستجو به پایان رسید، برنامه جفت شدگی‌های بین پروتئین مورد سوال و پروتئین‌های شناخته شده مختلف را طبق مقادیر P آنها رتبه‌بندی می‌کند. این پارامتر مقدار احتمالی پیدا شدن یک اندازه از تشابه بین دو توالی پروتئینی بصورت تصادفی را نشان می‌دهد. هر چه مقادیر P کمتر باشد، تشابه میان دو توالی بیشتر است. مقادیر P کوچکتر از 10^{-3} معمولاً به عنوان شاهد قوی برای داشتن یک جد مشترک بین دو پروتئین می‌باشند. بسیاری از برنامه‌های کامپیوتری دیگری علاوه بر بلاست ساخته شده‌اند. این برنامه‌ها می‌توانند روابط میان پروتئین‌هایی را تشخیص دهند که امکان تشخیص آنها بوسیله بلاست به خاطر روابط دور آنها وجود ندارد. گسترش دادن این روش‌ها امروزه حوزه فعالی در تحقیقات بیوانفورماتیک می‌باشد.

برای اثبات توانمندی این روش، ما ژن انسانی NF_1 را مورد بررسی قرار می‌دهیم. جهش‌ها در NF_1 با بیمار توارثی نوروفیبروماتوزیس ۱ مرتبط می‌باشند. در این بیماری تومورهای متعددی در سیستم عصبی پیرامونی پدید آمده و باعث برآمدگی‌های زیادی در پوست می‌گردند. ناحیه‌ای از پروتئین NF_1 کشف شده که همولوژی فوق‌العاده‌ای با بخشی از پروتئین مخمر بنام Ira دارد. (شکل ۲۵-۶). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که Ira یک پروتئین فعال کننده GTP(GAP)از بوده و فعالیت GTP آزی پروتئین G منومری بنام Ras را تنظیم می‌کند. (شکل ۳۲-۳ را ملاحظه کنید). بطورریکه در فصل ۱۶ به تفصیل شرح خواهیم داد، پروتئین‌های GAP و Ras بطور طبیعی در پاسخ به سیگنالهایی از سلول‌های مجاور، همانندسازی و تمایز سلولی را کنترل می‌نمایند. مطالعات عملکردی بر روی پروتئین طبیعی NF_1 از طریق بیان ژن وحشی کلون شده و همولوژی آن با Ira نشان داد، این پروتئین فعالیت Ras را تنظیم می‌نماید. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند، که بیماران دارای نوروفیبروماتوزیس در سلول‌های سیستم عصبی پیرامونی خود یک پروتئین جهش یافته NF_1 را بیان نموده و این امر منجر به تقسیم سلولی نامناسب و تشکیل تومورهای خاص این بیماری می‌شود.

حتی وقتی یک پروتئین با الگوریتم بلاست هیچ تشابه مهمی با پروتئین‌های دیگر نشان نمی‌دهد، با این حال ممکن است آن پروتئین دارای توالی کوچکی باشد که از نظر عملکردی مهم است. این بخش‌های کوچک موجود در بسیاری از پروتئین‌های مختلف به نام **موتیف‌های ساختاری** خوانده شده و عموماً دارای فعالیت‌های مشابهی می‌باشند. چندین نمونه از این موتیف‌ها در فصل ۳ شرح و در شکل ۹-۳ نشان داده شده‌اند. برای جستجوی این موتیف‌ها و موتیف‌های دیگر در یک پروتئین جدید، محققان توالی پروتئین مورد بررسی را با پایگاه اطلاعاتی حاوی توالی موتیف‌های شناخته شده، مقایسه می‌نمایند.

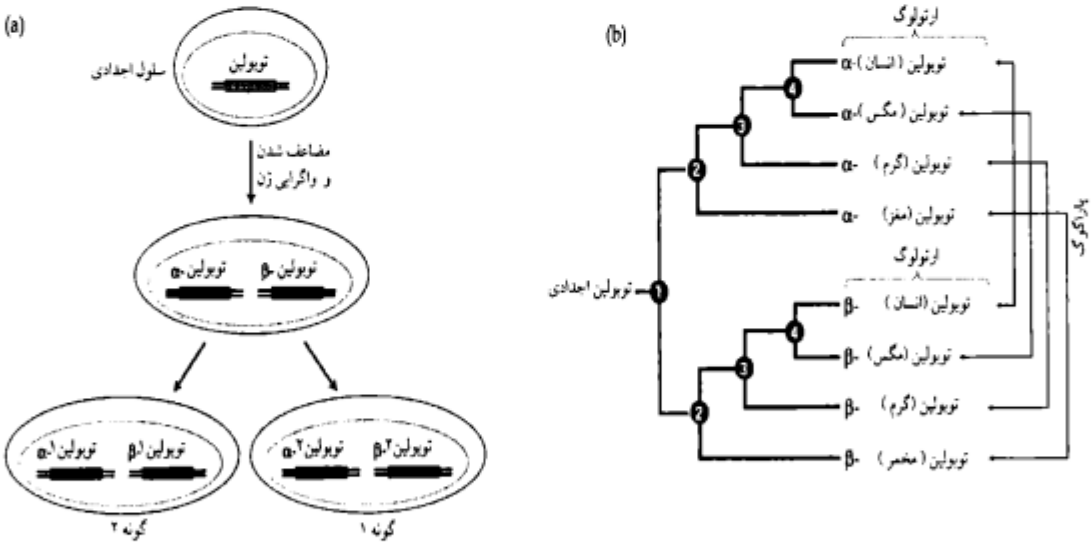
مقایسه توالی‌های مرتبط از گونه‌های مختلف می‌تواند سرنخ‌هایی برای روابط تکاملی در بین پروتئین‌ها فراهم کند:

بلاست برای توالی‌های پروتئینی مرتبط ممکن است نشان دهند پروتئین‌ها به یک خانواده پروتئینی متعلق هستند. قبلا، ما خانواده‌های ژنی را در یک موجود خاص مثلاً با استفاده از ژن‌های β-گلوبین در انسان، مورد بررسی قرار دادیم (شکل ۴-۶). اما در یک پایگاه اطلاعاتی که شامل توالی‌های ژنوم موجودات متعددی است، خانواده‌های پروتئینی نیز می‌توانند به صورت مشترک در میان موجودات خویشاوند تشخیص داده شوند. برای مثال، به پروتئین‌های **توبولین** توجه فرمائید، این پروتئین‌ها ترکیبات مهم میکروتوبولها هستند. میکروتوبولها نیز اجزای مهم اسکلت سلولی می‌باشند (فصل ۱۸). مطابق شمای ساده شده در شکل ۲۶a-۶ بنظر می‌رسد ابتدایی‌ترین سلول‌های یوکاریوتی حاوی یک ژن توبولین مجزا هستند که در اوایل تکامل مضاعف شده‌اند: واگرایی پی در پی نسخه‌های مختلف ژن توبولین ابتدایی، انواع اجدادی ژن‌های β-توبولین و α-توبولین را تشکیل داده است. به موازات ایجاد

1- Basic local alignment seareh tool

```
NF1  841 TRATFMEVLTKILQQGTEFDTLAETVLADRFERLVELVTMMGDQGELPIA 890
Ira 1500 IRIAFLRVFIDIV...TNYPVNPEKHEMDKMLAIDDFLKYIIKNPILAFF 1546

     891 MALANVVPCSQWDELARVLVTLFDSRHLLYQLLWNMFSKEVELADSMQTL 940
    1547 GSLA..CSPADVDLYAGGFLNAFDTRNASHILVTELLKQEIKRAARSDDI 1594

     941 FRGNSLASKIMTFCFKVYGATYLQKLLDPLLRIVITSSDWQHVSFEVDPT 990
    1595 LRRNSCATRALSLYTRSRGNKYLIKTLRPVLQGIVDNKE....SFEID.. 1638

     991 RLEPSESLEENQRNLLQMTEKF....FHAIISSSSEFPPQLRSVCHCLYQ 1036
    1639 KMKPG...SENSEKMLDLFEKYMTRLIDAITSSIDDFPIELVDICKTIYN 1685

    1037 VVSQRFPQNSIGAVGSAMFLRFINPAIVSPYEAGILDKKPPPRIERGLKL 1086
    1686 AASVNFPEYAYIAVGSFVFLRFIGPALVSPDSENII.IVTHAHDRKPFIT 1734

    1087 MSKILQSIAN........HVLFTKEEHMRPFND....FVKSNFDAARRFF 1124
    1735 LAKVIQSLANGRENIFKKDILVSKEEFLKTCSDKIFNFLSELCKIPTNNF 1784

    1125 LDIASDCPTSDAVNHSL..............SFISDGNVLALHRLLWNN. 1159
    1785 TVNVREDPTPISFDYSFLHKFFYLNEFTIRKEIINESKLPGEFSFLKNTV 1834

    1160 ..QEKIGQYLSSNRDHKAVGRRPF....  DKMATLLAYLGPPEHKPVA 1200
    1835 MLNDKILGVLGQPSMEIKNEIPPFVVENREKYPSLYEFMSRYAFKKVD 1882
```

▲ **شکل ۲۵-۶ (شکل رنگی) مقایسه نواحی از پروتئین NF1 انسانی و پروتئین Ira ساکارومایسیس سرویزیه، که تشابه توالی مهمی را نشان می‌دهد.** توالی‌های NF1 و Ira در خطوط بالا و پایین هر ردیف به ترتیب بصورت رمز اسیدآمینه‌ای یک حرفی نشان داده شده‌اند. (شکل ۱۴-۲ را ملاحظه کنید). اسیدهای‌آمینه‌ای که در دو پروتئین مشابه هستند با رنگ زرد نشان داده شده‌اند. اسیدهای‌آمینه مشابه از لحاظ شیمیایی اما با زنجیره‌های جانبی غیریکسان با نقاط آبی به هم مرتبط شده‌اند. شماره اسیدهای‌آمینه در توالی‌های پروتئینی در انتهاهای چپ و راست هر ردیف نشان داده شده است. نقاط سیاه، شکاف‌ها را نشان می‌دهد که در اثر تطابق دادن حداکثر اسیدهای‌آمینه همولوگ در توالی پروتئین وارد شده‌اند مقدار p برای بلاست این دو توالی 10^{-28} است که بیانگر میزان بالای تشابه می‌باشد.



▲ **شکل ۲۶-۶ تولید توالی‌های مختلف توبولین طی تکامل یوکاریوت‌ها.** (a) مکانیسم احتمالی که سبب بوجود آمدن ژن‌های توبولین یافت شده در گونه‌های موجود شده است. می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که واقعه‌ی همانندسازی یک ژن قبل از تمایز رخ داده باشد، چون توالی‌های α-توبولین مربوط به گونه‌های مختلف (به عنوان مثال انسان و مخمر) بیشتر از توالی‌های α-توبولین و β-توبولین در درون یک گونه به یکدیگر شبیه هستند. (b) درخت فیلوژنی که ارتباط بین توالی‌های توبولینی را نشان می‌دهد. نقاط انشعاب (گره‌ها) با شماره‌های کوچک نشان داده شده‌اند و نمایانگر ژن‌های اجدادی مشترک در زمانی است که دو توالی از هم جدا شده‌اند. به عنوان مثال، گره ۱ بیانگر واقعه‌ی همانندسازی می‌باشد که سبب ایجاد خانواده‌های α-توبولین و β-توبولین شده است و گره ۲ نشان دهنده‌ی اشتقاق مخمرها از گونه‌های چندسلولی می‌باشد. کروشه‌ها و پیکان‌ها به ترتیب نشان دهنده‌ی ژن‌های ارتولوگ توبولین، (که در نتیجه‌ی تمایز با یکدیگر متفاوت هستند) و ژن‌های پارالوگ (که در نتیجه‌ی مضاعف شدن ژن با یکدیگر تفاوت دارند)، می‌باشند. این نمودار ساده سازی شده است چرا که هرگونه نشان داده شده در اینجا، در واقع حاوی ژن‌های α-توبولین و β-توبولین چندگانه‌ای می‌باشد که از مضاعف شدن بعدی ژنی، حاصل شده‌اند.

گونه‌های مختلف از این سلول‌های یوکاریوتی اولیه، هر یک از این توالی‌های ژنی واگراترشده و به فرم‌های α-توبولین و β-توبولین اندکی متفاوت که امروزه در هر گونه‌ای یافت می‌شوند، منجر گردیده است. ژن‌های (یا پروتئین‌های) همه اعضای مختلف خانواده توبولین از لحاظ توالی به قدری مشابه هستند که نشان می‌دهد یک توالی اجدادی مشترک داشته‌اند. بنابراین، همه این توالی‌ها به عنوان ***هومولوگ***[1] در نظر گرفته می‌شوند. بصورت اختصاصی‌تر، توالی‌هایی که احتمالا در اثر مضاعف شدن ژن از هم جدا شده‌اند (مثال توالی‌های α و β توبولین) به عنوان ***پارالوگ***[2] مورد بررسی قرار می‌گیرند. توالی‌هایی که در اثر گونه زایی، پدید آمده‌اند (مثل ژن‌های α-توبولین در گونه‌های مختلف)، به صورت ***ارتولوگ***[3] بررسی می‌شوند. از روی میزان ارتباط توالی توبولین‌های موجود در موجودات مختلف امروزی، روابط تکاملی را می‌توان مشخص نمود. همانطور که در شکل ۶-۲۶b نشان داده شده، از بین این سه رابطه خویشاوندی، توالی‌های ارتولوگ به احتمال زیاد دارای اعمال مشابه می‌باشند.

ژن‌ها می‌توانند در داخل توالی‌های DNA ژنومی شناسایی شوند

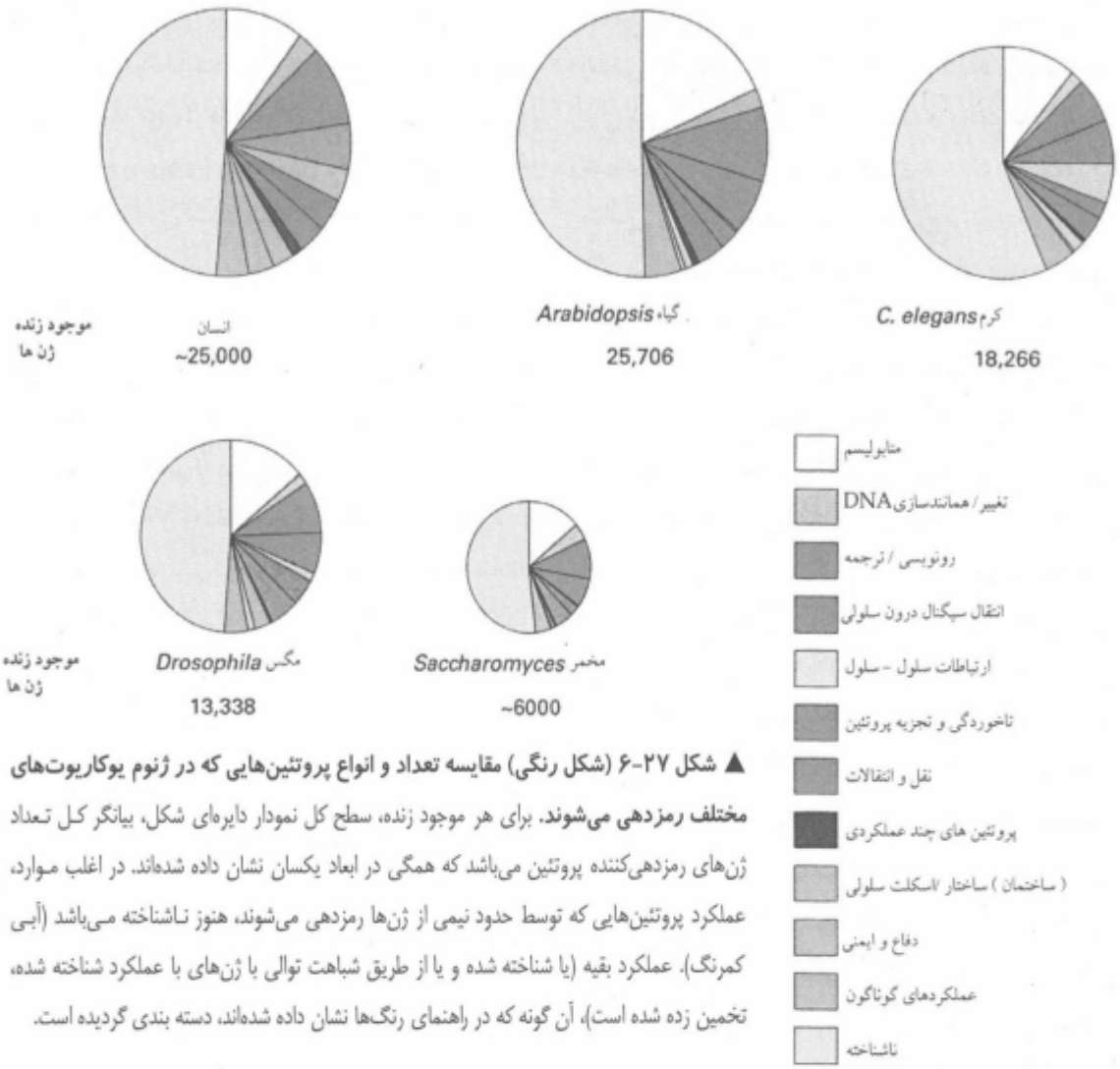
توالی ژنومی کامل یک موجود زنده حاوی اطلاعاتی در داخل خود می‌باشد که از این اطلاعات می‌توان توالی لازم برای ساخت هر پروتئین توسط سلول‌های آن موجود لازم را استحصال کرد. برای موجوداتی مثل باکتری‌ها و مخمرها که ژنوم‌شان دارای اینترون‌های کم و نواحی بین ژنی کوتاه است، اغلب توالی‌های رمزدهی کننده پروتئین می‌توانند به آسانی از طریق جستجوی توالی ژنومی برای **قالب‌های قابل خواندن** یا ORFهای با طول معنی‌دار، یافت شوند. ORF معمولاً به عنوان قطعه‌ای از DNA تعریف می‌شود که با یک کدون آغازین شروع و با یک کدون توقف پایان یافته و حداقل حاوی ۱۰۰ کدون می‌باشد. زیرا احتمال وجود یک توالی DNA تصافی که هیچ کدون توقفی در ۱۰۰ کدون در یک ردیف نباشد، خیلی کم است. اغلب ORFها پروتئین رمزدهی می‌کنند.

آنالیز ORF، بیش از ۹۰ درصد از ژن‌ها را در باکتری‌ها و مخمر به درستی شناسایی می‌نماید. با این حال برخی از ژن‌های خیلی کوتاه با این روش از دست رفته و گهگاهی قالب‌های قابل خواندن که در حقیقت ژن نیستند بصورت تصادفی بوجود می‌آیند. این مشکلات می‌توانند بوسیله آنالیز مناسب‌تر توالی و آزمایشات ژنتیکی برای عملکرد ژن، تصحیح شوند. از میان ژن‌های ***ساکارومایسیس*** که با این روش شناسایی شده‌اند تقریباً نیمی از آنها از طریق برخی معیارهای عملکردی مثل فنوتیپ جهش یافته شناخته شده‌اند. عملکرد برخی از پروتئین‌های رمزدهی شده توسط ژن‌های فرضی (حدسی) که از طریق آنالیز ORF شناسایی شده‌اند بر پایه تشابه توالی شان با پروتئین‌های شناخته شده در موجودات دیگر، تعیین شده‌اند.

شناسایی ژن‌ها در موجودات زنده با ساختار ژنومی پیچیده‌تر نیازمند الگوریتم‌های پیشرفته‌تری نسبت به جستجو برای قالب‌های قابل خواندن می‌باشد. از آنجاکه اغلب ژن‌ها در یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر، از اگزون‌های چندگانه و نسبتاکوتاه که اغلب توسط اینترون‌های بلند غیررمزگردان از هم جدا شده‌اند، تشکیل شده‌اند، جستجو برای ORFها، روش ضعیفی برای یافتن ژن‌ها می‌باشد. بهترین الگوریتم‌های پیدا نمودن ژن‌ها، همه‌ی داده‌های موجود که ممکن است حضور ژن را در یک جایگاه ژنومی خاص پیشنهاد دهد، با هم تلفیق می‌نمایند. داده‌های مربوط شامل تطبیق یا هیبرید شدن توالی مورد سوال با طول کامل cDNA، تطبیق با یک توالی جزئی cDNA که عموما ۲۰۰-۴۰۰bp طول داشته و تحت عنوان ***دنباله‌ی توالی بیان شده***[4] (EST) شناخته می‌شود تطبیق با مدل‌های مربوط به اگزون، اینترون و توالی‌های جایگاه پیرایش و شباهت توالی با سایر موجودات زنده. زیست شناسان محاسباتی، با استفاده از چنین روش‌های بیوانفورماتیکی مبتنی بر کامپیوتر، نزدیک به ۲۵/۰۰۰ ژن را در ژنوم انسانی مورد شناسایی قرار داده‌اند. هر چند، برای حدود ۱۰/۰۰۰ عدد از این ژن‌های فرضی، هنوز هیچ گونه شواهد مستدلی مبنی بر اینکه واقعا پروتئینی یا RNAای رمزدهی می‌نمایند، وجود ندارد.

یک روش توانمند جهت شناسائی ژن‌های انسانی، مقایسه توالی ژنومی انسان با موش می‌باشد. انسان‌ها و موش‌ها به اندازه کافی به یکدیگر مربوط هستند که بیشترین ژن‌های مشترک را داشته باشند، اما اغلب توالی‌های DNA غیرعملکردی، مانند نواحی بین ژنی و اینترون‌ها در آنها خیلی متفاوت هستند، چون این توالی‌ها تحت فشار شدید انتخابی نیستند. از این رو، قطعات مرتبط از ژنوم انسان و موش که شباهت توالی بالایی را نشان می‌دهند، عمدتا نواحی رمزدهی‌کننده‌ی عملکردی که در واقع همان اگزون‌ها، نواحی کنترلی رونویسی یا توالی‌هایی با عملکردهای دیگری که تا به حال عملکردشان مشخص نشده است، می‌باشند.

1- Homologous
2- Paralogous
3- Orthologous
4- Exressed sequence tag



▲ **شکل ۲۷-۶ (شکل رنگی) مقایسه تعداد و انواع پروتئین‌هایی که در ژنوم یوکاریوت‌های مختلف رمزدهی می‌شوند.** برای هر موجود زنده، سطح کل نمودار دایره‌ای شکل، بیانگر کل تعداد ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین می‌باشد که همگی در ابعاد یکسان نشان داده شده‌اند. در اغلب موارد، عملکرد پروتئین‌هایی که توسط حدود نیمی از ژن‌ها رمزدهی می‌شوند، هنوز ناشناخته می‌باشد (آبی کمرنگ). عملکرد بقیه (یا شناخته شده و یا از طریق شباهت توالی با ژن‌های با عملکرد شناخته شده، تخمین زده شده است)، آن گونه که در راهنمای رنگ‌ها نشان داده شده‌اند، دسته بندی گردیده است.

تعداد ژن‌های رمزدهی‌کننده‌ی پروتئین در ژنوم یک موجودزنده مستقیماً با پیچیدگی زیست شناختی موجود زنده ارتباطی ندارد

ترکیب تعیین توالی ژنومی و الگوریتم‌های کامپیوتری پیدا کننده ژن، به تعیین فهرست کامل ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین برای موجودات زنده گوناگون منجر شده است. شکل ۲۷-۶ تعداد کل ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین در چندین ژنوم یوکاریوتی را که به طور کامل تعیین توالی شده‌اند، نشان می‌دهد. عملکرد حدودا نصف ژن‌های رمزدهی شده در این ژنوم‌ها شناخته شده یا بر اساس مقایسه‌های توالی، تخمین زده شده است. یکی از جنبه‌های قابل توجه چنین مقایسه‌ای این است که تعداد ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین در موجودات زنده مختلف به نظر متناسب با درک ما از پیچیدگی زیست شناختی این موجودات، نمی‌باشد. به عنوان مثال کرم حلقوی الگانس ظاهرا ژن‌های بیشتری نسبت به مگس میوه دروزوفیلا، که دارای طرح بدنی پیچیده‌تر و رفتار پیچیده‌تری است، دارد و تعداد ژن‌ها در انسان‌ها یک و نیم برابر تعداد ژن‌های کرم حلقوی الگانس است.

هنگامی که برای اولین بار مشخص شد انسان‌ها تقریباً دو برابر ژن‌های رمزدهی‌کننده‌ی پروتئین در این کرم‌های حلقوی، ژن دارند، درک این مطلب سخت بود که چگونه چنین افزایش اندک در تعداد پروتئین‌ها توانسته چنین تفاوت فاحشی را در درجه پیچیدگی موجود زنده، بوجود آورد.

واضح است که، فقط تفاوت‌های ساده در تعداد ژن‌ها در ژنوم موجودات مختلف، برای توجیه و توضیح تفاوت‌های موجود در درجه‌ی پیچیدگی زیست شناختی، کافی نیست. پدیده‌های متعددی می‌تواند پیچیدگی‌های بیشتری را در پروتئین‌های بیان شده‌ی یوکاریوت‌های عالی، نسبت به آنچه از ژنوم‌شان تخمین زده می‌شود، ایجاد نمایند. نخست، پیرایش متناوب یک mRNA اولیه می‌تواند mRNAهای با عملکردهای چندگانه، مربوط به یک ژن خاص را ایجاد کند. دوم، تنوع در تغییرات پس از ترجمه برخی پروتئین‌ها،

ممکن است سبب ایجاد تفاوت‌های عملکردی گردد. نهایتاً، افزایش پیچیدگی زیست شناختی در اثر افزایش تعداد سلول‌های ساخته شده از انواع یکسانی از پروتئین‌ها می‌باشد. تعداد بیشتری از سلول‌ها می‌توانند به صورت ترکیبات پیچیده‌تری، (همانگونه که در مقایسه‌ی کورتکس مغز از موش گرفته تا انسان دیده می‌شود)، با یکدیگر میانکنش نمایند. سلول‌های مشابهی در کورتکس مغز انسان و موش قرار دارند، اما در انسان‌ها تعداد بیشتری از آن‌ها اتصالات پیچیده‌تری را تشکیل می‌دهند. تحول و تکامل درجه‌ی پیچیدگی زیست شناختی موجودات زنده چندسلولی احتمالا نیازمند تنظیم پیچیده‌تر در همانند سازی و بیان ژن‌های سلولی می‌باشد که منجر به پیچیدگی بیشتر در نمو جنینی می‌شود.

عملکرد خاص بسیاری از ژن‌ها و پروتئین‌هایی که از طریق تجزیه و تحلیل توالی‌های ژنومی شناسایی شده‌اند، هنوز تعیین نشده است. هنگامی که محققان پرده از راز عملکرد پروتئین‌های خاص و منفرد در موجودات زنده‌ی مختلف برمی‌دارند و در ادامه میانکنش این پروتئین‌ها را با سایر پروتئین‌ها با جزئیات کامل شرح می‌دهند، پیشرفت‌های حاصل بلافاصله می‌تواند برای همه‌ی پروتئین‌های همولوگ در سایر موجودات زنده بکار گرفته شود. زمانی که عملکرد هر پروتئینی شناسایی شده باشد، بی‌شک درک بهتری از اساس مولکولی سیستم‌های پیچیده، پدید خواهد آمد.

پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی و تنوع در تعداد کپی‌های ژنی، عوامل تعیین کننده‌ی مهمی در تفاوت‌های میان افراد یک گونه می‌باشند

توالی DNA بین انسان‌هایی که خویشاوند نزدیک یکدیگر نیستند حدود یک تا ۲ درصد از ۳×۱۰^{۹} جفت باز در ژنوم انسانی، با یکدیگر تفاوت دارد. اغلب این تفاوت‌ها، **پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی**[1] خوانده شده (SNPs)، و احتمالا به لحاظ عملکردی قابل توجه نیستند، زیرا در اینترون‌های بلند یا بین ژن‌ها قرار گرفته و یا منجر به تغییرات کدونی هم‌معنی در نواحی رمزدهی‌کننده می‌شوند. با وجود این، چنین SNPهایی مارکرهای مهمی جهت اندازه‌گیری فراوانی نوترکیبی مابین ژن‌ها بوده و می‌توان آنها را جهت مرتبط نمودن یک ژن خاص با یک صفت یا فنوتیپ، همانگونه که در فصل پنجم شرح داده شده، مورد استفاده قرار داد (شکل ۳۶-۵ را ملاحظه کنید). از سوی دیگر، برخی SNPها ممکن است به لحاظ عملکردی مهم و برجسته باشند چرا که منجر به تغییرات اسیدآمینه‌ای در نواحی رمزدهی‌کننده پروتئین یا تغییرات جفت باز در نواحی کنترلی شده و اتصال فاکتورهای رونویسی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به وضوح در تفاوت‌های بین افراد مشارکت دارند.

نوع دوم از تنوعات ژنتیکی مهم (تفاوت در تعداد کپی‌های ژنی) همین اواخر کشف شده است. آنالیزهای اخیر روی تعداد کپی‌های توالی‌های DNA در هر سلول در افراد مختلف، حذف‌ها، مضاعف شدن‌های پشت سرهم و ترکیب پیچیده‌ای از حذف‌ها و مضاعف شدن‌های گسترده را آشکار ساخت که به میزان قابل توجهی (۱۲ درصد از ژنوم) بین افراد تغییر می‌کند. حذف‌ها میانگین طولی حدود ≈ ۴۰ kb داشته و مضاعف شدن‌های پشت سرهم بطور میانگین حدود kb ۱۲۰ می‌باشند، اما برخی حذف‌ها و مضاعف شدن‌ها خیلی بلندتر هستند. این حذف‌ها و مضاعف شدن‌های متنوع احتمالاً ناشی از کراسینگ‌آور نابرابر بین کروموزوم‌ها طی نوترکیبی میوزی در یک جد مستقیم می‌باشند (شکل ۲-۶ را ملاحظه کنید). این امر منجر به تفاوت در تعداد نسخه‌های ژنی بین افراد می‌گردد.

به عنوان مثال در برخی افراد، حذف در توالی DNA در یک کروموزوم رخ می‌دهد اما توالی طبیعی روی کروموزوم همولوگ وجود دارد، در نتیجه، آنها تنها یک نسخه از ژن‌هایی که در ناحیه‌ی حذف بودند را دارا هستند. علاوه بر این، برخی افراد دارای یک نسخه مضاعف شده از برخی ژن‌ها روی یک کروموزوم می‌باشند که روی کروموزوم همولوگ موجود نبوده و منجر به ایجاد سه نسخه از ژن‌ها در ناحیه‌ی مضاعف شده می‌شود. احتمال دیگری که در برخی افراد دیده شده، مضاعف شدن ژن روی هر دو کروموزوم همولوگ می‌باشد که ۴ نسخه از ژن را ایجاد می‌کند. مضاعف شدن‌های دیگر روی یک یا هر دو کروموزوم می‌تواند منجر به تعداد نسخه ژنی بیشتر از چهار عدد گردد. این تنوعها در تعداد نسخه‌ها با الگوی مندلی به ارث می‌رسند (همین طور برای سایر آلل‌ها) و بعضی مواقع باعث ایجاد تنوع جدیدی می‌شوند که در DNA هیچکدام از والدین مشاهده نشده است.

تنوع در تعداد نسخه‌های بین افراد حتی متداول‌تر از تفاوت‌های موجود در توالی DNA(SNPs) می‌باشد. از آنجا که تنوع در تعداد نسخه‌های ژنی می‌تواند مقدار پروتئینی را که از یک ژن بیان می‌شود تحت تاثیر قرار دهد، تنوع در تعداد نسخه‌ها شاید از جمله مهمترین عوامل تعیین کننده تفاوت‌های فردی در بین انسان‌ها، از جمله تفاوت در میزان مستعد بودن به بیماری‌های گوناگون، باشد. مطالعات

1- Single Nucleotide polymorphisms

بسیاری در حال انجام است تا تاثیر تنوع در تعداد ژنی را روی صفات انسانی از جمله مستعد بودن به بیماری‌ها تعیین کند.

مفاهیم کلیدی بخش ۵-۶

ژنومیکس: آنالیز گستره‌ی ژنومی روی ساختار و بیان ژن

■ عملکرد یک پروتئینی را که جدانشده، اغلب می‌توان بر اساس شباهت توالی اسید آمینه‌ای آن با توالی‌های پروتئین‌های با عملکرد شناخته شده تخمین زد.

■ یک الگوریتم کامپیوتری به نام بلاست به سرعت در منابع اطلاعاتی توالی‌های شناخته شده پروتئین جستجو می‌کند تا پروتئین‌های دارای شباهت چشمگیر به پروتئین مورد نظر را پیدا کند.

■ پروتئین با موتیف‌های عملکردی رایج (که اغلب می‌توانند کوتاه باشند) ممکن است با یک جستجوی بلاست شناسایی نشوند. چنین توالی‌های کوتاهی را می‌توان با جستجوی منابع اطلاعات موتیف پیدا کرد.

■ یک خانواده پروتئینی حاوی چندین پروتئین می‌باشد که همگی از یک پروتئین اجدادی حاصل شده‌اند. ژن‌های رمزدهی کننده این پروتئین‌ها (که خانواده ژنی مربوطه را تشکیل می‌دهند) از مضاعف شدن اولیه ژن و در پی آن اشتقاق طی گونه‌زایی حاصل می‌شود.

■ ژن‌های مرتبط و پروتئین‌های رمزدهی شده آنها که از مضاعف شدن ژن حاصل شده‌اند پارالوگ هستند. مثل α و βگلوبین‌ها که در هموگلوبین ($\alpha_2\beta_2$) با هم ترکیب می‌شوند. آنهایی که در اثر تجمع جهش‌ها طی گونه‌زایی حاصل می‌شوند اورتولوگ هستند. پروتئین‌های اورتولوگ همچون β-گلوبین‌های بالغ در انسان و موش معمولاً عملکرد مشابهی در موجودات مختلف دارند.

■ قالب‌های قابل خواندن (ORFs) نواحی از DNA ژنومی بوده و حداقل ۱۰۰ کدون بین کدون شروع و کدون خاتمه وجود دارد.

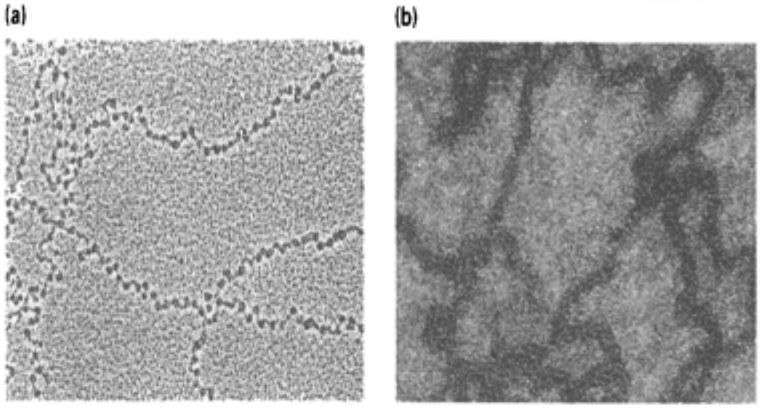
■ جستجوی کامپیوتری برای قالب‌های قابل خواندن (ORFs) در توالی‌های ژنومی مخمر و کل باکتری‌ها به درستی اغلب ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین را شناسایی کرد. اطلاعات زیاد دیگری برای شناسایی ژن‌های احتمالی (فرضی) در توالی‌های ژنومی انسان و یوکاریوت‌های عالی بایستی استفاده شود. چون ساختار ژنی در آن‌ها بسیار پیچیده است (اگزون‌های رمزگردان نسبتاً کوتاه بوسیله اینترون‌های غیررمزگردان نسبتاً بلند از هم جدا می‌شوند)

■ آنالیز توالی ژنوم کامل در موجودات مختلف زیادی نشان می‌دهد که پیچیدگی زیست شناختی بطور مستقیم با تعداد ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین ارتباط ندارد (شکل ۲۷-۶ را ملاحظه کنید).

۶-۶ سازمان دهی ساختاری کروموزوم‌های یوکاریوتی

انواع مختلف از توالی‌های DNA موجود در ژنوم‌های یوکاریوتی و اینکه چگونه این DNAها درون ژنوم‌ها سازمان یافته‌اند را مورد بررسی قرار دادیم، اکنون به این سؤال می‌رسیم که چگونه مولکول‌های DNA در درون سلول‌های یوکاریوتی سازمان دهی می‌شوند. از آنجاکه طول کل DNA در حدود صد هزار برابر قطر یک سلول می‌باشد، بسته بندی شدن DNA برای معماری سلول امری حیاتی است. همچنین بایستی از گره‌خوردگی و به هم پیچیدگی مولکول‌های DNA ممانعت شود تا طی تقسیم سلولی آنها دقیقاً از هم جدا و به سلول‌های دختری منتقل شوند. وظیفه‌ی فشرده کردن و سازمان‌دهی DNA کروموزومی بوسیله‌ی پروتئین‌های فراوان هسته‌ای تحت عنوان هیستون‌ها، به انجام می‌رسد. همانگونه که پیش از این بیان شد، کمپلکس هیستون‌ها، پروتئین‌های غیرهیستونی و DNA، کروماتین را تشکیل می‌دهند. کروماتین با درجات مختلف تاخوردگی یا فشردگی وجود دارد (شکل ۱-۶ را ملاحظه کنید).

نیمی از کروماتین، به لحاظ جرمی DNA و نصف دیگرش پروتئین بوده و در سلول‌های اینترفازی (آن‌هایی که در حال انجام میتوز نیستند)، و در کل هسته پراکنده است. تاخوردگی و فشرده شدن بیشتر کروماتین طی میتوز، باعث ایجاد کروموزوم‌های متافازی می‌شود. مورفولوژی و خصوصیات رنگ شدگی کروموزوم‌های متافازی توسط سیتوژنتیکدانان نخستین، با تفصیل بیشتری بررسی شده است. گرچه هر کروموزوم یوکاریوتی شامل میلیون‌ها مولکول پروتئینی منفرد می‌باشد، اما هر کروموزوم حاوی تنها یک مولکول DNA خطی خیلی بلند است. بلندترین مولکول‌های DNA در کروموزوم‌های انسانی، به عنوان مثال، $2/8\times10^8$ جفت باز یا تقریباً ۱۰cm، درازا دارند. سازمان‌یابی ساختاری کروماتین امکان می‌دهد تا چنین طول خارق‌العاده‌ای از DNA در محدوده‌های میکروسکوپی در هسته‌ی سلولی فشرده گردد. با وجود این کروماتین به نحوی



◀ شکل تجربی ۲۸-۶ اشکال گسترده و متراکم شده کروماتین استخراج شده، دارای ظاهر خیلی متفاوتی در میکروگراف‌های الکترونی می‌باشند. (a) کروماتین تخلیص شده در بافر با قدرت یونی کم دارای یک ظاهر گسترده شده بصورت "دانه‌های تسبیح روی یک رشته" می‌باشد. دانه‌های تسبیح، نوکلئوزوم‌ها (قطر ۱۰-nm) و رشته همان DNA رابط می‌باشد. (b) کروماتین تخلیص شده در بافری با قدرت یونی فیزیولوژیکی (۰/۱۵M-KCL) به صورت یک رشته متراکم با قطر ۳۰ نانومتر ظاهر می‌شوند.

سازمان‌دهی می‌شود تا توالی‌های خاص DNA در درون کروماتین، به راحتی برای فرآیندهای سلولی مانند رونویسی، همانندسازی، ترمیم و نوترکیبی مولکول‌های DNA، در دسترس باشند. در این قسمت ما خواص کروماتین و سازمان یابی آن به صورت کروموزوم‌ها را مورد توجه قرار می‌دهیم. ویژگی‌های مهم کروموزوم‌ها در کل، موضوع قسمت بعدی خواهد بود.

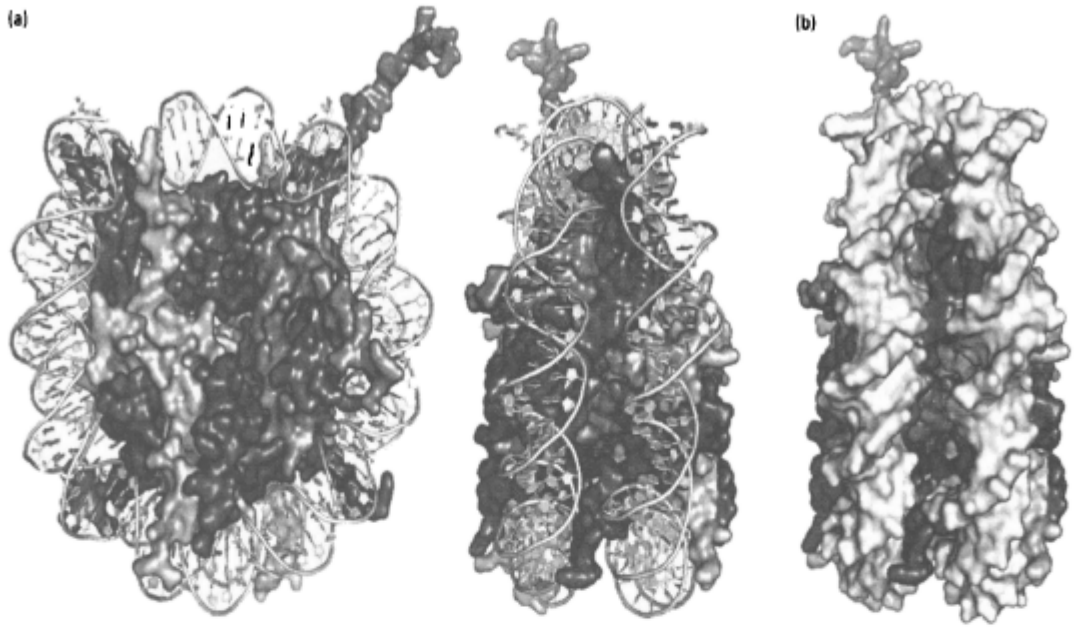
کروماتین به صورت اشکال گسترده شده و متراکم وجود دارد

هنگامی که DNA از یک هسته یوکاریوتی با استفاده از روشی که میانکنش‌های طبیعی پروتئین - DNA را حفظ می‌نماید، تخلیص می‌گردد، با جرم یکسانی از پروتئین در کمپلکس نوکلئوپروتئینی تحت عنوان کروماتین همراه است. هیستون‌ها، (فراوان‌ترین پروتئین‌ها در کروماتین)، خانواده‌ای از پروتئین‌های اساسی و کوچک را تشکیل می‌دهند. ۵ نوع عمده پروتئین‌های هیستونی - تحت عنوان H1، H2A، H2B، H3 و H4 غنی از اسیدهای‌آمینه با بار مثبت بوده و که با گروههای فسفات با بار منفی در DNA میانکنش می‌دهند.

هنگامی که کروماتین از هسته‌ها استخراج شده و در میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار می‌گیرد، ظاهرش به غلظت نمکی که در معرض آن قرار گرفته وابسته می‌باشد. در غلظت پایین نمک و در غیاب کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند Mg^{2+}، کروماتین تخلیص شده به شکل "دانه‌های تسبیح روی رشته" می‌باشد (شکل ۲۸a-۶). در این شکل گسترده شده، رشته از DNA آزاد تحت عنوان DNA "رابط" تشکیل شده است که ساختارهای دانه مانند تحت عنوان **نوکلئوزوم‌ها**[1] را به یکدیگر متصل می‌سازد. نوکلئوزوم‌ها از DNA و هیستون‌ها تشکیل شده‌اند و نوکلئوزوم‌ها حدود ۱۰ نانومتر قطر داشته و واحدهای ساختاری اولیه در کروماتین می‌باشند. اگر کروماتین در غلظت نمک فیزیولوژیک تخلیص گردد، شکل رشته مانند متراکم‌تری را به خود می‌گیرد که ۳۰ نانومتر قطر دارد (شکل ۲۸b-۶).

ساختار نوکلئوزوم‌ها . DNA نوکلئوزوم به میزان خیلی کمتری نسبت به DNA رابط بین نوکلئوزوم‌ها به هضم نوکلئازی مستعد است. اگر تیمار نوکلئازی به دقت کنترل شود، همه‌ی DNA رابط می‌تواند هضم شود، که این امر نوکلئوزوم‌های جداگانه را با DNA شان آزاد می‌سازد. یک نوکلئوزوم تشکیل شده است از یک مرکز پروتئینی با DNAای که دور سطح آن مانند نخ دور یک قرقره پیچیده شده است. هسته مرکزی، اکتامری حاوی دو نسخه از هر یک از هیستون‌های H2A و H2B و H3 و H4 می‌باشد. کریستالوگرافی اشعه x نشان داده که هسته هیستونی اکتامری، ساختار دیسک مانندی داشته و از زیرواحدهای هیستونی به هم چفت شده تشکیل شده است (شکل ۲۹-۶). نوکلئوزوم‌های همه یوکاریوت‌ها حاوی ۱۴۵ جفت باز DNA می‌باشد که یک و دو سوم دور، به دور هسته‌ی پروتئینی می‌پیچد. طول DNA رابط در بین گونه‌ها بسیار متغیرتر می‌باشد و حتی بین سلول‌های مختلف یک موجود زنده، از ۱۰ تا ۹۰ جفت باز متغیر می‌باشد. طی همانندسازی سلولی، DNA زمان کوتاهی بلافاصله پس از عبور چنگال همانندسازی به صورت نوکلئوزوم درمی‌آید (شکل ۳۳-۴). این فرآیند وابسته به چاپرون‌های خاصی است که به هیستون‌ها متصل می‌گردند و آنها را با DNAای که تازه همانندسازی شده، به صورت نوکلئوزوم‌ها سرهم بندی می‌نمایند.

1- Nocleosome



▲ **شکل ۲۹-۶ (شکل رنگی) ساختار نوکلئوزوم براساس کریستالوگرافی اشعه‌ی X** (a) نوکلئوزوم با مدل فضاپرکن از هیستون‌ها. اسکلت قند – فسفات رشته‌های DNA جهت بهتر دیده شدن هیستون‌ها به صورت لوله‌های خاکستری رنگ نشان داده شده‌اند. نوکلئوزوم از بالا (چپ) و از کنار (راست؛ نمای کناری به اندازه نود درجه در جهت عقربه‌های ساعت از نمای بالا چرخانده شده است). (b) مدل فضاپرکن از هیستون‌ها و DNA (سفید) که از نمای کنار نوکلئوزوم، دیده می‌شود. این مدل با وضوح بیشتری نشان می‌دهد که DNA اغلب پروتیئنی را که روی سطح جانبی نوکلئوزوم قرار گرفته است، پوشش می‌دهد. زیرواحدهای H2A به رنگ طلایی، H2Bها قرمز، H3ها آبی، H4ها سبز هستند. دنباله‌های انتهای N، هیستون و دو دنباله انتهای H2A C و H2B در متراکم شدن کروماتین دخیل بوده و قابل مشاهده نیستند، زیرا در کریستال، به هم ریخته و نامنظم می‌شوند.

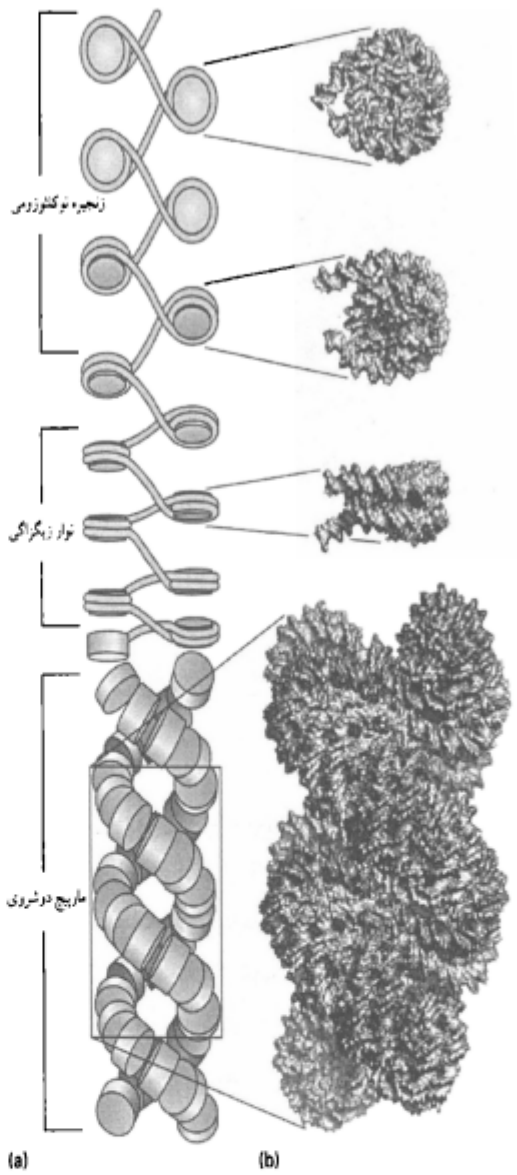
ساختار رشته ۳۰ نانومتری . اغلب قسمت‌های کروماتین، پس از اینکه در بافرهای ایزوتونیک از سلول‌ها استخراج می‌گردند (یعنی بافرهایی با همان غلظت نمک موجود در سلول‌ها، $MgCl_2$، 0.004 M و KCl ، 0.15 M≈)، به صورت رشته‌ای با قطر ۳۰nm ظاهر می‌شود (شکل ۲۸b-۶). تحقیقات کنونی، از جمله کریستالوگرافی اشعه‌ی x از نوکلئوزوم‌های ساخته شده از هیستون‌های نوترکیب، بیانگر این امر است که رشته ۳۰nm دارای یک ساختار *نواری زیکزاگ[1] است که به صورت یک مارپیچ دو شروعه[2] متشکل از دو رشته از نوکلئوزوم بوده و این نوکلئوزوم‌ها مانند سکه‌هایی بر روی هم قرار می‌گیرند (شکل ۳۰-۶). سپس دورشته از نوکلئوزوم‌های روی هم قرارگرفته به صورت یک مارپیچ دوگانه مشابه با مارپیچ دوگانه DNA به هم می‌پیچند، با این تفاوت که این مارپیچ چپ گرد ولی مارپیچ DNA راست گرد است.

رشته‌های ۳۰ نانومتری همچنین H1، پنجمین هیستون اصلی، را نیز دارند. H1 در محل ورود و خروج DNA به هسته نوکلئوزومی به DNA متصل می‌گردد، اما ساختارش در رشته ۳۰ نانومتری در سطح اتمی، شناخته شده نیست.

کروماتین در نواحی کروموزومی که در حال رونویسی یا همانندسازی نیستند، عمدتا به شکل متراکم رشته ۳۰ نانومتری و همین طور به شکل ساختارهای با درجه تاخوردگی بالاتر و با کنفورماسیون دقیقی که فعلا درک درستی از آن در دسترس نیست، وجود دارد. تصور می‌شود نواحی از کروماتین که به طور فعالانه‌ای در حال رونویسی شدن هستند، شکل دانه‌های تسبیح را به خود می‌گیرند.

حفاظت از ساختار کروماتین . ساختار کلی کروماتین به نحو قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های تمامی یوکاریوت‌ها از جمله قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات، مشابه بوده و بیانگر این امر است که ساختار کروماتین در مراحل اولیه تکامل سلول‌های یوکاریوت، بهینه شده است. توالی اسید آمینه‌ای برای ۴ هیستون (H2B ،HzA، H3 و H4) بین گونه‌های

1- Zig-Zag ribbon 2- Two-start helix



◀ شکل ۳۰-۶ (شکل رنگی) ساختار فیبروکروماتین ۳۰ نانومتری. (a) مدلی برای تاخوردن یک زنجیره‌ی کروماتینی در بالا به یک "نوار زیگزاگی" از نوکلئوزوم‌ها که حاوی دو رشته می‌باشد. در هر رشته، نوکلئوزوم‌ها مانند یک دسته سکه‌های روی هم، قرار گرفته‌اند. این دو رشته از نوکلئوزوم‌ها سپس به صورت یک مارپیچ دوگانه چپ گرد تحت عنوان مارپیچ دو شروعه ("two-start" helix) پیچ می‌خورند. برای سادگی شکل، DNA در هلیکس دو شروعه به تصویر کشیده نشده است. (b) مدل فیبر ۳۰ نانومتری براساس کریستالوگرافی اشعه X از یک تترانوکلئوزوم (رشته کوتاهی از ۴ نوکلئوزوم). DNA روی نوکلئوزوم‌های دیگر برای شناسایی بهتر، به ترتیب به رنگ آبی کم رنگ و پررنگ نمایش داده شده‌اند.

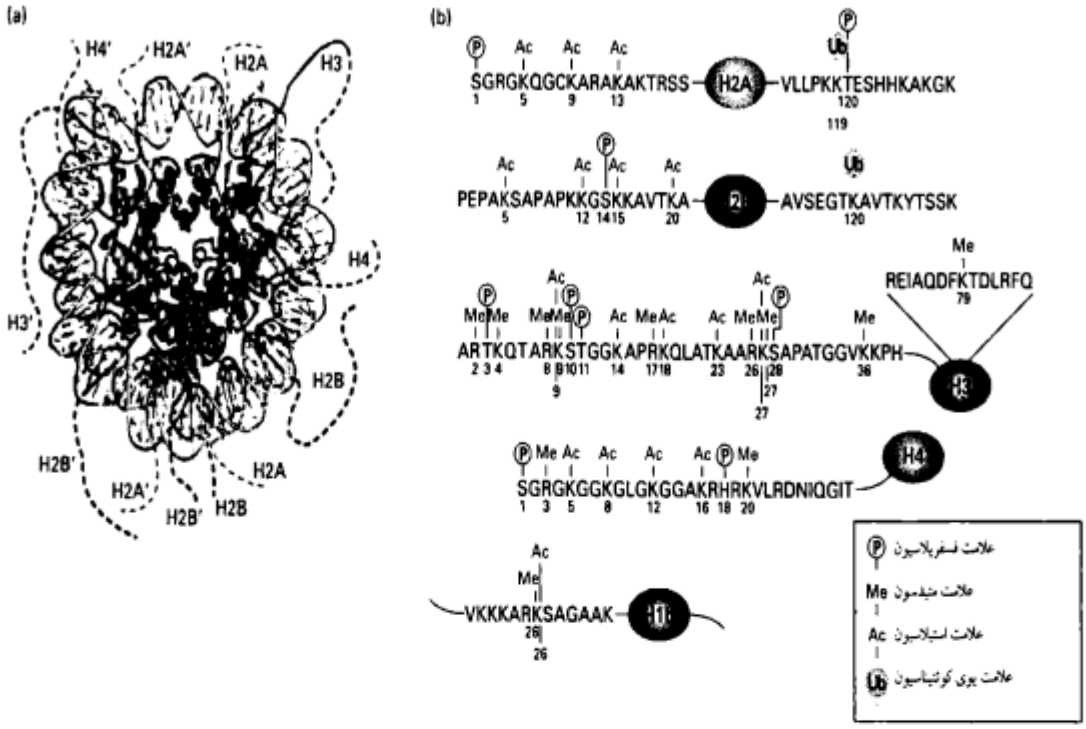
مرتبط دور، بسیار حفاظت شده است. به عنوان مثال، توالی‌های مربوط به هیستون H3 در بافت توتیایی دریایی و تیموس گاو تنها در یک اسیدآمینه متفاوت هستند و H3 مربوط به نخود و تیموس گاو تنها در چهار اسیدآمینه تفاوت دارند. هیچ‌گونه انحراف قابل توجهی در توالی‌های اسید آمینه‌ای هیستون‌ها دیده نمی‌شود. توالی اسید آمینه‌ای H1 از یک موجود زنده تا موجود زنده‌ی دیگر، تنوع بیشتری نسبت به سایر هیستون‌های اصلی نشان می‌دهد. شباهت در توالی بین هیستون‌های همه یوکاریوت‌ها بیانگر این امر است که همگی به شکل کنفورماسیون بسیار مشابهی تا می‌خوردند که این شکل در مراحل اولیه‌ی تکامل در جد مشترک همه‌ی یوکاریوت‌های امروزی، جهت عملکرد هیستونی، بهینه سازی شده است.

گونه‌های اقلیت هیستون که توسط ژن‌هایی متفاوت از انواع به شدت حفاظت شده رمزدهی می‌شوند، به خصوص در مهره داران نیزوجود دارد. به عنوان مثال، یک نوع ویژه‌ای از H2A، تحت عنوان H2AX در همه نواحی کروماتین به جای H2A در درون نوکلئوزوم‌ها در قسمت کوچکی از نوکلئوزوم‌ها در همه‌ی نواحی کروماتین، شرکت جسته‌اند. در جایگاههای شکست DNA دورشته‌ای در DNA کروموزومی، H2AX فسفریله شده و احتمالا از طریق عمل به عنوان جایگاه اتصالی برای پروتئین‌های ترمیمی، در فرآیند ترمیم کروموزومی شرکت می‌نماید. در نوکلئوزوم‌های سانترومری، H3 توسط گونه‌ی دیگری از هیستون‌ها تحت عنوان CENP-A جایگزین می‌گردد که در اتصال ریزلوله‌های دوک طی تقسیم میتوز شرکت دارد. اغلب گونه‌های اقلیت هیستونی تنها اندکی در توالی نسبت به هیستون‌های اصلی تفاوت دارند. این تغییرات اندک در توالی هیستونی ممکن است پایداری نوکلئوزوم را علاوه بر تمایلش به تا خوردن به صورت فیبر ۳۰ نانومتری و سایر ساختارهای با نظم بالاتر تحت تاثیر قرار می‌دهد.

تغییرات در دُم‌های هیستونی، متراکم شدن و عملکرد کروماتین را کنترل می‌نماید

هر کدام از پروتئین‌های هیستونی تشکیل دهنده هسته‌ی نوکلئوزومی را دارای انتهای N با ۳۹-۱۹ اسیدآمینه هستند که از ساختار کروی نوکلئوزوم بیرون زده‌اند. پروتئین‌های H2A و H2B دارای یک انتهای C نیز است که از هسته اکتامری کروی هیستونی بیرون زده است. این پایانه‌ها که **دُم‌های هیستونی**[1] نامیده می‌شوند، در مدل ارائه شده در شکل ۳۱a-۶ نشان داده شده‌اند. دُم‌های

1- Histone tails

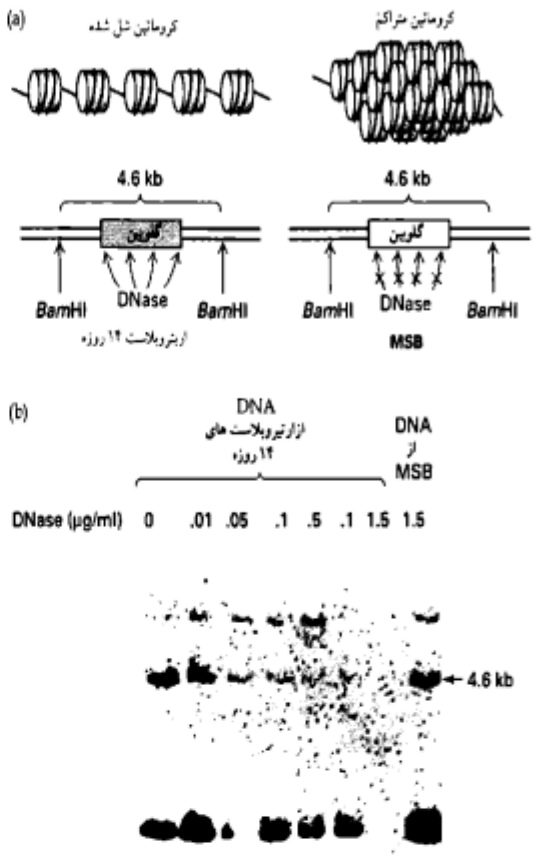


▲ **شکل ۳۱-۶ دم‌های هیستونی و تغییرات پس ترجمه‌ای شان.** (a) مدل یک نوکلئوزوم با نمایی از بالا و با هیستون‌هایی که به صورت اشکال نواری نشان داده شده است. این مدل طول دم‌های هیستونی (خطوط نقطه چین) را به تصویر می‌کشد که در ساختار کریستالی قابل مشاهده نمی‌باشد (شکل ۲۹-۶). دم‌های انتهای H2A N در پایین و دم‌های انتهای C در بالا هستند. دم‌های انتهای H2B N در راست و چپ و دم‌های انتهای H2B C در پائین قسمت میانی قرار دارند. هیستون‌های H3 و H4 دارای دم‌های انتهای C کوتاهی بوده و تغییر نیافته‌اند. (b) خلاصه‌ای از تغییرات پس ترجمه‌ای مشاهده شده در هیستون‌های انسانی. توالی‌های دم‌های هیستونی به صورت کد تک حرفی اسیدآمینه‌ای نشان داده می‌شوند (شکل ۱۴-۲). بخش اصلی هر هیستون به صورت یک بیضی به تصویر کشیده شده است. این تغییرات همگی همزمان روی یک مولکول هیستونی رخ نمی‌دهد. به بیان دقیق‌تر، ترکیب خاصی از یک مجموعه از تغییرات اندک مربوط به یک هیستون در هر نوکلئوزوم خاص مشاهده می‌شوند.

هیستونی جهت متراکم شدن کروماتین از کنفورماسیون دانه‌های تسبیح به فیبر ۳۰ نانومتری مورد نیاز می‌باشند. به عنوان مثال، آزمایشات اخیر بیانگر این مطلب می‌باشد که دُم‌های انتهای N مربوط به هیستون H4، بویژه لیزین ۱۶، جهت تشکیل فیبر ۳۰ نانومتری حیاتی می‌باشند. این لیزین با بار مثبت با قسمت منفی موجود در سطح میانی H2B و H2A مربوط به نوکلئوزوم بعدی در نوکلئوزوم‌های روی هم قرار گرفته فیبر ۳۰ نانومتری، میانکنش می‌دهد (شکل ۳۰-۶).

دُم‌های هیستونی هدف تغییرات پس ترجمه‌ای متعددی مانند استیلاسیون، متیلاسیون، فسفریلاسیون و یوبی کوئیتیناسیون قرار می‌گیرند. شکل ۳۱b-۶ انواع تغییرات پس ترجمه‌ای مشاهده شده در هیستون‌های انسانی را به تصویر می‌کشد. یک پروتئین هیستونی خاص، هیچگاه همزمان همه این تغییرات را ندارد، اما هیستون‌های موجود در یک تک نوکلئوزوم ممکن است مجموعاً حاوی چندین نوع متفاوت از تغییرات باشند. از ترکیب خاص تغییرات پس ترجمه‌ای یافت شده در نواحی مختلف کروماتین چنین برداشت می‌شود که این تغییرات یک رمز هیستونی را می‌سازند تا از طریق ایجاد یا برداشتن جایگاههای اتصال برای پروتئین‌های همراه کروماتین، بر عملکرد کروماتین تاثیر بگذارند. ما در اینجا فراوان‌ترین انواع تغییرات موجود در دُم‌های هیستونی و اینکه چگونه این تغییرات، متراکم شدن و عملکرد کروماتین را کنترل می‌نمایند، شرح خواهیم داد و با بحث درباره متراکم شدن کروماتین و غیرفعال سازی کروموزوم‌های X در پستانداران ماده این قسمت را به پایان می‌رسانیم.

استیلاسیون هیستون . لیزین‌های دم هیستون دستخوش استیلاسیون و داستیلاسیون برگشت‌پذیر توسط آنزیم‌هایی قرار



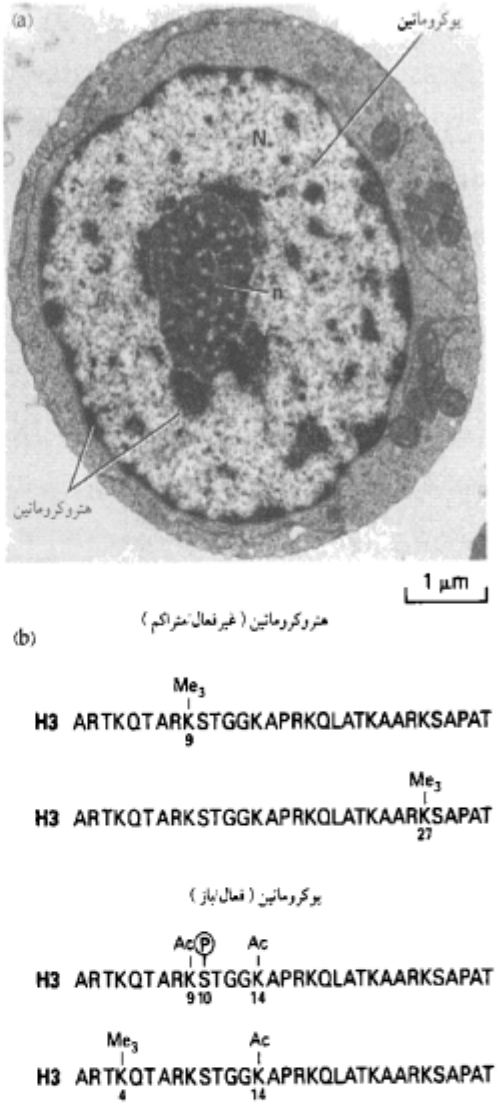
▲ **شکل تجربی ۳۲-۶ ژن‌هایی که رونویسی نمی‌شوند در مقایسه با ژن‌های فعال کمتر در معرض هضم DnaseI قرار می‌گیرند.** اریتروبلاست‌های جنین جوجه در مدت ۱۴ روز بصورت فعال گلوبین سنتز می‌نمایند، در حالیکه سلول‌های کشت‌داده‌شده MSB تمایز نیافته گلوبین سنتز نمی‌کنند. (a) هسته‌ها از هر دو نوع سلول جداسازی شده و درمعرض غلظت‌های افزایش یافته DnaseI قرار گرفت. DNA هسته سپس خالص شده و با آنزیم محدود کننده BamH1 تیمارشد. این آنزیم DNAپیرامون توالی گلوبین را شکست داده و بصورت طبیعی یک قطعه گلوبین ۴/۶کیلوبازی آزادمی‌کند. (b)DNAهضم‌شده توسط DnaseI و BamH1 بوسیله یک پروب نشان دار شده با DNA گلوبین بالغ مورد آنالیز ساترن بلات قرار گرفت. این DNA گلوبین بالغ با قطعه حاصل از BamH1 ۴/۶kb هیبرید می‌شود. اگر ژن گلوبین به هضم اولیه توسط DnaseI حساس باشد، می‌تواند مکررا شکسته شود و انتظار نمی‌رود که این قطعه را نشان بدهد. همانطور که در ساترن بلات دیده می‌شود، DNA فعال از نظر رونویسی از سلول‌های ۱۴ روزه سنتز کننده گلوبین به هضم‌توسط DnaseI مستعد بوده و در آنها باند ۴/۶kb در غلظت‌های بالاتر نوکلئاز دیده نشد. در عوض،DNA غیرفعال ازسلول‌هایMSB به‌هضم مقاوم بود. این نتایج پیشنهاد می‌کند DNA غیرفعال درفرم فشرده‌تر کروماتین است که درآن ژن گلوبین‌ازهضم DnaseI در امان است.

می‌گیرند که روی لیزین‌های خاص در انتهای N عمل می‌کنند. در فرم استیله، بار مثبت گروه ε آمینولیزین خنثی است. همانطور که قبلا اشاره شد، لیزین ۱۶ در هیستون H4 مخصوصا برای تاخوردگی فیبر ۳۰ نانومتری مهم است زیرا با یک قسمت باردار منفی روی سطح نوکلئوزوم مجاور در فیبر میانکنش می‌دهد. در نتیجه وقتی لیزین ۱۶ H۴ استیله می‌شود، تراکم دانه‌ها روی یک تسبیح کمتر شده و آن را برای همانندسازی و رونویسی مستعد می‌سازند.

استیلاسیون هیستون در جایگاههای دیگر در H4 و در هیستونهای دیگر (شکل ۳۱b-۶ را ملاحظه کنید). با حساسیت افزایش یافته DNA کروماتین به هضم بوسیله نوکلئازها مرتبط می‌باشد. این پدیده می‌تواند بوسیله هضم هسته‌های جدا شده بوسیله DnaseI اثبات گردد. با هضم بعدی، DNA کاملاً از پروتئین کروماتین جدا می‌شود، سپس هضم بوسیله یک آنزیم محدودکننده تکمیل شده و با وسترن بلات آنالیز می‌گردد. یک ژن دست نخورده و تیمار شده با آنزیم محدود کننده قطعاتی با اندازه‌های خاص تشکیل می‌دهد. اگر یک ژن اول در مجاورت Dnase قرار بگیرد، در جایگاههای تصادفی در داخل محدوده‌هایی از جایگاهای برش آنزیم محدود کننده، شکسته می‌شود. در نتیجه همه باندهای ساترن بلات که بصورت معمول با آن ژن دیده می‌شوند، از دست خواهند رفت. این روش بکار رفته تا نشان دهد ژن β-گلوبین که از نظر رونویسی در سلول‌های غیراریتروئیدی، غیرفعال است، با هیستونهای نسبتا غیراستیله تجمع یافته و در نتیجه مقاومت به DnaseI در آنها نسبت به سلول‌های با ژن β-گلوبین فعال خیلی بیشتر است. مقاومت کمتر در سلول‌های با ژن β-گلوبین فعال با هیستونهای استیله مرتبط می‌باشد. (شکل ۳۲-۶). این نتایج حاکی از این هستند که ساختار کروماتین DNAایکه رونویسی نمی‌شود، بیشتر محافظت می‌گردد. در کروماتین متراکم، DNA شدیداً دور از دسترس DnaseI می‌باشد و این بخاطر ارتباط نزدیک آن با هیستونها و پروتئین‌های دیگر مرتبط با کروماتین است که به دمهای هیستونی غیراستیله متصل می‌شوند. در عوض، DNA فعال از نظر رونویسی خیلی بیشتر در دسترس DnaseI است چون این DNA به صورت فرم گسترده نخ و تسبیح وجود دارد.

مطالعات ژنتیکی در مخمر حاکی از این است که هیستون استیلازها[1] (HATs)، که ریشه‌های لیزین خاص را در هیستون استیله می‌کنند، برای فعال‌سازی کامل رونویسی تعدادی از ژن‌ها مورد نیاز می‌باشند. در نتیجه تصور می‌شود کنترل استیلاسیون انتهای N هیستون در نواحی کروموزومی خاص مربوط به کنترل رونویسی بیان

1- Histone Acetslases



▲ **شکل تجربی ۳۳-۶ هتروکروتین در برابر یوکروماتین.** (a) در این میکروگراف الکترونی از یک سلول بنیادی مغز استخوان، نواحی دارای رنگ تیره در هسته (N) بیرون از هستک (n)، هتروکروماتین هستند. رنگ روشن نواحی یوکروماتین را نشان می‌دهد. (b) همانطور که در اینجا برای H3 نشان داده شده است، تغییرات دم انتهای N هیستون در هتروکروماتین و یوکروماتین متفاوت هستند. به یاد داشته باشید دم‌های هیستونی در یوکروماتین معمولاً بیشتر از هتروکروماتین استیله هستند. هتروکروماتین خیلی متراکم‌تر بوده (در نتیجه کمتر در دسترس پروتئین‌ها است) و نسبت به یوکروماتین فعالیت رونویسی کمی دارد.

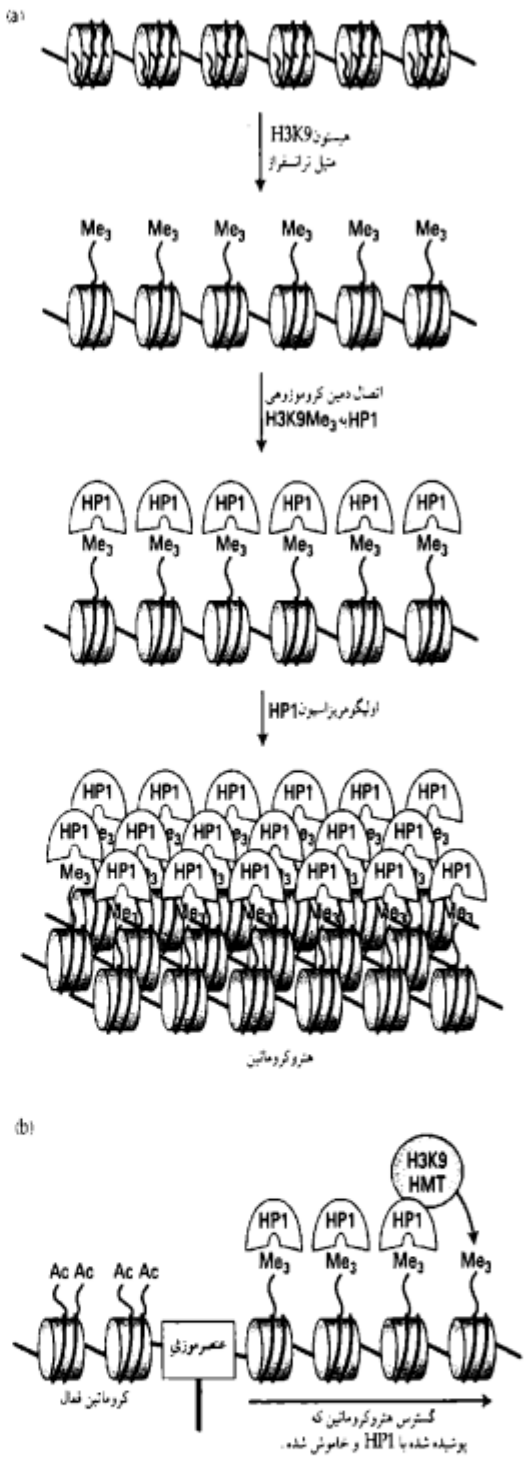
ژن بوسیله مکانیسم شرح داده شده در زیر و در فصل بعد باشد. وقتی ژن‌ها در نواحی تاخورده و متراکم کروماتین باشند کمتر از ژن‌های از تراکم درآمده، در دسترس Dnase1 اضافه شده قرار گرفته و از میانکنش RNA پلیمرازها و سایر پروتئین‌های مورد نیاز برای رونویسی نیز با DNA در کروماتین متراکم ممانعت می‌شود.

تغییرات دیگر هیستون‌ها. همانطور که در شکل ۶-۳۱b نشان داده شده، دم‌های هیستونی در کروماتین می‌توانند دستخوش دسته‌ای از تغییرات دیگر در اسیدهای‌آمینه گردند. گروه‌های ε-آمینولیزین می‌توانند متیله شوند. فرآیند متیلاسیون از استیلاسیون جلوگیری کرده و در نتیجه باعث حفظ بار مثبت ε-آمینولیزین می‌گردد. علاوه بر این،گروههای ε آمینولیزین می‌تواند یک، دو و سه بار متیله شوند. زنجیره‌های جانبی آرژنین نیز می‌توانند متیله شوند. زنجیره‌های جانبی سرین و ترئونین می‌توانند بصورت برگشت‌پذیر فسفریله شده و یک بار منفی را ایجاد نمایند. در نهایت، یک مولکول یوبی کوئیتین ۷۶ اسیدآمینه‌ای می‌تواند بصورت برگشت‌پذیر به لیزین در دم‌های انتهای C هیستونهای H2A و H2B افزوده شود. بخاطر داشته باشید که افزوده شدن چندین مولکول یوبی کوئیتین به یک پروتئین می‌تواند آن را برای تجزیه توسط پروتئوزوم نشان دار کند. (شکل ۳-۲۹b را ملاحظه کنید). در این مورد، اضافه شدن یک مولکول یوبی‌کوئیتین، پایداری هیستون را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد، اما ساختار کروماتین را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

همانطور که قبلا اشاره شد، ترکیب دقیقی از اسیدهای آمینه تغییر یافته در دم‌های هیستونی به کنترل تراکم یا فشردگی کروماتین و پایداری آن برای رونویسی، همانندسازی و ترمیم شدن کمک می‌نماید. این موضوع می‌تواند توسط مقایسه تغییرات خاص مشاهده شده در کروماتین شدیداً متراکم بنام ***هتروکروماتین*** با کروماتین دارای تراکم کمتر بنام ***یوکروماتین*** (شکل ۶-۳۳a) اثبات گردد. هتروکروماتین بعد از میتوز کاملا باز نمی‌شود و در طی اینترفاز بصورت یک حالت فشرده باقی می‌ماند. این حالت فشرده بخصوص در سانترومرها و تلومرهای کروموزوم‌ها و همچنین برخی موقعیت‌های مجزای دیگر یافت می‌شود. وقتی سلول‌ها در معرض رنگ‌های متصل شونده به DNA قرار می‌گیرند، نواحی از هتروکروماتین به رنگ خیلی تیره درمی‌آیند. در عوض، نواحی از یوکروماتین که در طی اینترفاز کمتر فشرده هستند، با رنگ‌های DNA اندکی به صورت روشن درمی‌آیند. معمولاً، اغلب نواحی رونویسی شونده DNA در یوکروماتین یافت می‌شوند، در حالیکه هتروکروماتین از نظر رونویسی غیرفعال است.

دُمین‌های پروتئینی دیگر تغییرات دُم‌های هیستونی معمول یوکروماتین را متحمل می‌شوند. به عنوان مثال، ***برومودُمین***[1] به دُم‌های هیستونی استیله شده متصل می‌گردد و بنابراین در

1- Bro modomain



◀ شکل ۳۴-۶ مدلی برای تشکیل هتروکروماتین از طریق اتصال HP1 به هیستون H3 که در لیزین ۹ تری-متیله شده است. HP1 (a) از طریق اتصال به دم‌های انتهای N هیستونی H3 که در لیزین ۹ تری‌متیله شده است ($H3K9Me_3$)، در تراکم هتروکروماتین نقش دارد. به دنبال آن مولکول هیستون متصل به HP1 با همدیگر تجمع می‌یابند. (b) متراکم شدن هتروکروماتین می‌تواند در طول یک نوکلئوزوم گسترش یابد، چون HP1 به یک هیستون متیل ترانسفراز[1] (HMT) متصل می‌گردد که لیزین ۹ مربوط به هیستون H3 را متیله می‌کند. این امر سبب ایجاد جایگاه اتصالی برای HP1 روی نوکلئوزوم مجاور می‌گردد. فرآیند گسترش ادامه می‌یابد تا هنگامی که با یک "عنصر مرزی" مواجه شود.

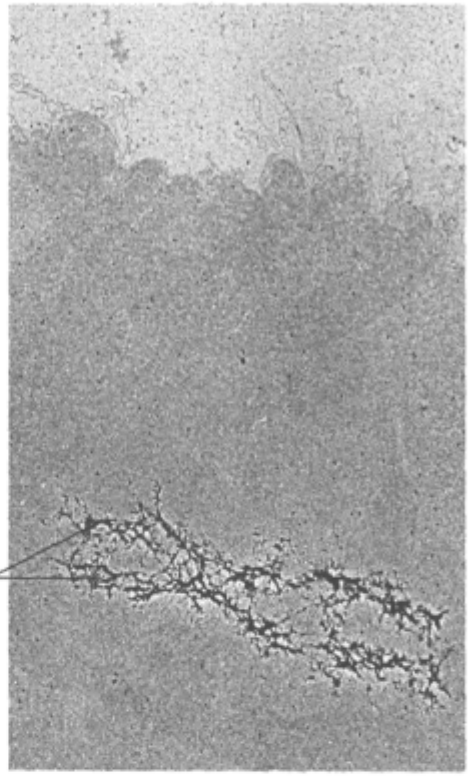
کروماتینی که به لحاظ رونویسی فعال است، یافت می‌شود. TFIID، پروتئینی که در رونویسی دخیل بوده و حاوی دو برومودُمین را که با فاصله‌ی کم از هم مباشند. این برومودُمین‌ها احتمالا TFIID برای حضور یافتن در کروماتین با رونویسی فعال (یعنی یوکروماتین) یاری می‌نمایند. این پروتئین [TFIIDI] همچنین دارای فعالیت هیستون استیلازی نیز می‌باشد و ممکن است کروماتین را در یک حالت هیپراستیله شده که منجر به رونویسی می‌شود، حفظ نماید.

به طور خلاصه انواع مختلف تغییرات کووالانت مربوط به دم‌های‌هیستونی می‌تواند از طریق اعمال تغییرات کوچک روی میانکنش‌های نوکلئوزوم - نوکلئوزوم و همین‌طور از طریق‌میانکنش با پروتئین‌های دیگر که در فرآیندهایی مانند رونویسی و همانندسازی DNA شرکت دارند، و یا آن‌ها را تنظیم می‌نمایند، ساختار کروماتین را تحت تاثیر قرار دهند. مکانیسم‌ها و فرآیندهای مولکولی کنترل کننده تغییرات کروماتینی، تنظیم‌کننده‌ی رونویسی هستند و با جزئیات کامل‌تری در فصل بعد، مورد بحث قرار می‌گیرند.

غیرفعال شدن کروموزوم X در پستانداران ماده یک مورد مهم از تشکیل هتروکروماتین که با غیرفعال شدن ژنی در پستانداران مرتبط است، غیرفعال شدن یا متراکم شدن تصادفی یکی از دو کروموزوم جنسی ماده (کروموزوم‌های X) در تقریباً همه سلول‌های دیپلوئیدی ماده‌های بالغ می‌باشد. غیرفعال شدن یک کروموزوم X در ماده‌ها منجر به *جبران مقداری*[2] می‌گردد، فرآیندی که سبب بیان یکسان ژن‌ها روی کروموزوم جنسی در نرها و ماده‌ها می‌گردد. X غیرفعال در سلول‌های اینترفازی به صورت هتروکروماتین ظاهر گشته و به صورت یک ساختار محیطی سیاه رنگ تحت عنوان جسم بار (Barr body) که به نام کاشفش نام‌گذاری شده است، قابل رویت می‌باشد. هر پستاندار ماده دو کروموزوم X دارد، که یکی را از طریق تخمک گرفته و به صورت (X_m) نشان داده می‌شود و دیگری را از اسپرم(X_p) می‌گیرد. در مراحل اولیه‌ی نمو جنینی، غیرفعال شدن تصادفی هر کدام از کروموزوم‌های X_m یا X_p در هر سلول رخ

1- Histone Methyle transferase

2- Dosage compensation



▲ **شکل تجربی ۳۵-۶ میکروگراف الکترونی از کروموزوم متافازی عاری از هیستون به وضوح داربست مشخصی را نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد DNA به اطراف آن سازمان می‌یابد** حلقه‌های طویل DNA که از این داربست پروتئینی غیرهیستونی (ساختار تیره) بیرون زده‌اند. این داربست بیانگر شکل یک کروموزوم متافازی است. اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد پروتئین‌های غیرهیستونی، ساختار پیوسته‌ای را که تنها مسئول تعیین شکل یک کروموزوم متافازی باشد، (امری که از یک ساختار داربست حقیقی انتظار می‌توان داشت) تشکیل نمی‌دهند. این کروموزوم از سلول‌های هلا و از طریق تیمار با یک دترجنت تهیه شده است.

می‌دهد. در جنین ماده، حدود نیمی از سلول‌ها دارای یک X_m غیرفعال و نیمی دیگر دارای یک X_p غیرفعال می‌باشند. همه سلول‌های دختر حاصل، همان کروموزوم X غیرفعال سلول‌های والد خویش را حفظ می‌نمایند. در نتیجه، ماده بالغ، موزاییکی از کلون‌ها می‌باشد که برخی ژن‌های مربوط به X_m و بقیه ژن‌های مربوط به X_p را بیان می‌نمایند. هیستون‌های موجود در کروموزوم‌های X غیرفعال دارای همان ویژگی‌های تغییرات پس ترجمه‌ای سایر نواحی هتروکروماتینی همچون هیپواستیلاسیون لیزین‌ها، دی وتری‌متیلاسیون لیزین ۹ هیستون H3 می‌باشد، تری‌متیلاسیون لیزین ۲۷ H3 و عدم متیلاسیون در لیزین ۴ هیستون H3 (شکل ۶-۳۳b). غیرفعال سازی کروموزوم X در یک مرحله‌ی اولیه از نمو جنینی بوسیله مرکز غیرفعال سازی X کنترل می‌گردد مرکز غیرفعال سازی X، ناحیه‌ی کمپلکسی روی کروموزوم X بوده و تعیین می‌کند کدامیک از دو کروموزوم X و در کدام سلول‌ها غیرفعال شود. این مرکز غیرفعال سازی X همچنین حاوی ژن Xist بوده و RNA جالبی را رمزدهی می‌نماید این RNA کروموزوم Xای که از آن رونویسی شده است را پوشانده و بدین ترتیب مقدمات خاموش شدن آن کروموزوم را فراهم می‌آورد.

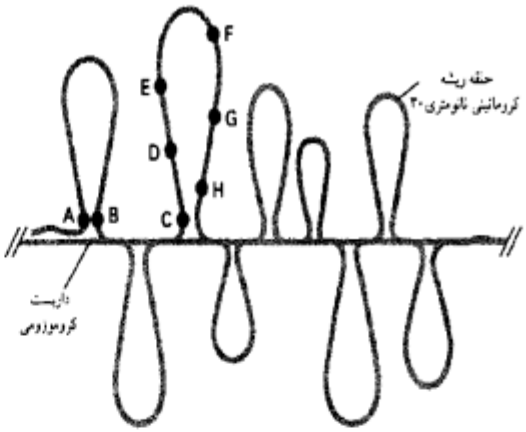
گرچه مکانیسم غیرفعال سازی کروموزوم X به طور کامل شناخته نشده است، اما شامل فرآیندهای متعددی از جمله عمل کمپلکس‌های **پروتئینی چندشانه‌ای**[1] می‌باشد که در فصل ۷ درباره‌ی آن بحث می‌شود. زیرواحدی از کمپلکس چندشانه‌ای حاوی یک کرومودومین بوده و به دُم‌های هیستون H3، هنگامی که در لیزین ۲۷ تری‌متیله می‌شوند، متصل می‌گردد. این کمپلکس چند شانه‌ای همچنین حاوی یک هیستون متیل ترانسفراز اختصاصی برای لیزین ۲۷ هیستون H3 می‌باشد. دانستن این مساله کمک زیادی به توجیه این امر می‌کند که چگونه فرآیند غیرفعال سازی X در طول نواحی بزرگی از کروموزوم X منتشر شده و چگونه در طی همانندسازی، مشابه با هتروکروماتینه شدن از طریق اتصال HP1 به دنباله‌های هیستون H3 متیله شده در لیزین ۹، حفظ می‌گردد (شکل ۶-۳۴b).

غیرفعال سازی کروموزوم X فرآیندی **اپی ژنتیک**[2] می‌باشد: اپی ژنتیک فرآیندی است که بیان ژن‌های خاصی را تحت تاثیر قرار داده و توسط سلول‌های دختری به ارث می‌رسد، اما در اثر تغییر توالی در DNA نمی‌باشد. فعالیت ژن‌ها روی کروموزوم X در پستانداران ماده به جای کنترل با توالی نوکلئوتیدی DNA مربوطه، بوسیله‌ی ساختار کروماتین کنترل می‌گردد. کروموزوم غیرفعال شده (چه X_m یا X_p) به صورت کروموزوم غیرفعال در نسل‌های حاصل از همه تقسیمات بعدی حفظ خواهد شد چون هیستون‌ها به نحوه خاصی تغییر یافته و این تغییر با صحت کامل طی هر تقسیم سلولی به ارث می‌رسد.

پروتئین‌های غیرهیستونی داربست ساختاری برای حلقه‌های بلند کروماتینی فراهم می‌آورند

هیستون‌ها فراوان‌ترین پروتئین‌ها در کروماتین هستند، اما

1- Polycomb 2-Epigenetic



▲ **شکل تجربی ۳۶-۶ (شکل رنگی) پروب‌ها با مارکر فلوئورسانت که به کروموزوم‌های اینترفازی هیبرید شده‌اند، لوپ‌های کروماتینی را نشان داده و امکان اندازه‌گیری‌شان را فراهم می‌آورند** هیبرید شدن در لوله آزمایش سلول‌های اینترفازی در مورد چندین پروب متفاوت و اختصاصی برای توالی‌های جداشده با فواصل مشخص در DNA کلون شده و خطی، به انجام رسیده است. دایره‌های با حروف قرمز نشان دهنده پروب‌ها هستند. اندازه‌گیری فواصل بین پروب‌های هیبرید شده مختلف که می‌توانند از طریق رنگشان از یکدیگر تشخیص داده شوند، نشان داد برخی توالی‌ها (به عنوان مثال A، B و C)، که توسط میلیون‌ها جفت باز از یکدیگر جدا شده‌اند، به نظر می‌رسد در درون هسته‌ها نزدیک یکدیگر جای گرفته‌اند. برای یک سری از توالی‌ها، فواصل اندازه‌گیری در هسته‌ها بین یک پروب (به عنوان مثال C) و توالی‌هایی که به ترتیب در دوردست‌تر قرار دارند، به نظر می‌رسد در ابتدا افزایش یافته (به عنوان مثال D، E و F) و سپس کاهش می‌یابند (به عنوان مثال G و H).

پروتئین‌ها غیرهیستونی همراه با کروماتین که فراوانی کمتری دارند و حتی خود مولکول DNA نیز برای ساختار کروموزوم ضروری می‌باشند. میکروگراف‌های الکترونی از کروموزوم‌های متافازی عاری از هیستون، در سلول‌های هلا، حلقه‌های بلندی از DNA را نشان می‌دهند که ظاهراً به یک داربست کروموزومی پروتئینی تشکیل شده از پروتئین‌های غیرهیستونی متصل می‌شود (شکل ۳۵-۶). گرچه این داربست کروموزومی ظاهر یک کروموزوم متافازی را دارد، ولی نتایج اخیر حاکی از این امر می‌باشد که تنها پروتئین نمی‌باشد که به یک کروموزوم متافازی، ساختار می‌بخشد.

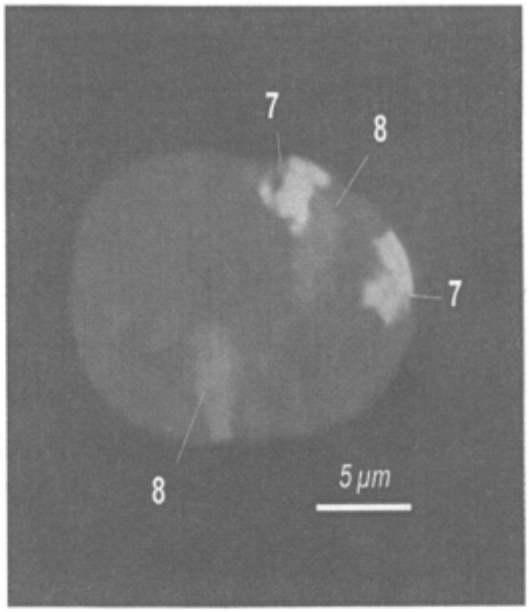
مطالعات میکرومکانیکی در مورد کروموزوم‌های بزرگ متافازی حاصل از سمندر کوچک در حضور پروتئازها یا نوکلئازها حاکی از این امر می‌باشد. هنگامی که این کروموزوم از انتهاهایش کشیده می‌شود DNA و نه پروتئین مسئول یکپارچگی مکانیکی کروموزوم متافازی می‌باشد. این نتایج با مساله وجود یک داربست پیوسته‌ی پروتئینی در محل محور کروموزوم، ناسازگار می‌باشند. به بیان دقیق‌تر، یکپارچگی ساختار کروموزومی نیازمند کمپلکس کاملی از DNA، اکتامرهای هیستونی و پروتئین‌های غیرهیستونی همراه با کروماتین می‌باشد. آزمایشات هیبرید سازی درجا بوسیله چندین پروب با نشانگر فلورسنت متفاوت برای DNAی مربوط به یک نوکلئوزوم در سلول‌های اینترفازی انسانی از مدلی حمایت می‌نمایند که در آن کروماتین به صورت حلقه‌های بزرگ منظم شده‌اند. در این آزمایشات، برخی توالی‌های پروب که به وسیله میلیون‌ها جفت باز به صورت DNA خطی جدا شده‌اند، در هسته‌های حاصل از سلول‌های مختلف از یک نوع، به نحو تکرارپذیر بسیار نزدیک به یکدیگر ظاهر شدند. (شکل ۳۶-۶). مسلم است این جایگاه‌های پروب که با فاصله‌ی نزدیک به هم قرار گرفته‌اند، نزدیک به نواحی از کروماتین، تحت عنوان نواحی مرتبط به *داربست*[1] (SARs) یا *نواحی اتصال به ماتریکس*[2] (MARs) قرار دارند، که این نواحی در پایه‌های حلقه‌های DNA مشاهده شده در کروموزوم‌های متافازی عاری از هیستون جای گرفته‌اند (شکل ۳۵-۶). SARs/MARs از طریق هضم کروموزوم‌های عاری از هیستون بوسیله‌ی آنزیم‌های محدود کننده و سپس بازیابی قطعات همراه با مخلوط عاری از هیستون تعیین نقشه شد. فواصل اندازه‌گیری شده مابین پروب‌ها با حلقه کروماتینی که به لحاظ اندازه در محدوده یک میلیون جفت باز تا چهار میلیون جفت باز در سلول‌های اینترفازی پستانداران است، سازگار می‌باشند.

به طور کلی، SARs/MARs بین واحدهای رونویسی یافت می‌شوند و ژن‌ها عمدتاً در درون حلقه‌های کروماتینی قرار گرفته‌اند. همانگونه که در زیر بحث شده است، حلقه‌ها در پایه خود از طریق مکانیسمی، بسته می‌شوند که مولکول دوگانه DNA را نمی‌شکند، این مکانیسم طول کروموزوم را افزایش می‌دهد. شواهد حاکی از این است که SARs/MARs احتمالاً رونویسی ژن‌های مجاور را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آزمایشات صورت گرفته روی موش‌های تراررخت بیانگر این مطلب می‌باشد که در برخی موارد SARs/MARs جهت بیان بالای ژن‌ها در نزدیکی SARs/MARs لازم هستند. در دروزوفیلا، برخی SARs/MARsها به عنوان **جداکننده**[3] عمل می‌نمایند، جداکننده‌ها توالی‌های DNA متشکل از ده‌ها تا

1- Scaffild-associated regions

2- Scaffild-associated regions

3- Insulator



▲ **شکل تجربی ۳۷-۶ (شکل رنگی) طی اینترفاز، کروموزوم‌های انسانی در محدوده‌های خاصی در هسته باقی می‌مانند.** فیبروبلاست‌های انسانی تثبیت شده اینترفازی درجا با پروب‌های دارای نشانگر فلورسنتی که برای توالی‌های موجود در کل طول کروموزوم ۷ (یشمی) و ۸ (بنفش)، هیبرید می‌شوند. DNA با استفاده از DAPI به رنگ آبی درآمد. در این سلول دیپلوئید، هر کدام از دو کروموزوم ۷ و ۸ را می‌توان دید که به جای پخش شدن بصورت قلمرو یا دمین در درون هسته محدود شده‌اند.

صدها جفت باز بوده و واحدهای رونویسی را از یکدیگر جدا می‌نمایند. پروتئین‌هایی که رونویسی یک ژن را تنظیم می‌نمایند نمی‌توانند رونویسی ژن مجاوری را که با یک جدا کننده از آن جدا شده‌اند را تحت تاثیر قرار دهند.

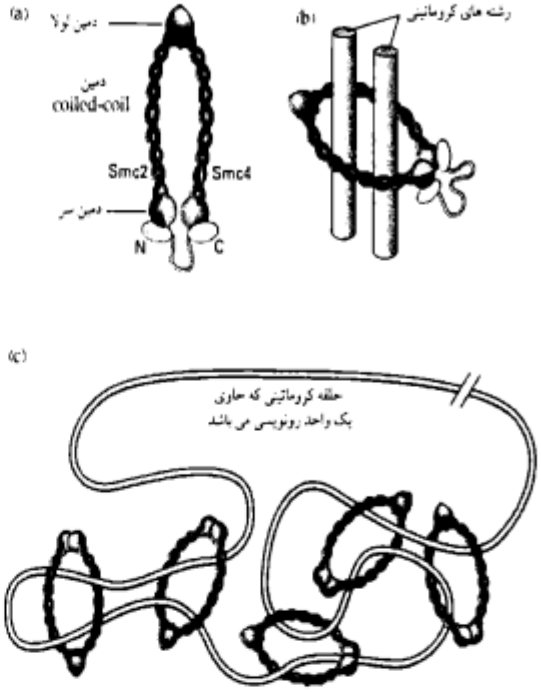
کروموزوم‌های منفرد اینترفازی، با تراکم کمتر نسبت به کروموزوم‌های متافازی را نمی‌توان بوسیله میکروسکوپ‌های معمول یا میکروسکوپ الکترونی بوضوح مشاهده نمود. با وجود این، کروماتین یک کروموزوم در سلول‌های اینترفازی در سرتاسر هسته پخش نشده‌اند. به بیان دقیق‌تر، کروماتین اینترفازی به صورت محدوده‌های کروموزومی سازمان یافته‌اند. همانطور که در شکل ۳۷-۶ نشان داده شده است، هیبرید سازی درجا هسته‌های اینترفازی با پروب‌هایی با مارکر فلورسنت اختصاصی برای کروموزوم نشان می‌دهد که این پروب‌ها در ناحیه محدودی از هسته‌ها قابل رویت می‌باشند تا در سرتاسر هسته دیده نمی‌شوند. استفاده از پروب‌های اختصاصی برای کروموزوم‌های مختلف نشان می‌دهد که هم پوشانی اندکی مابین کروموزوم‌ها در هسته‌های اینترفازی وجود دارد. هرچند، موقعیت دقیق کروموزوم‌ها بین سلول‌ها، تکرارپذیر نمی‌باشد.

ساختار شبه حلقه‌ای کمپلکس‌های پروتئینی SMC تعیین خصوصیات پروتئین‌های همراه با کروموزوم‌های اینترفازی منجر به شناسایی خانواده کوچکی از پروتئین‌ها، تحت عنوان **پروتئین‌های حفظ ساختار کروموزومی**[1] یا **پروتئین‌های SMC** گردید. این پروتئین‌های غیرهیستونی جهت حفظ ساختار مورفولوژیکی (ریخت‌شناختی) کروموزوم‌ها حیاتی می‌باشند. در مخمری با جهش‌هایی در برخی پروتئین‌های SMC خاصی،متراکم شدن کروموزومی طی مرحله پروفاز تقسیم میتوز رخ نداد. جهش یافته‌هایی با نقص در سایر پروتئین‌های SMC نتوانستند به دنبال همانندسازی DNA در فاز S، به درستی کروماتیدهای دختری را تشکیل دهند. در نتیجه کروموزوم‌ها طی تقسیم میتوز، به درستی به درون سلول‌های دختری منتقل نشدند. یک سری پروتئین‌های SMC خویشاوند با یکدیگر جهت جدا شدن صحیح کروموزوم‌ها در باکتری‌ها و آدکئاها ضروری بوده و حاکی از این امر است که این پروتئین‌ها یک دسته باستانی از پروتئین‌ها بوده و برای ساختار و جدا شدن کروموزومی در تمام سلسله‌های موجودات زنده، ضروری می‌باشد.

یک مونومر SMC حاوی ۲ دُمین کروی می‌باشد، یک دُمین سر و یک دُمین لولا، که توسط یک دُمین خطی بلند کویل‌کویل از یکدیگر جدا شده‌اند. دُمین سر از انتهای C و N پلی پپتید پدید آمده است که با هم در ساختار طبیعی پروتئین تاخورده‌اند. دُمین لولا در جایی تشکیل می‌گردد که پلی پپتید روی خودش تا می‌خورد. دُمین لولا مربوط به یک مونومر به دمین لولای یک مونومر دیگر متصل گشته و یک کمپلکس دیمر تقریباً U-شکل را تشکیل می‌دهند (شکل ۳۸a-۶). دُمین‌های سر مربوط به مونومرها دارای فعالیت ATPآزی بوده و از طریق اعضای خانواده کوچک پروتئینی دیگری تحت عنوان **کلایزین‌ها**[2] به یکدیگر متصل می‌گردند.

ساختار کروموزوم اینترفازی مطالعات نشان داده‌اند پروتئین‌های SMC می‌توانند دو مولکول DNA حلقوی را از طریق مکانیسمی که نیاز به اتصال مستقیم پروتئین - DNA ندارد، به یکدیگر متصل

1- Structoral mainlenanee of chromosome proteins
2- Kleisins



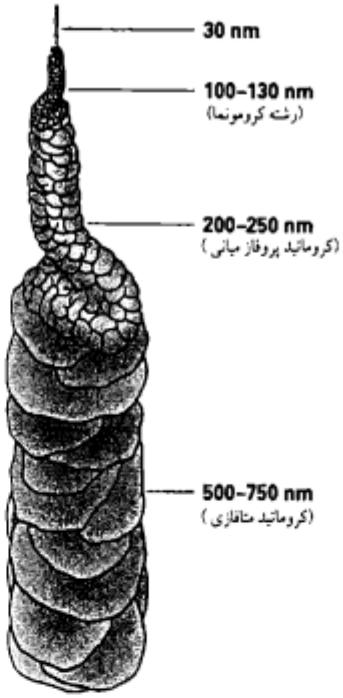
▲ **شکل ۳۸-۶ (شکل رنگی) مدل‌هایی از کمپلکس‌های SMC و تجمعشان با فیبرهای کروماتین ۳۰ نانومتری در سلول‌های اینترفازی.** (a) یک کمپلکس پروتئینی SMC از دو مونومر تشکیل شده است. SMC2 (آبی) و SMC4 (قرمز) که دُمین‌های لولایی شان به یکدیگر پیوسته است. دُمین‌های سر فعالیت ATPآزی داشته و توسط یک پروتئین کلایزین به یکدیگر متصل شده و ساختار شبه حلقه‌ای را تشکیل می‌دهند. (b) کمپلکس شبه حلقه‌ای SMC به لحاظ توپولوژیکی، دو فیبر کروماتینی (استوانه‌های تیره) را به یکدیگر متصل می‌نمایند. قطر این استوانه، در واقع قطر نوکلئوزوم بوده و در ابعادی متناسب با ابعاد کمپلکس SMC می‌باشد. (c) حلقه‌های مربوط به کروماتینی که به لحاظ رونویسی فعال می‌باشند، ممکن است در پایه خود توسط کمپلکس‌های SMC متعددی، بسته شده و یک گره توپولوژیکی را تشکیل دهند.

نمایند. به بیان دقیق‌تر، این دو مولکول DNA به لحاظ توپولوژیکی به یکدیگر متصل بوده و یا از طریق برش کمپلکس SMC با یک پروتئاز و یا برش یکی از مولکول‌های DNA توسط یک آنزیم محدود کننده، از یکدیگر قابل جداسازی هستند. این نتایج، همراه با ساختمان U-شکل یک کمپلکس SMC، این مساله را مطرح می‌نماید که کمپلکس SMC می‌تواند دو رشته کروماتینی ۳۰nm را با چرخاندن هر دوی آنها (به صورتی که در شکل ۳۸b-۶ نشان داده شده است) به یکدیگر اتصال دهد. محققان با استفاده از رسوب‌دهی کروماتین با ایمنوگلوبین‌ها که در فصل بعد مورد بحث قرار گرفته، نشان داده‌اند پروتئین‌های SMC در سلول‌های مخمر اینترفازی عمدتا در کروماتین در نواحی بین ژن‌ها هستند. احتمالاً کمپلکس‌های پروتئینی SMC شبه حلقه‌ای توسط RNA پلیمرازهای که در حال رونویسی نواحی کروماتینی بین آنها هستند، به درون این نواحی رانده شده‌اند.

بر طبق همه‌ی این شواهد متنوع، مدل اخیر چنین پیشنهادی می‌نماید که حلقه‌های طویل کروماتین که در کروموزم‌های اینترفازی شناسایی شده‌اند (شکل ۳۶-۶) در قاعده هر حلقه، توسط کمپلکس‌های SMC متعددی بسته می‌شوند (شکل ۳۸c-۶). این گره‌های توپولوژیکی از پروتئین‌های SMC و کروماتین در قاعده هر حلقه شاید به طریقی به یکدیگر متصل می‌شوند تا شکل داربست پروتئینی موجود در کروموزوم‌های قابل رویت عاری از هیستون متافازی را تولید کنند (شکل ۳۵-۶). این اتصال ممکن است به انواع بیشتری از پروتئین‌ها نیاز داشته باشد یا اینکه ممکن است از اتصال کمپلکس‌های SMC به تنهایی حاصل شده باشد. در هر یک از این دو مورد، مدل موجود در شکل ۳۸c-۶ می‌تواند توضیح دهد که چرا برش DNA در تعداد نسبتاً کمی از جایگاه‌ها به فروپاشی ساختمان کروموزومی می‌انجامد، در حالی که برش پروتئازی حتی زمانیکه اغلب پروتئین‌ها هضم شوند تنها اثر اندکی بر ساختار کروموزومی دارد: هنگامی که DNA در هر جایی از یک حلقه کروماتینی برش داده می‌شود، پایانه‌های شکسته شده می‌توانند از میان حلقه‌های پروتئین SMC سُرخورده و گره‌های توپولوژیکی را که حلقه کروماتین را محدود می‌نمودند از هم باز کند. در مقابل، بیشتر حلقه‌های منفرد پروتئین‌های SMC باید قبل از آزاد شدن از محدودیت‌های توپولوژیکی که پایه حلقه‌ها را کنار هم نگه می‌دارند، شکسته شوند.

ساختار کروموزوم متافازی. متراکم شدن کروموزوم طی پروفاز ممکن است شامل تشکیل حلقه‌های بسیار بیشتری از کروماتین باشد، به نحوی که طول هر حلقه در مقایسه با طول موجود در سلول‌های اینترفازی به شدت کاهش یابد. هرچند، تاخوردگی کروماتین در کروموزوم‌های اینترفازی به درستی شناخته شده نیست، ولی آنالیز میکروسکوپی از کروموزوم‌های پستانداران هنگامی که در پروفاز متراکم می‌شوند بیانگر این مطلب است که فیبر ۳۰nm به صورت یک فیبر ۱۰۰ تا ۱۳۰nm تحت عنوان *کروموتما*[1] تا می‌خورد. همانطور که در شکل ۳۹-۶ نشان داده شده است، یک

1- Chromonema



▲ **شکل ۳۹-۶ مدلی برای تاخوردگی فیبروکروماتینی ۳۰nm در یک کروموزوم متافازی.** این شکل رسم شده، تاخوردگی ترتیبی (پشت سرهم) یک رشته ۳۰nm را به صورت یک تک کروماتید مربوط به یک کروموزوم متافازی، به تصویر می‌کشد.

فیبرکروموتما سپس به صورت ساختاری با قطری ۲۵۰nm-۲۰۰ تحت عنوان یک کروماتید پرومتافاز میانی دچار تاخوردگی می‌شوند این کروماتید سپس به صورت کروماتیدهای ۷۵۰nm-۵۰۰ مشاهده شده طی متافاز تا می‌خورد.

پروتئین‌های غیرهیستونی دیگری، رونویسی و همانندسازی را تنظیم می‌نمایند

جرم کل هیستون‌های همراه با DNA در کروماتین تقریباً برابر با جرم DNA می‌باشد. کروماتین اینترفازی و کروموزوم‌های متافازی همچنین حاوی مقادیر کمی از یک سری کمپلکس تشکیل شده از پروتئین‌های دیگر هستند. به عنوان مثال، صدها تا هزاران فاکتور رونویسی متفاوت با کروماتین اینترفازی همراه هستند. ساختار و عملکرد این پروتئین‌های حیاتی غیرهیستونی، که به تنظیم رونویسی کمک می‌کنند، در فصل ۷ مورد بررسی دقیق قرار گرفته است. سایر پروتئین‌های غیرهیستونی که فراوانی کمی دارند با کروماتین تجمع‌یافته و همانندسازی DNA را طی چرخه‌ی سلولی یوکاریوتی تنظیم می‌نمایند (فصل ۲۰).

تعداد کمی از پروتئین‌های غیرهیستونی دیگر متصل شونده به DNA در مقادیر بسیار بیشتری نسبت به فاکتورهای رونویسی یا همانندسازی وجود دارند. برخی از این پروتئین‌ها، تحرک بالایی را طی جداشدن الکتروفورزی از خود نشان می‌دهند و بنابراین تحت عنوان پروتئین‌های **گروه با تحرک بالا**[1] (HMG) نام گذاری شده‌اند. هنگامی که ژن‌های رمزدهی‌کننده فراوان‌ترین پروتئین‌های HMG از سلول‌های مخمری حذف گردند، رونویسی طبیعی در اکثر ژن‌های بررسی شده، دچار مشکل می‌شود. برخی پروتئین‌های HMG یافت شده‌اند که از طریق همکاری با فاکتورهای رونویسی به DNA می‌چسبند. این فاکتورهای رونویسی به توالی‌های خاصی از DNA متصل و سبب پایدار سازی کمپلکس‌های چند پروتئینی می‌شوند که رونویسی ژن مجاور را تنظیم می‌نمایند.

نکات کلیدی بخش ۶-۶

سازمان یابی ساختاری کروموزوم‌های یوکاریوتی

- در سلول‌های یوکاریوتی DNA در کمپلکس بسیار متراکمی به نام کروماتین با پروتئین‌های هیستون همراه است. واحدهای ساختاری کروماتین نوکلئوزوم بوده و حاوی اکتامرهیستونی می‌باشد که اطراف آن ۱۴۷ جفت باز DNA پیچیده شده است (شکل ۲۹-۶ را ملاحظه کنید)
- عقیده بر این است که کروماتین در نواحی غیرفعال از لحاظ رونویسی در DNA در درون سلول‌ها به صورت متراکم بوده و رشته‌های ۳۰نانومتری و ساختارهای بانظم بالاتر را تشکیل می‌دهد (شکل‌های b ۳۰-۶ و ۳۹-۶ را ملاحظه کنید).
- عقیده بر این است که کروماتین در نواحی فعال از لحاظ رونویسی در DNA درون سلول‌ها به صورت فرم باز و پهن وجود دارد (شکل a ۲۸-۶ را ملاحظه کنید).
- دم‌های هیستون H_4 مخصوصاً لیزین ۱۶ در H_4 برای کروماتین در فرم دانه‌های تسبیح روی نخ (رشته کروماتین ۱۰ نانومتری) جهت تاخوردن به رشته ۳۰ نانومتری لازم است.
- دم‌های هیستونی بوسیله استیلاسیون، متیلاسیون، فسفریلاسیون و مونویبی کوئیتینه شدن می‌توانند تغییر یابند (شکل ۳۱-۶ را ملاحظه کنید). این تغییرات با تنظیم اتصال دم‌های هیستون به پروتئین‌های همراه با کروماتین ساختار کروماتین را تحت تأثیر قرار می‌دهند.
- استیلاسیون و داستیلاسیون برگشت‌پذیر ریشه‌های لیزین در انتهای Nهیستون‌های مرکزی، تراکم کروماتین را تنظیم

1- High-mobility group

می‌کند. کروماتین با دم‌های هیستونی هیپراستیله (یوکروماتین) آسانتر از کروماتین با دم‌های هیستونی هیپواستیله (هتروکروماتین) در دسترس پروتئین‌های درگیر در رونویسی همانندسازی و تعمیر و همچنین آنزیم‌هایی مثل DNaseI قرار می‌گیرد.

■ هنگامی که کروموزوم‌های متافازی طی اینترفاز تراکم خود را از دست دادند، نواحی از هتروکروماتین بسیار بیشتر از نواحی یوکروماتین بصورت متراکم باقی می‌ماند.

■ پروتئین هتروکروماتین (HP_1) با استفاده از کرومودُمین به هیستون‌تری متیله شده بر روی لیزین ۹ متصل می‌شود. دُمین کروموشادو HP_1 niamod wodahsomorhc- نیز با خودش وبا هیستون متیل ترانسفراز متیله کننده لیزین ۹ در H_3 مجتمع می‌شود. این میانکنش‌ها باعث متراکم شدن رشته کروماتین ۳۰ نانومتری و پهن شدن ساختار هتروکروماتین در طول کروموزوم تا رسیدن به عنصر مرزی می‌شود (شکل ۳۴-۶ را ملاحظه کنید).

■ یک کروموزوم X تقریباً در همه سلول‌های پستانداران ماده بصورت هتروکروماتین بسیار متراکم بوده و این امر باعث مهار بیان تقریباً همه ژن‌ها در روی کروموزوم غیرفعال می‌شود. این غیرفعال شدن به میزانی است که ژن‌های کروموزوم X به میزان یکسان در نرها و ماده‌ها بیان می‌شوند.

■ هر کروموزوم یوکاریوتی حاوی یک مولکول DNA فشرده شده بصورت نوکلئوزوم و تاخورده بصورت رشته کروماتین ۳۰ نانومتری می‌باشد که با داربست پروتئینی تشکیل شده از پروتئین‌های نگهداری کننده ساختار کروموزومی (SMC) در جایگاه‌های بین واحدهای رونویسی، تجمع می‌یابد، (شکل c ۳۸-۶ را ملاحظه کنید). تا خوردن دیگری در داربست باعث فشرده شده ساختار به صورت فرم خیلی متراکم کروموزوم‌های متافازی می‌شود (شکل ۳۹-۶ را ملاحظه کنید)

۶-۷ ریخت‌شناسی و عناصر عملکردی کروموزوم‌های یوکاریوتی

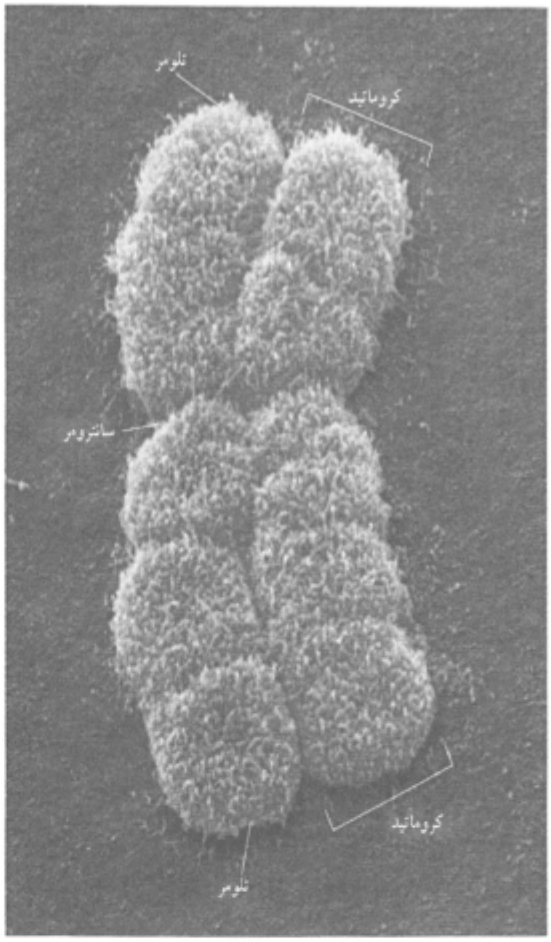
با بررسی سازمان دهی دقیق ساختاری کروموزوم‌ها در قسمت قبلی، اکنون آن‌ها را از دید کلی‌تر بررسی می‌کنیم. مشاهدات اولیه میکروسکوپی روی تعداد و اندازه کروموزوم‌ها و الگوهای رنگ‌آمیزی‌شان منجر به کشف بیشتری از خصوصیات عمومی مهم در ساختار کروموزومی شد. سپس محققان نواحی کروموزومی خاصی را که برای همانندسازی و جداشدن کروموزوم‌ها به سلول‌های دختری طی تقسیم سلولی ضروری بودند را مورد شناسایی قرار دادند. در این قسمت این اجزا عملکردی کروموزوم‌ها را مورد بحث قرار می‌دهیم و اینکه چگونه کروموزوم‌ها از طریق نوآرایی‌های نادر کروموزوم‌های اجدادی تکامل یافته‌اند را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

تعداد، اندازه و شکل کروموزومی در متافاز مختص گونه می‌باشند

همانطوریکه پیش از این اشاره شد، در سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند کروموزوم‌ها حتی با کمک رنگ‌های هیستولوژیک برای DNA (به عنوان مثال فولگن[1] یا گیمسا[2]) یا میکروسکوپ الکترونی، قابل رویت نمی‌باشند. در میتوز و میوز کروموزوم‌ها متراکم شده و در زیر میکروسکوپ نوری قابل رویت می‌گردند. بنابراین، تقریباً همه تحقیقات سیتوژنتیک (یعنی مطالعات ریخت‌شناسی کروموزومی) با کروموزوم‌های متراکم متافازی حاصل از سلول‌های در حال تقسیم (چه سلول‌های سوماتیک (غیرجنسی) در تقسیم میتوز یا گامت‌های در حال تقسیم طی تقسیم میوز) انجام گرفته است.

متراکم شدن کروموزوم‌های متافازی احتمالا ناشی از درجات متعددی از تاخوردگی از سوی رشته کروماتینی ۳۰nm می‌باشد (شکل ۳۹-۶). در هنگام میتوز، سلول‌ها در فاز S مربوط به چرخه سلولی پیش روی کرده و DNA خود را همانندسازی می‌کنند. به این ترتیب، کروموزوم‌هایی که در طی میتوز قابل رویت می‌شوند، ساختارهای مضاعف شده (دونسخه‌ای) هستند. هر کروموزوم متافازی شامل دو کروماتید خواهری می‌باشد که در یک ناحیه محدود بنام سانترومر متصل می‌شوند (شکل ۴۰-۶). تعداد، اندازه و شکل کروموزوم‌های متافازی **کاریوتیپ**[3] را می‌سازد که برای هرگونه، خصوصیتی ویژه و متمایز می‌باشد. در اغلب موجودات زنده، همه سلول‌ها یک کاریوتیپ یکسان دارند. با این حال، گونه‌هایی که کاملا مشابه به نظر می‌رسند، کاریوتیپ‌های بسیار متفاوتی داشته و نشان دهنده این است که پتانسیل ژنتیکی مشابه می‌تواند روی کروموزوم‌ها به طرق مختلف، سازمان‌دهی شود. به عنوان مثال، دو گونه از آهوهای کوچک (مونتژاک هندی و مونتژاک Reeves) حاوی حدودا مقدار یکسانی از DNA ژنومی هستند. در یک گونه، این DNA به صورت ۲۲ جفت **اتوزوم**[4] همولوگ و دو کروموزوم جنسی که به لحاظ فیزیکی از

1- Feulgen
2- Giemsa
3- Karyotype
4- Autosome



▲ **شکل ۴۰-۶ یک کروموزوم معمول متافازی.** همانگونه که در این میکروگراف الکترونی نگاره مشاهده می‌گردد، هر کروموزوم همانندسازی شده و از دو کروماتید تشکیل می‌گردد که هر یک حاوی یک یا دو مولکول یکسان DNA می‌باشد. سانترومر، جایی است که کروماتیدها در یک فضای کوچک به هم متصل بوده و برای جداشدن بعدی در میتوز ضروری می‌باشد. عملکرد توالی‌های خاص تلومری در انتهاها، مانع از کوتاه شدن کروموزومی می‌شود.

یکدیگر جدا هستند، سازمان یافته است. در مقابل، گونه دیگر حاوی کمترین تعداد کروموزوم‌ها در تمام پستانداران می‌باشد، تنها سه جفت اتوزوم و یک کروموزوم جنسی که به لحاظ فیزیکی جدا می‌باشد؛ اما کروموزوم جنسی دیگر به انتهای یک کروموزوم اتوزوم چسبیده است.

طی متافاز، کروموزوم‌ها می‌توانند از طریق الگوهای نواربندی و رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها، از یکدیگر مشخص شوند. رنگ‌های معینی به نحو اختصاصی برخی نواحی کروموزوم‌های متافازی را به نحو شدیدتری نسبت به نواحی دیگر مورد رنگ‌آمیزی قرار می‌دهد به نحوی که موجب تولید الگوهای نواربندی مشخصی برای تک تک کروموزوم‌ها می‌شوند که این الگو برای هر کروموزوم اختصاصی و خاص می‌باشد. منظم بودن نوارهای کروموزومی به عنوان مارکرهای قابل رویت مفیدی در طول هر کروموزوم عمل می‌نماید و می‌تواند در تمایز قایل شدن بین کروموزوم‌های هم اندازه و هم شکل کمک کند. ***نوارهای G***[1] هنگامی تولید می‌گردند که کروموزوم‌های متافازی به مدت کوتاهی در معرض گرمای ملایم یا پروتئولیز قرار گیرند و سپس با گیمسا، (یک رنگ DNA) رنگ آمیزی می‌شوند (شکل ۴۱-۶). نوارهای G با نواحی بزرگی از ژنوم انسانی که به طور غیرطبیعی محتوای پایینی از G+C دارند، مطابقت می‌نماید. تیمار کروموزوم‌ها با یک محلول قلیایی داغ قبل از رنگ‌آمیزی با گیمسا، نوارهای R را در الگویی تولید می‌نماید که تقریباً برعکس الگوی نوارهای G می‌باشد. الگوی نواربندی متمایز و متفاوت هر کروموزوم، برای سلول شناسان این امکان را فراهم می‌آورد که بخش‌های اختصاصی از یک کروموزوم را شناسایی نموده و جایگاههای شکست و تغییر ساختاری کروموزومی را تعیین مکان نمایند. (شکل ۴۲a-۶). علاوه بر این پروب‌های DNA کلون شده که به توالی‌های خاصی در کروموزوم‌ها هیبرید شده‌اند را می‌توان در نوارهای خاصی، تعیین مکان نمود. روش کاریوتیپ نمودن طیفی یا رنگ‌آمیزی کروموزومی تا حد بسیار زیادی تمایز قایل شدن بین کروموزوم‌های با اندازه و شکل یکسان را ساده نموده است. این تکنیک، که نوعی هیبریدیزاسیون فلورسانت درجا[2] (FISH) می‌باشد، از پروب‌هایی اختصاصی برای جایگاههای پراکنده شده در طول هر کروموزوم استفاده می‌نماید. این پروب‌ها با چندین رنگ فلورسنت متفاوت با طول موج‌های برانگیختگی و انتشار متفاوت، نشانه‌گذاری می‌گردند. پروب‌هایی که برای هر کروموزوم اختصاصی هستند با مقدار مشخصی از هر یک از رنگ‌ها، نشانه‌گذاری می‌گردند. پس از اینکه پروب‌ها با کروموزوم‌ها هیبرید شدند و پروب‌های اضافی خارج گردیدند، نمونه با یک میکروسکوپ فلوئورسنت مشاهده می‌گردد. در این میکروسکوپ یک شناساگر، مقدار هر رنگ موجود در هر ناحیه فلوئورسنت در میدان میکروسکوپی را تعیین می‌نماید. این داده‌ها را به یک کامپیوتر هدایت می‌کنند و یک برنامه خاص تصویر رنگ متضاد از هر یک از انواع کروموزومی می‌گیرد. روش مرتبط دیگری در این زمینه تحت عنوان FISH چندرنگی می‌تواند جابجایی مکانی کروموزومی را شناسایی نماید (شکل ۴۲b-۶). آنالیزهای مفصل که با این

1- G bands

2- Fluorescence in situ hgbridization

▲ **شکل تجربی ۴۱-۶ نوارهای G که با رنگ‌های گیمسا تولید شده‌اند، مارکرهای سودمندی در شناسایی کروموزوم‌های خاص می‌باشند.** همانطور که در اینجا نشان داده شده است، کروموزوم‌های حاصل از یک فرد مذکر انسانی در معرض یک تیمار پروتئولیزی کوتاه قرار گرفته و سپس با گیمسا رنگ‌آمیزی شده‌اند. باندهای سیاه حاصل در مکان‌های خاصی برای هر کروموزوم اختصاصی است.

تکنیک‌ها امکانشان فراهم می‌آید، امکان شناسایی جابجایی مکانی کروموزومی را می‌دهند که با آنالیزهای نواربندی آشکار نمی‌گردد. تصویر موجود در ابتدای فصل، استفاده از FISH چند رنگی را در تهیه کاریوتیپ یک فرد مونث انسانی، به تصویر می‌کشد.

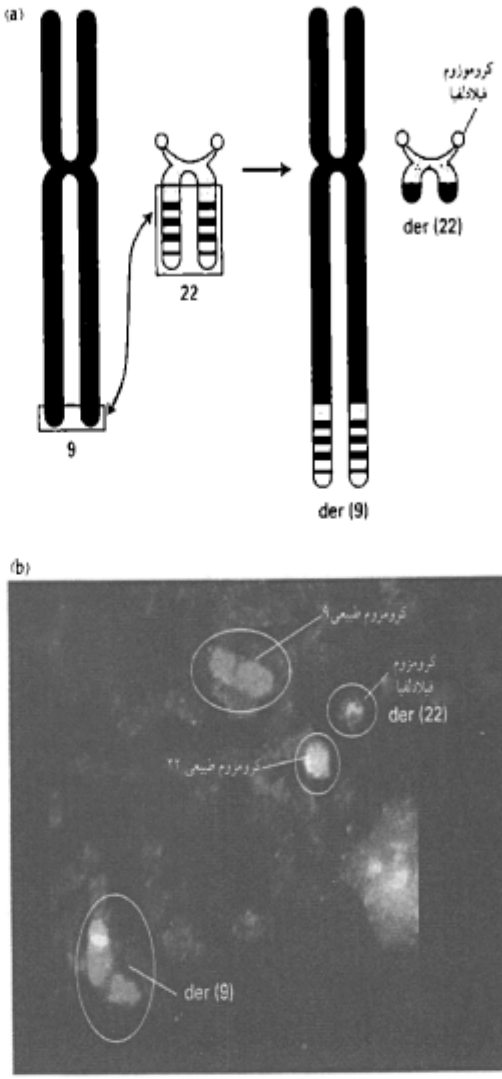
رنگ‌آمیزی کروموزومی و تعیین توالی DNA، تکامل کروموزوم‌ها را به وضوح نشان می‌دهند. آنالیز کروموزوم‌های مربوط به گونه‌های مختلف، بینش قابل توجهی را درباره اینکه کروموزوم‌ها چگونه تکامل یافته‌اند، فراهم آورده است. به عنوان مثال، هیبریدیزاسیون پروب‌های رنگی کروموزومی برای کروموزوم ۱۶ از موش درختی (*Tupia belangeri*) با کروموزوم‌های متافازی این موش، دو کپی از کروموزوم ۱۶ را همانگونه که انتظار می‌رود، به وضوح نشان می‌دهد (شکل ۴۳a-۶).

هرچند، هنگامی که همان پروب‌های رنگی کروموزومی با کروموزوم‌های متافازی انسانی هیبرید شدند، اغلب پروب‌ها به بازوی بلند کروموزوم ۱۰ متصل گردیدند. (شکل ۴۳b-۶). در ادامه، هنگامی که پروب‌های چندگانه از بازوی بلند کروموزوم ۱۰ انسانی با نشانگر رنگی فلورسنت مختلف، به کروموزوم ۱۰ انسانی و کروموزوم‌های متافازی موش درختی هیبرید شدند، توالی‌های موش درختی همولوگ با هر یک از این پروب‌ها در طول کروموزوم ۱۶ موش به همان ترتیبی که روی کروموزوم ۱۰ انسانی رخ داده‌اند، دیده شدند. این نتایج حاکی از این امر می‌باشد که طی تکامل انسان‌ها و موش‌های درختی از یک جد مشترک که در ۸۵ میلیون سال پیش می‌زیسته است، یک توالی پیوسته و بلند DNA روی یکی از کروموزوم‌های اجدادی تبدیل به کروموزوم ۱۶ در موش درختی گشته است، اما این توالی در انسان به صورت بازوی بلند کروموزوم ۱۰ درآمده است. این پدیده که ژن‌ها با یک ترتیب یکسان روی یک کروموزوم در دو گونه‌ی متفاوت وجود داشته باشند را سینتنی[1] می‌نامند (برگرفته از کلمه‌ی لاتین به معنای "روی یک نوار"). حضور دو یا چند ژن روی یک ناحیه کروموزومی مشترک در دو یا چند گونه، بیانگر وجود یک قطعه حفاظت شده سینتیک می‌باشد.

روابط موجود بین کروموزوم‌های بسیاری از نخستینیان از طریق هیبریدیزاسیون‌های بین گونه‌ای پروب‌های رنگی کروموزومی همانگونه که در مورد انسان و موش درختی در شکل ۴۳a,b-۶ نشان داده شد، تعیین گردیده‌اند. از این روابط و آنالیز با تفکیک بالاتر نواحی سینتنی از طریق تعیین توالی DNA و سایر روش‌ها، امکان این امر فراهم آمده است که پیشنهاد شود کاریوتیپ جد مشترک همه‌ی نخستینیان براساس تعداد حداقل بازآرایی‌های کروموزومی لازم جهت ایجاد نواحی از سینتنی در کروموزوم‌های نخستینیان امروزی بوده است.

تصور بر این است که کروموزوم‌های انسانی از یک جد نخستین مشترک با ۲۳ اتوزوم به علاوه‌ی کروموزوم‌های جنسی X و Y از طریق چند مکانیسم مختلف مشتق شده باشند (شکل ۴۳c-۶). برخی کروموزوم‌های انسانی بدون نوآرایی‌های بزرگ در ساختار کروموزومی، حاصل شده‌اند. تصور بر این است که سایر کروموزوم‌ها از طریق شکست یک کروموزوم اجدادی به دو کروموزوم یا برعکس، از طریق ادغام دو کروموزوم اجدادی، تکامل یافته باشند. هنوز به نظر می‌رسد که سایر کروموزوم‌های انسانی، از طریق مبادله‌های قسمت‌هایی از بازوهای کروموزوم‌های متفاوت، یعنی از طریق جابجایی دو طرفه بین دو کروموزوم اجدادی، ایجاد شده‌اند. آنالیز نواحی دارای سینتنی حفاظت شده بین کروموزوم‌های بسیاری از پستانداران حاکی از این امر می‌باشد که نوآرایی‌های کروموزومی مانند

1- Synteny



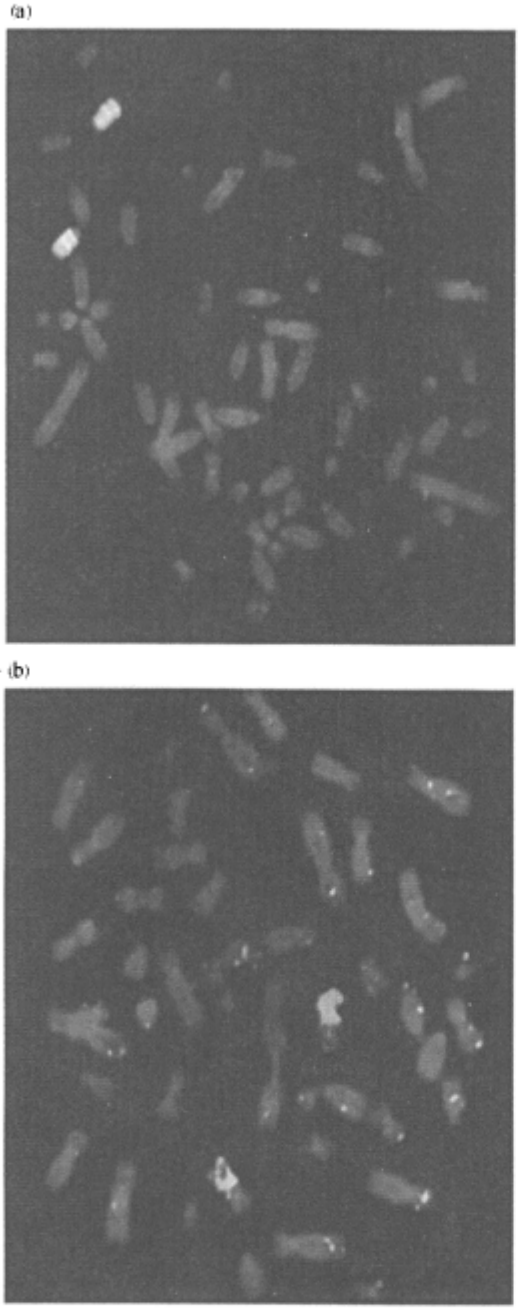
▲ **شکل تجربی ۴۲-۶ جابجایی مکانی کروموزومی را می‌توان با استفاده از الگوهای رنگ‌آمیزی و FISH چند رنگی مورد آنالیز قرار داد.** تغییرات فضایی خاص با بیماری‌های ژنتیکی خاص و انواع خاصی از سرطان‌ها همراه هستند. به عنوان مثال، تقریباً در همه بیماران مبتلا به لوسمی میلوژنوس حاد، سلول‌های لوسمی حاوی کروموزوم فیلادلفیا، یک کروموزوم کوتاه شده ۲۲ [der(22)] و یک کروموزوم ۹ به طور غیرعادی بلند [der(9)] (der مخفف "مشتق شده" است می‌باشند. این نتایج در اثر جابجایی مکانی بین کروموزوم‌های طبیعی ۹ و ۲۲ می‌باشند. این جابجایی مکانی را می‌توان با استفاده از آنالیز کلاسیک نواربندی (a) و از طریق FISH چندرنگی (b) مورد شناسایی قرار داد.

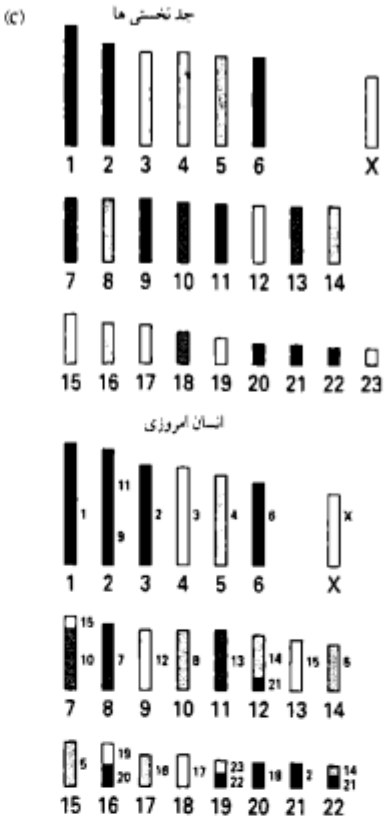
شکست، ادغام و جابجایی‌های مکانی، به ندرت حدود یکبار در هر ۵ میلیون سال، در تکامل پستانداران رخ داده است. هنگامی که چنین نوآرایی‌های کروموزومی بواقع رخ دادند، این نوآرایی‌ها، به احتمال زیاد در تکامل گونه‌های جدیدی که نمی‌توانسته‌اند با گونه‌هایی که از آنها تکامل یافته‌اند، آمیزش داشته باشند، سهیم بودند. نوآرایی‌های کروموزومی مشابه با آنهایی که برای دودمان نخستینیان در نظر گرفته شده‌اند، برای سایر گروههای موجودات زنده خویشاوند از جمله، دودمان بی‌مهرگان، گیاهان و قارچ‌ها، نیز در نظر گرفته شده‌اند. همخوانی عالی بین پیش‌بینی‌ها در مورد روابط تکاملی مبتنی بر آنالیز نواحی سینتنیک مربوط به کروموزوم‌های حاصل از موجودات زنده با ساختمان آناتومیکی (یعنی، در میان پستانداران، در میان حشرات با سازمان‌یابی مشابه بدن، در میان گیاهان شبیه به هم و غیره)، و روابط تکاملی مبتنی بر شواهد فسیلی و براساس میزان واگرایی توالی‌های DNA برای ژن‌های همولوگ شاهدی توانمند برای تایید اعتبار تکامل به عنوان فرآیندی است که تنوع موجودات زنده کنونی را رقم زده است.

کروموزوم‌های اینترفازی پلی تن از طریق تکثیر DNA حاصل می‌شوند.

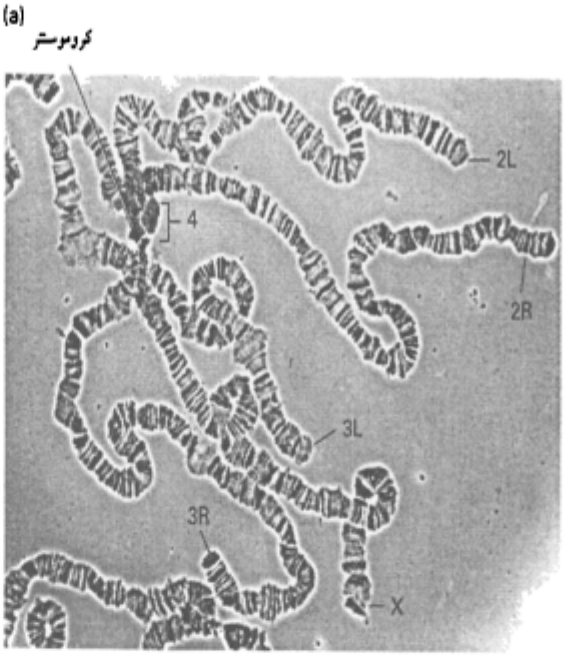
غدد بزاقی لارو گونه دروزوفیلا و سایر حشرات بالدار حاوی کروموزوم‌های اینترفازی بزرگی هستند که در زیر میکروسکوپ نوری قابل رویت می‌باشند. هنگامی که این **کروموزوم‌های پلی‌تن**، تثبیت و رنگ‌آمیزی می‌شوند، از طریق تعداد زیادی از نوارهای تکرارپذیر و به خوبی مجزا از یکدیگر که شماره‌های استانداردی را دریافت نموده‌اند، مورد شناسایی واقع می‌شوند (شکل ۴۴a-۶). الگوی به شدت تکرارپذیر نواربندی مشاهده شده در کروموزوم‌های غدد بزاقی دروزوفیلا، روشی بسیار توانمند جهت تعیین موقعیت مکانی توالی‌های خاص DNA در طول کروموزوم‌های موجود در این گونه، فراهم می‌آورد. به عنوان مثال، محل کروموزومی یک توالی کلون شده‌ی DNA را می‌توان به درستی از طریق هیبرید نمودن یک نمونه نشاندار از DNA کلون شده با کروموزوم‌های پلی‌تن تهیه شده از غدد بزاقی لاروی، تعیین نمود. (شکل ۴۴b-۶). جابجایی‌ها و وارونگی‌های کروموزومی نیز در کروموزوم‌های پلی تن به راحتی قابل تشخیص بوده و موقعیت‌های خاص کروموزومی را می‌توان از طریق رنگ‌آمیزی با آنتی بادی‌های اختصاصی که بر علیه‌شان ساخته می‌شود، تعیین مکان نمود (شکل ۱۱-۷). کروموزوم‌های پلی تن حشرات یکی از سیستم‌های صرفا آزمایشگاهی را در کل طبیعت عرضه می‌کند که در آن، چنین مطالعات تعیین مکان با ایمونوگلوبین‌ها روی کروموزوم‌های اینترفازی غیرمتراکم، امکان‌پذیر می‌باشد.

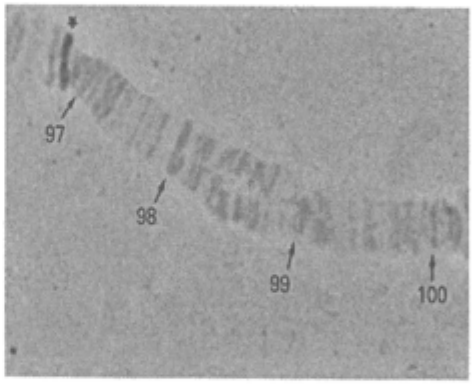
تکثیر فراگیر DNA سبب ایجاد کروموزوم‌های پلی تن موجود در





▲ **شکل تجربی ۴۳-۶ (شکل رنگی) تکامل کروموزوم‌های نخستینیان.** (a) پروب‌های رنگی کروموزومی برای کروموزوم ۱۶ مربوط به موش درختی (*T.belangeri*، یک حیوان شبه نخستینیان که با فاصله دوری با انسان خویشاوند می‌باشد) با کروموزوم‌های متافازی این موش (قرمز) هیبرید شدند (زرد). این پروب‌ها هر دو کپی از کروموزوم ۱۶ را رنگ‌آمیزی نمودند. (b) همان پروب‌های رنگی کروموزوم ۱۶ موش درختی با کروموزوم‌های متافازی انسانی هیبرید شدند. این پروب‌ها عمدتا در بازوهای بزرگ دو کروموزوم ۱۰ جای گرفتند. (c) تکامل پیشنهاد شده برای کروموزوم‌های انسانی (پایین) مشتق از کروموزوم‌های جد مشترک همه نخستینیان (بالا). کروموزوم‌های پیشنهاد شده جد نخستین مشترک برطبق اندازه‌شان شماره گذاری شده‌اند، به نحوی که هر کروموزوم با یک رنگ متفاوت نشان داده شده است. کروموزوم‌های انسانی نیز برطبق اندازه نسبی‌شان همراه با رنگ‌هایی‌برگرفته از رنگ‌های کروموزوم‌های جد نخستین مشترک که از آن مشتق شده‌اند، شماره گذاری شده‌اند. شماره‌های کوچک در سمت راست نواحی رنگی کروموزوم‌های انسانی بیانگر شماره کروموزوم اجدادی می‌باشد که آن ناحیه از آن مشتق شده است. کروموزوم‌های انسانی از کروموزوم‌های جد نخستین مشترک به چندین طریق بدون نوآرایی‌های قابل توجه (به عنوان مثال کروموزوم ۱ انسانی)، از طریق ادغام (به عنوان مثال، کروموزوم ۲ انسانی از طریق ادغام کروموزوم‌های ۹ و ۱۱ اجدادی)، شکست (به عنوان مثال کروموزوم‌های ۱۴ و ۱۵ از طریق شکست کروموزوم ۵ اجدادی) و جابجایی‌های کروموزومی (به عنوان مثال کروموزوم‌های ۱۲ و ۲۲ انسانی از طریق یک جابجایی دوطرفه بین کروموزوم‌های ۱۴ و ۲۱ اجدادی) اشتقاق یافته‌اند.





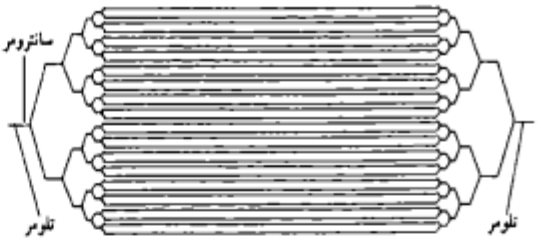
شکل تجربی ۴۴-۶ نواربندی روی کروموزوم‌های پلی‌تن غده بزاقی دروزوفیلا و هیبریدیزاسیون درجا، هر دو با هم جهت تعیین محل توالی‌های ژنی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. (a) در این میکروگراف نوری از کروموزوم‌های غده بزاقی لاروی دروزوفیلا ملانوگاستر، ۴ کروموزوم (X، ۲، ۳ و ۴)، به همراه ۵۰۰۰ نوار مجزا قابل مشاهده هستند. این الگوی نواربندی از بسته بندی مکرر DNA و پروتئین در درون هر جایگاه تکثیر یافته در طول کروموزوم حاصل می‌شود. باندهای تیره نواحی با کروماتین فشرده‌تر هستند. همه سانترومرهای این ۴ کروموزوم اغلب به صورت ادغام شده در کروموسنتز ظاهر می‌گردند. نوک کروموزوم‌های ۲ و ۳ نشاندار می‌باشند (L=بازوی چپ، R=بازوی راست)، همین وضعیت برای نوک کروموزوم X وجود دارد. (b) یک توالی خاص DNA می‌تواند از طریق هیبریدیزاسیون درجای کروموزوم‌های غده‌ی بزاقی دروزوفیلا، تعیین نقشه شود. این میکروگراف قسمتی از یک کروموزوم را نشان می‌دهد که با یک توالی DNA کلون شده نشاندار با نوکلئوتیدهای مشتق از بیوتین، هیبرید شده است. هیبریدیزاسیون با استفاده از آویدین (پروتئین متصل شونده به بیوتین که به صورت کووالان به آنزیم آلکالین فسفاتاز متصل می‌گردد) مورد شناسایی قرار می‌گیرد. با افزودن یک سوبسترای محلول، این آنزیم واکنشی را کاتالیز می‌نماید که به تشکیل یک جز رنگی نامحلول منجر شده و در جایگاه هیبریدیزاسیون (آستریسک، Asterisk) رسوب می‌کند. از آنجا که این الگوهای نواربندی بسیار تکراری، ویژگی بارز هر کروموزوم پلی‌تن دروزوفیلا می‌باشند، توالی هیبرید شده می‌تواند روی یک کروموزوم خاص قرار گیرد. شماره‌ها نشان دهنده‌ی نوارهای اصلی هستند. باندهای بین‌شان با شماره‌ها و حروف نام‌گذاری شده‌اند. (در اینجا نشان داده نشده‌اند).

غدد بزاقی در دروزوفیلا می‌گردد. این فرآیند که **پلی تنیزاسیون**[1] نام دارد، هنگامی رخ می‌دهد که DNA در هر جایی به غیر از تلومرها و سانترومر، به طور مکرر همانندسازی می‌کند، اما کروموزوم‌های دختر از یکدیگر جدا نمی‌شوند. در نتیجه یک کروموزوم بزرگ تشکیل شده از کپی‌های زیادی ایجاد می‌شود (شکل ۴۵-۶). تکثیر DNA کروموزومی به مقدار زیادی تعداد کپی‌های ژنی را افزایش می‌دهد که احتمالا به دلیل فراهم آوردن mRNA کافی برای سنتز پروتئین در سلول‌های عظیم جثه‌ی غدهٔ بزاقی می‌باشد. اگرچه نوارهای مشاهده شده در کروموزوم‌های متافازی با نوارهای G انسانی، احتمالاً نشان دهنده قطعات بسیار طولانی تاخورده یا فشرده شده از DNA حاوی حدود 10^7 جفت باز می‌باشد. این نوارها در کروموزوم‌های پلی‌تن دروزوفیلا نشان دهنده قطعات بسیار کوتاهتری در حدود ۵۰/۰۰۰-۱۰۰/۰۰۰ جفت باز هستند.

سه جزء عملکردی برای همانندسازی و وراثت پایدار کروموزوم‌ها ضروری می‌باشند

با اینکه کروموزوم‌ها به لحاظ طول و تعداد در بین گونه‌ها متفاوت هستند، مطالعات سیتوژنتیکی نشان داده همگی آن‌ها در زمان تقسیم سلولی، رفتار یکسانی دارند. علاوه بر این، هر کروموزوم یوکاریوتی می‌بایست سه جزء عملکردی جهت همانندسازی و جدا

1- Polytenization



▲ **شکل ۴۵-۶ الگوی تکثیر فراگیر DNA مربوط به یک کروموزوم پلی تن طی پنج بار همانندسازی.** DNA دورشته‌ای به صورت یک خط نشان داده شده است. طی پلی تنیزاسیون، DNA تلومری و سانترومری تکثیر نمی‌شود و کروموزوم‌های دختری از هم جدا نمی‌گردند. در کروموزوم‌های پلی تن غده بزاقی، هر کروموزوم والدی تقریباً ده بار همانندسازی را تجربه می‌کند (رشته ۱۰۲۴= 2^{10}).

شدن صحیح داشته باشد: (۱) **مبداءهای همانندسازی**[1] که در آن‌ها DNA پلیمرازها و سایر پروتئین‌ها سنتز DNA را آغاز می‌نمایند (شکل ۳۱-۴ و ۳۳-۴)؛ (۲) **سانترومر**، ناحیه فشرده شده‌ای که برای جداشدن صحیح کروموزوم‌های دختری ضروری می‌باشد و (۳) دو انتها یا **تلومرها**[2].

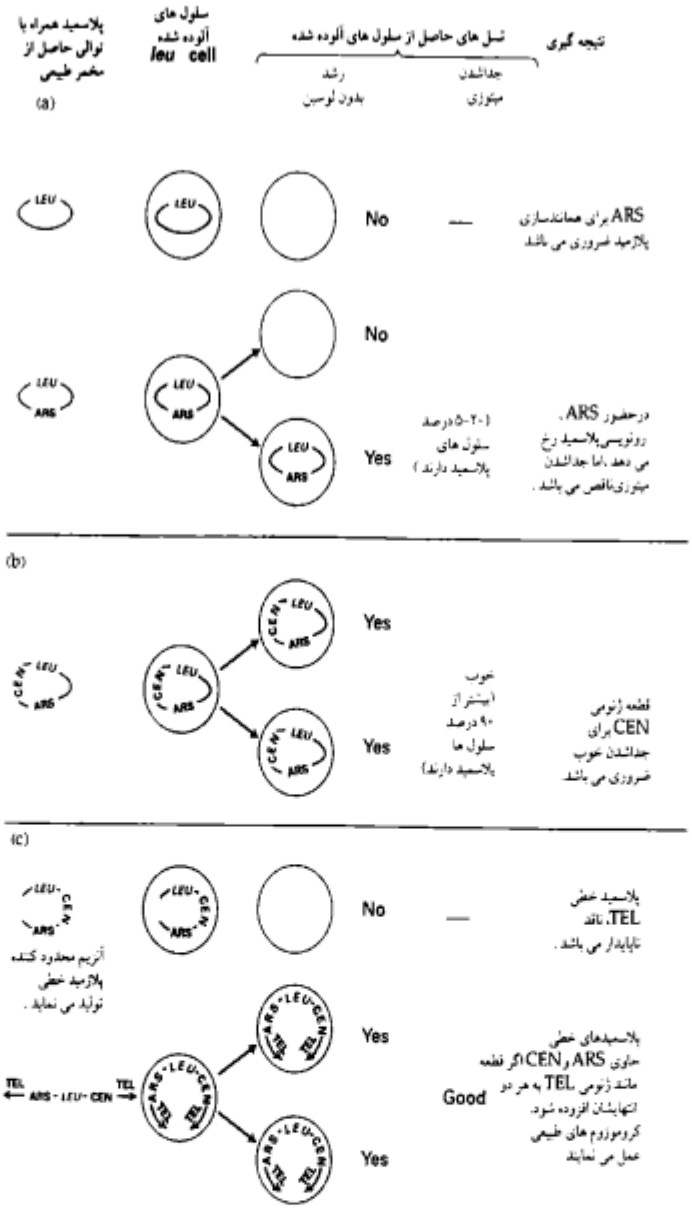
مطالعات ترانسفورماسیون روی مخمر که در شکل ۴۶-۶ دیده می‌شود، عملکردهای این سه جز کروموزومی را بیان نموده و اهمیت آنها را برای عملکرد کروموزوم نشان می‌دهد. همانگونه که در فصل ۴ بحث شده است، همانندسازی DNA از جایگاههایی شروع می‌شود که در سرتاسر کروموزوم‌های یوکاریوتی پخش شده‌اند. ژنوم مخمر حاوی توالی‌های زیاد ***حدوداً ۱۰۰ جفت بازی*** تحت عنوان ***توالی‌های همانندسازی خودکار***[3] (ARSs) می‌باشد که به عنوان نقاط شروع همانندسازی عمل می‌کنند. این مشاهده که وارد نمودن یک ARS به درون یک پلاسمید حلقوی امکان همانندسازی پلاسمید در سلول‌های مخمری را می‌دهد، در واقع اولین نمونه شناسایی شده از توالی‌های آغاز در DNA یوکاریوتی بود. (شکل ۴۶a-۶).

با وجود اینکه پلاسمیدهای حلقوی حاوی ARS می‌توانند در سلول‌های مخمری همانندسازی نمایند، تنها حدود ۵ تا ۲۰ درصد سلول‌های تولید شده حاوی پلاسمید می‌باشند چون جداشدن میتوزی پلاسمیدها به طور ناقص انجام می‌گیرد. با این حال پلاسمیدهایی که توالی CEN که از سانترومر کروموزوم‌های مخمری مشتق شده است را نیز دارند، به نحو یکسانی یا نزدیک به یکسان طی تقسیم میتوز به سلول‌های مادر و دختر منتقل می‌شوند. اگر پلاسمیدهای حلقوی حاوی توالی ARS و CEN، یکبار با یک آنزیم محدود کننده برش داده شوند، پلاسمیدهای خطی حاصل کلونی‌های LEU^+ را تولید نمی‌کنند مگر اینکه حاوی توالی‌های ویژه‌ی تلومری (TEL) باشند که به انتهاهایشان چسبیده شده است (شکل ۴۶c-۶). نخستین آزمایش موفق که دربردارنده آلوده سازی سلول‌های مخمری با پلاسمیدهای خطی بود با استفاده از انتهای یک مولکول DNA که تصور می‌رفت به عنوان یک مولکول خطی در پرتوزآی مژک دار تتراهیمنا همانندسازی کند، به انجام رسید. در قسمتی از چرخه زندگی تتراهیمنا، بیشتر DNA هسته‌ای به طور مکرر به صورت قطعات کوتاهی جهت تشکیل یک **هسته بزرگ**[4] کپی می‌شود. یکی از این قطعات تکرار شده به صورت دیمری از DNA ریبوزومی شناخته می‌شود که هرانتهای آن حاوی توالی تکرار شونده $(G_4T_2)_n$ می‌باشد. هنگامی که قسمتی از این توالی تکرار شده TEL به انتهاهای پلاسمیدهای خطی مخمری حاوی ARS و CEN متصل گردیده رونویسی و جداشدن پلاسمیدهای خطی به خوبی انجام گرفت.

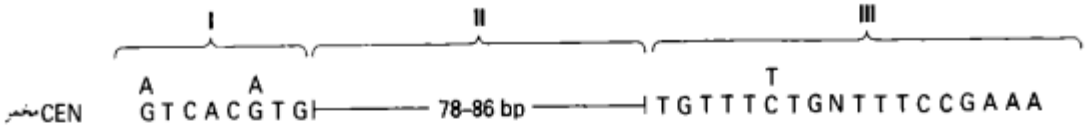
توالی‌های سانترومری به لحاظ طول بسیار متنوع هستند

به محض کلون شدن نواحی سانترومری مخمر (که قابلیت جدا شدن میتوزی را می‌بخشند)، توالی شان تعیین و مقایسه شد و این بررسی نشان داد سه ناحیه (I، II و III) در بین کروموزوم‌های مختلف حفاظت شده است (شکل ۴۷-۶). توالی‌های نوکلئوتیدی کوتاه که نسبتا به خوبی حفاظت شده‌اند در نواحی I و III وجود دارند اما ناحیه II به نظر می‌رسد دارای یک طول نسبتا ثابت باشد، اما هیچگونه توالی محافظت شده مشخصی نداشته و غنی از بازهای A و T می‌باشد. نواحی I و III به پروتئین‌هایی متصل می‌شود که بامجموعه‌ای بیش از ۳۰ پروتئین دیگر می‌دهد و آن‌ها نیز به نوبه خود به میانکنش‌ها، ریزلوله‌ها متصل می‌گردند. در نتیجه‌ی این میانکنش‌ها، هر کدام از کروموزوم‌های ساکارومایسیس سرویزیه به یک ریزلوله از دستگاه دوکی طی میتوز متصل می‌گردد. ناحیه‌ی II به نوکلئوزومی متصل می‌باشد که دارای نوع متفاوتی از هیستون H3 به جای هیستون طبیعی است. سانترومرهای مربوط به تمام یوکاریوت‌ها به نحو مشابه از طریق نوکلئوزوم‌هایی با این هیستون H3 تخصص یافته و اختصاصی سانترومر (تحت عنوان CENP-A در انسانها) متصل می‌شوند. این هیستون برای عملکرد سانترومری

1- Replication origins 2- Telomers
3-Autoxomously replicating sequences
4- Maeronucleus



▲ **شکل تجربی ۴۶-۶ آزمایشات آلوده سازی مخمری، اجزای کروموزومی عملکردی لازم جهت همانندسازی و جدا شدن طبیعی را شناسایی می‌نماید.** در این آزمایشات، پلاسمیدهای حاوی ژن LEU از سلول‌های طبیعی مخمر ساخته شده و از طریق آلوده سازی به درون سلول‌های leu^- وارد می‌شوند. اگر پلاسمید در سلول‌های leu^- باقی ماند، توسط ژن LEU موجود روی پلاسمید به LEU^+ تبدیل می‌گردد و می‌تواند کلونی‌هایی را روی محیط کشت فاقد لوسین تشکیل دهد. (a) توالی‌هایی که امکان همانندسازی خودکار یک پلاسمید را فراهم می‌آورند (ARS) شناسایی شدند، چون وارد نمودن آنها به درون یک وکتور پلاسمید حاوی یک ژن کلون شده‌ی LEU منجر مخمر به LEU^+ تبدیل می‌شود. با این حال، حتی پلاسمیدهای دارای ARS جدا شدن ضعیفی را طی میتوز نشان می‌دهند و بنابراین در هر کدام از سلول‌های دختری ظاهر نمی‌گردند. (b) هنگامی که قطعات DNA ژنومی مخمر به طور تصادفی شکسته شده‌اند به درون پلاسمیدهایی که حاوی ARS و LEU هستند، وارد گردیدند، برخی از سلول‌های آلوده شده‌ی حاصل، کلونی‌های بزرگی تولید نمودند که نشان می‌دهد نرخ بالای جداشدن میتوزی در بین پلاسمیدهایشان، رشد پیوسته‌ی سلول‌های دختر را تسهیل می‌نماید. DNA بدست آمده از پلاسمیدها در این کلونی‌های بزرگ حاوی توالی‌های سانترومر مخمر (CEN) می‌باشد. (c) هنگامی که سلول‌های مخمری leu^- با پلاسمیدهای خطی شده‌ی حاوی LEU، ARS و CEN آلوده شدند، هیچ کلونی‌ای رشد نکرد. افزودن توالی‌های تلومری به انتهاهای این DNA خطی، به پلاسمیدهای خطی شده این توانایی را بخشید که به عنوان کروموزوم‌های جدیدی همانندسازی کرده و شبیه یک کروموزوم طبیعی در میتوز و میوز رفتار نمایند.



▲ **شکل ۴۷-۶ توالی سانترومر مخمر (CEN).** توالی مورد اجماع CEN مخمری که در اینجا نشان داده شده است و مبتنی بر آنالیز سانترومرهای حاصل از ۱۰ کروموزوم متفاوت ***ساکارومایسیس سرویزیه*** می‌باشد، شامل سه ناحیه‌ی حفاظت شده است. ناحیه II، اگرچه به لحاظ توالی متغییر است، اما به لحاظ طول، نسبتاً ثابت بوده و غنی از ریشه‌های A و T می‌باشد. کروموزوم‌های مخمری کاملا کوتاه بوده و توالی‌های CEN آنها ساده‌تر از کروموزوم‌های مربوط به سایر یوکاریوت‌ها است.

ضرروی می‌باشد. ساکارومایسیس سرویزیه، ساده‌ترین توالی سانترومری شناخته شده در طبیعت را دارد.

در مخمر شکاف دار ***اسکیزوساکارومایسیس پمبه***، سانترومرها جدول ۴۰kb طول دارند و متشکل از نسخه‌های تکرار شده‌ای از توالی‌هایی هستند که شبیه به توالی‌های موجود در سانترومرهای ساکارو مایسیس سرویزیه می‌باشند. نسخه‌های متعدد ازپروتئین‌های همولوگ با پروتئین‌هایی که با سانترومرهای ساکارومایسیس سرویزیه میانکنش می‌دهند، به این سانترومرهای کمپلکس ساکارومایسیس سرویزیه متصل می‌گردند و کروموزوم‌های به مراتب طولانی‌تر ساکارومایسیس سرویزیه نیز به نوبه‌ی خود به ریزلوله‌های متعدد دستگاه دوک میتوزی متصل می‌شوند. در گیاهان و حیوانات، سانترومرها حدود مگاباز طول داشته و از تکرارهای چندگانه‌ای از DNA با توالی ساده تشکیل شده‌اند. در انسان‌ها، سانترومرها حاوی آرایشهای ۲ تا ۴ مگابازی از یک DNA با توالی ساده ۱۷۱bp تحت عنوان DNA **آلفوئید**[1] می‌باشند. DNA آلفوئید به نوکلئوزوم‌هایی که حاوی نوع CENP-A از هیستون H3 و همچنین به DNA با توالی ساده تکراری دیگر متصل می‌شود.

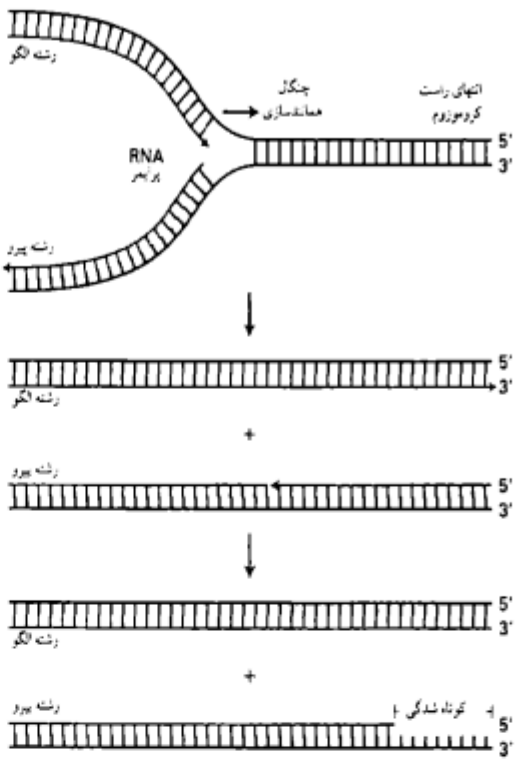
در یوکاریوت‌های عالی، یک ساختار کمپلکس پروتئینی تحت عنوان **کینه توکور**[2] در سانترومرها تشکیل می‌گردد و همراه با رشته‌های دوک چندگانه میتوزی، طی تقسیم میتوز باقی می‌ماند. همولوگ‌های اغلب پروتئین‌های سانترومری موجود در مخمرها، در انسان و سایر یوکاریوت‌های عالی وجود دارند و تصور بر این است که این همولوگ‌ها، از اجزای کینه توکورها باشند. نقش سانترومر و پروتئین‌های متصل به آن در جداسازی کروماتیدهای خواهری طی میتوز در فصل‌های ۱۸ و ۲۰ توضیح داده شده است.

افزودن توالی‌های تلومری بوسیله‌ی تلومراز مانع از کوتاه شدن کروموزوم‌ها می‌گردد

تعیین توالی تلومرها از موجودات مختلف، از جمله انسان‌ها، نشان داده که تلومرها اغلب الیگومرهایی تکراری با محتوای G بالا در رشته DNA هستند، به نحوی که انتهای ′۳ این رشته در انتهای کروموزوم قرار دارد. توالی تکراری تلومر در انسان‌ها و سایر مهره‌داران TTAGGG می‌باشد. این توالی‌های ساده در انتهاهای کروموزوم‌ها در حدود چند صد جفت باز در مخمرها و پروتوزوآها و چندهزار جفت باز در مهره داران، تکرار می‌شوند. انتهای ′۳ رشته غنی از G حدود ۱۶-۱۲ نوکلئوتید بلندتر از انتهای ′۵ رشته‌ی مکمل غنی از C می‌باشد. این ناحیه به پروتئین‌های خاصی متصل شده و انتهاهای کروموزوم‌های خطی را از خطر هجوم آگزونوکلئازها حفاظت می‌نماید.

نیاز به یک ناحیه‌ی تخصص یافته در سرهای کروموزوم‌های یوکاریوتی زمانی به وضوح حس می‌شود که درمی‌یابیم همه DNA پلیمرازهای شناخته شده زنجیره‌های DNA را از انتهای ′۳ طویل می‌سازند و همگی به یک پرایمر DNA یا RNA نیازمند هستند. هنگامی که چنگال همانندسازی به انتهای یک کروموزوم خطی نزدیک می‌گردد، سنتز رشته پیشرو تا انتهای رشته‌ی DNA ادامه پیدا کرده و منجر به کامل شدن یک مارپیچ دوگانه‌ی DNA دختری می‌گردد اما از آنجا که الگوی رشته‌ی پیرو به نحو غیرپیوسته‌ای کپی می‌گردد، نمی‌تواند به طور کامل همانندسازی شود (شکل ۴۸-۶). هنگامی که آخرین پرایمر RNA برداشته می‌شود، هیچ رشته بالادست دیگری وجود ندارد تا DNA پلیمراز بتواند روی آن به ساختن DNA ادامه دهد و جای خالی ایجاد شده را پرنماید. بدون وجود برخی مکانیسم‌های خاص، رشته DNA دختری که از سنتز رشته‌ی پیرو حاصل می‌گردد، در هر تقسیم سلولی کوتاه‌تر می‌شد. مشکل کوچک شدن تلومر توسط آنزیمی که توالی‌های تلومری (TEL) را به انتهاهای هر کروموزوم می‌افزاید، حل می‌گردد. این آنزیم یک کمپلکس پروتئین - RNA تحت عنوان **ترانسفراز**

1- Alphoid DNA 2- Kinetochore



▲ **شکل ۴۸-۶ همانندسازی استاندارد DNA منجر به از دست رفتن DNA در انتهای ′۵ هر رشته از یک مولکول خطی DNA می‌گردد.** همانندسازی انتهای راست یک DNA خطی نشان داده شده است، همان فرآیند در انتهای سمت چپ رخ می‌دهد (که با برعکس نمودن شکل نشان داده شده است). هنگامی که چنگال همانندسازی به انتهای یک مولکول DNA والدی نزدیک می‌شود، رشته‌ی پیشرو می‌تواند تمام مسیر را تا انتهای رشته الگوی والدی بدون از دست رفتن داکسی ریبونوکلئوتیدها سنتز کند اما از آنجایی که سنتز رشته پیرو نیازمند پرایمرهای RNAای می‌باشد، انتهای سمت راست رشته DNA دختری پیرو به صورت ریبونوکلئوتیدهایی که نمی‌توانند به عنوان الگو برای یک DNA پلیمراز قابل همانندسازی عمل کند، باقی می‌ماند. مکانیسم‌های دیگری می‌بایست از سوی سلول (و ویروس‌های با ژنوم DNA خطی) جهت ممانعت از کوتاه شدن رشته‌ی پیرو در هر دور همانندسازی، مورد استفاده قرار گیرد.

انتهای تلومر[1] یا **تلومراز**[2] می‌باشد. از آنجایی که توالی RNA موجود در تلومراز، همانطور که خواهیم دید، به عنوان الگویی برای افزوده شدن دی اکسی ریبونوکلئوتیدها به انتهاهای تلومرها، عمل می‌نماید، منبع آنزیم و نه منبع پرایمر DNA تلومری، تعیین کننده توالی افزوده شده می‌باشد. این مساله از طریق تغییر دادن تتراهیمنا بایک شکل جهش یافته از ژنی که RNA موجود در تلومراز را رمزدهی می‌نماید، ثابت شده است. تلومراز حاصل یک توالی DNA مکمل با توالی RNA جهش یافته در درون خود را به انتهای پرایمرهای تلومری اضافه می‌کند. بنابراین تلومراز شکل تخصص یافته‌ای از یک رونویسی کننده معکوس می‌باشد که الگوی RNA درونی خودش را جهت هدایت سنتز DNA، با خود حمل می‌نماید. شکل ۴۹-۶ نشان می‌دهد که چگونه تلومراز، با رونویسی معکوس RNA همراه خود، انتهای ′۳ DNA تک رشته‌ای را در انتهای رشته‌ی غنی از G ذکر شده در بالا، طویل می‌نماید. سلول‌های حاصل از موش‌های Knocout شده که نمی‌توانند RNA همراه با تلومراز را تولید نمایند، هیچ گونه فعالیت تلومرازی را از خود نشان نمی‌دهند و تلومرهایشان در هر نسل سلولی به ترتیب کوتاه‌تر می‌گردد. چنین موش‌هایی می‌توانند آمیزش داشته باشند و قبل از آن که تکرارهای بلند تلومری به نحو قابل ملاحظه‌ای کم شوند، قادرند به طور طبیعی برای سه نسل تولید مثل نمایند. سپس، نبود DNA تلومری منجر به اثرات شدیدی از جمله ادغام پایانه‌های کروموزومی و از دست رفتن DNA کروموزومی می‌گردد. در نسل چهارم، پتانسیل تولید مثل این موش‌ها افت کرده و پس از نسل ششم دیگر نمی‌توانند فرزندی تولید نمایند.

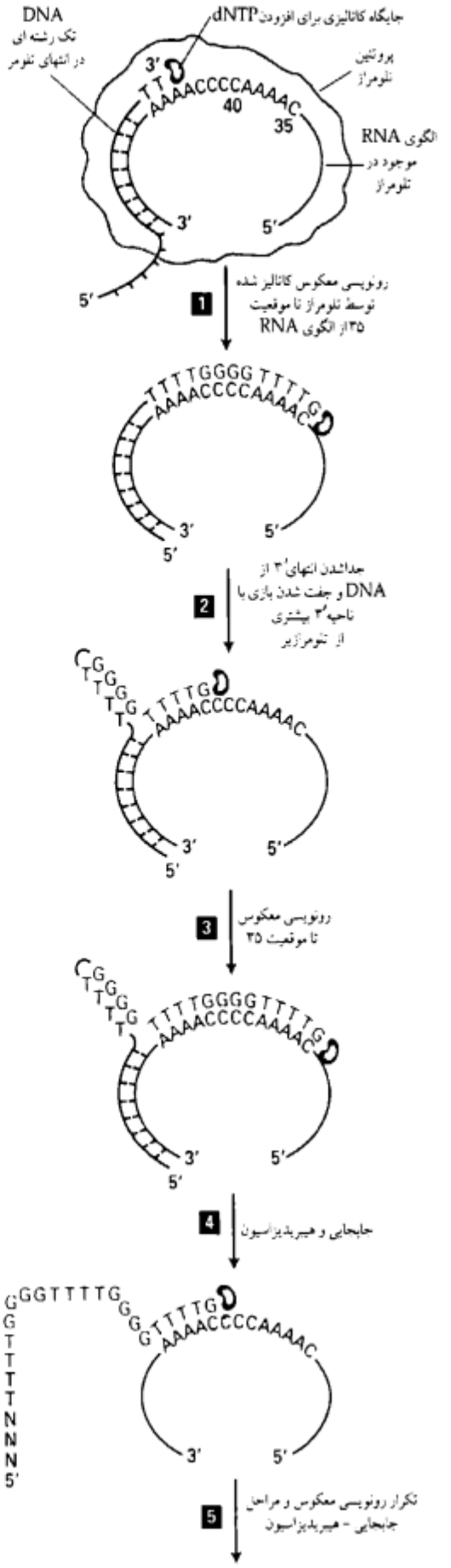
ژن‌های انسانی که پروتئین تلومراز و RNA موجود در تلومراز را رمزدهی می‌نمایند، در سلول‌های زاینده و سلول‌های بنیادی فعال می‌باشند، اما در اغلب سلول‌های بافت‌های بالغ که تنها برای دفعات محدودی همانندسازی می‌نمایند یا دیگر هرگز همانندسازی نخواهند کرد (چنین سلول‌هایی را پس میتوزی[3] می‌نامند)، خاموش می‌باشند. این ژن‌ها در اغلب سلول‌های سرطانی انسانی فعال می‌شوند، چون تلومراز در اینجا برای تقسیمات سلولی متعدد جهت تشکیل یک تومور ضروری می‌باشد، این پدیده سبب شده تا در پی یافتن مهار کننده‌های تلومراز انسانی به عنوان عواملی به طور بالقوه درمانی، برای مقابله با سرطان، باشند.

با اینکه تلومراز مانع از کوتاه‌تر شدن تلومر در اغلب یوکاریوت‌ها می‌گردد، برخی موجودات زنده استراتژی‌های دیگری دارند. گونه‌ی دروزوفیلا طول تلومر را از طریق واردسازی تنظیم شده‌ی رتروترانسپوزون‌های غیر LTR به درون تلومرها، حفظ می‌نماید. این یکی از معدود نمونه‌هایی است که در آن یک عنصر متحرک،

1- Telomere terminal tresferase

2- Telomerase 3- Postmitotic

عملکردی ویژه‌ای در موجود میزبان خویش دارد.



شکل ۴۹-۶ (شکل رنگی) مکانیسم عمل تلومراز انتهاهای ′۳ تک رشته‌ای یک تلومر توسط تلومراز طویل می‌گردد، و با ناتوانی مکانیسم همانندسازی DNA در سنتز انتهای کامل DNA خطی، مقابله می‌نماید. تلومراز این انتهای تک رشته‌ای را از طریق یک مکانیسم تکراری رونویسی معکوس، طویل می‌سازد. در اینجا عمل تلومراز حاصل از پروتوزوآی Oxytriche، که یک واحد تکراری T_4G_4 را اضافه می‌نماید، به تصویر کشیده شده است، سایر تلومرازها، توالی‌های کمی متفاوت‌تری را اضافه می‌نمایند. تلومراز حاوی یک الگوی RNAای (قرمز) می‌باشد که با انتهای ′۳ الگوی رشته‌ی پیرو، جفت می‌گردد. سپس جایگاه کاتالیزی تلومراز (سبز) داکسی ریبونوکلئوتیدها (آبی) را با استفاده از مولکول RNA به عنوان یک الگو، اضافه می‌نماید. این رونویسی معکوس تا موقعیت ۳۵ از الگوی RNA پیش می‌رود (مرحله (۱)). تصور می‌شود که رشته‌های دوگانه‌ی DNA-RNA حاصل، سپس نسبت به یکدیگر سُر خورده و منجر به جابجایی یک ناحیه تک رشته‌ای از رشته‌ی DNA تلومری و برداشتن پوشش قسمتی از توالی الگوی RNA می‌شود (مرحله (۲)). توالی تلومری رشته پیرو دوباره بوسیله‌ی تلومراز تا موقعیت ۳۵ طویل می‌گردد و رشته دوگانه DNA-RNA همانند گذشته متحمل جابجایی و هیبریدیزاسیون می‌گردد (مرحله (۳) و (۴)). تلومرازها می‌توانند واحدهای تکراری بسیاری را با تکرار مراحل (۳) و (۴) اضافه نمایند. α-پریماز در DNA پلیمراز می‌تواند سنتز قطعات جدید اکازاکی را روی این رشته‌ی الگوی طویل شده، آغاز نماید. نتیجه نهایی، ممانعت از کوتاه شدن رشته پیرو در هر دور همانندسازی DNA می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۷-۶

ریخت‌شناسی و عناصر عملکردی کروموزم‌های یوکاریوتی

- طی متافاز، کروموزوم‌های یوکاریوتی به حدی متراکم می‌شوند که آن‌ها را می‌توان با میکروسکوپ نوری مشاهده نمود.
- کاریوتیپ کروموزومی مختص هر گونه می‌باشد. گونه‌هایی که ارتباط زیادی با هم دارند می‌توانند کاریوتیپ بسیار متفاوتی داشته باشند که بیان می‌کند اطلاعات مشابه ژنتیکی طرق متفاوتی روی کروموزوم‌ها می‌تواند سازمان یابد.
- آنالیز نواربندی و رنگ‌آمیزی کروموزوم برای شناسایی کروموزوم‌های متافازی متفاوت در انسان و جهت شناسایی جابجایی و حذف‌ها استفاده می‌شود (شکل ۴۲-۶ را ملاحظه کنید).
- آنالیز نوآرایی‌های کروموزومی و نواحی دارای نظم حفاظت‌شده بین گونه‌های خویشاوند به دانشمندان این امکان

را می‌دهد که در باره تکامل کروموزوم‌ها، پیش‌بینی‌هایی را انجام دهند (شکل ۳۲-۶ را ملاحظه کنید). روابط تکامل بین موجودات زنده که با این مطالعات نشان داده شده‌اند با روابط تکاملی پیشنهادشده مبتنی بر شواهد فسیلی وآنالیز توالی DNA سازگار بوده است. ■ الگوی نواربندی (باندها) به شدت تکراری کروموزوم‌های پلی تن امکان تعیین موقعیت DNA کلون شده دروزوفیلا را روی کروموزوم دروزوفیلا از طریق هیبریدیزاسیون درجا (دورگه سازی درجا، شکل ۴۴-۶ را ملاحظه کنید) و مشاهده نمودن نوآرایی‌ها و حذف‌های کروموزومی بصورت تغییر الگوی طبیعی نوارها می‌دهد.

■ سه نوع توالی DNA برای این که یک مولکول DNA طویل بصورت کروموزوم عمل نماید لازم است: مبدأ همانندسازی که در مخمر ARS نامیده می‌شود. توالی سانترومر (CEN) و دو توالی تلومر در انتهاهای DNA (شکل ۴۲-۶ را ملاحظه کنید).

■ تلومراز (یک کمپلکس RNA پروتئین) فعالیت ترانس کریپتاز خاصی داشته و همانندسازی تلومرها را طی سنتز DNA کامل می‌کند (شکل ۴۹-۶ را ملاحظه کنید). در غیاب تلومراز رشته DNA دختری حاصل از سنتز رشته پیرو، در هر تقسیم سلولی در اغلب یوکاریوت‌ها کوتاهتر خواهد شد (شکل ۴۸-۶ را ملاحظه کنید).

چشم اندازی به آینده

توالی ژنوم انسانی معدن طلایی برای کشفیات جدید در زیست‌شناسی سلولی مولکولی، شناسایی پروتئین‌های جدیدی که ممکن است اساس درمانهای مؤثر برای بیماریهای انسانی باشند، و برای شناخت و درک تاریخ و تکامل انسان نخستین است. با این حال، یافتن ژن‌های جدید مانند یافتن سوزنی در انبارگاه می‌باشد چون تنها تقریباً ۱/۵ درصد توالی ژنوم ،پروتئین‌ها یا RNAهایی دارای عملکردی را رمزدهی می‌نماید. شناسایی و تعیین هویت ژن‌ها در توالی ژنوم باکتریایی نسبتا ساده می‌باشد. در پروکاریوت‌ها به دلیل نادر بودن اینترون‌ها، تنها جستجو برای قطعات بلند با قالب‌های قابل خواندن بدون کدون‌های پایان، منجر به شناسایی اغلب ژن‌ها می‌گردد. در مقابل، جستجو برای ژن‌های انسانی بخاطر ساختار ژن‌های انسانی، امری پیچیده می‌باشد. ژن‌های انسانی اغلب متشکل از اگزون‌های چند گانه‌ی نسبتاً کوتاه بوده و توسط اینترون‌های غیر رمزگردان بسیار طویل‌تر جدا شده‌اند. شناسایی واحدهای رونویسی کمپلکس از طریق آنالیز توالی‌های DNA ژنومی، خود امری چالش‌زا است. پیشرفت‌های آینده در روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی ژن و تعیین خصوصیات نسخه‌های cDNA مربوط به mRNAهای تخلیص شده از صدها نوع سلول انسانی احتمالاً منجر به کشف پروتئین‌های جدید و بهتر شدن درک ما از فرآیندهای زیستی و احتمالاً کاربردهایی در پزشکی و کشاورزی خواهد داشت.

مشاهده نموده‌ایم که گرچه اغلب ترانسپوزون‌ها مستقیما در فرآیندهای سلولی عملکردی ندارند، اما به شکل‌گیری ژنوم امروزی از طریق شروع مضاعف شدن‌های ژنی (تلاطم اگزونی)، ایجاد ترکیبات جدیدی از توالی‌های کنترل رونویسی و سایر ویژگی‌های ژنوم‌های معاصر، کمک نموده‌اند. آن‌ها هم چنین این پتانسیل را دارند که به ما مطالب خوبی از تاریخ و ریشه‌هایمان ارائه دهند، چراکه ترانسپوزون‌های L1 و Alu در طی تاریخ تکاملی، به جایگاههای جدیدی در افراد وارد شده‌اند. تعداد زیادی از این تکرارهای پراکنده شده در میان جمعیت‌ها چندشکلی پلی‌مورفیک بوده و در جایگاه خاصی در برخی افراد (نه در افراد دیگر) وجود دارند. افرادی که از نظر داشتن یک الحاق در یک جایگاه خاص مشترک هستند از یک جد مشترک حاصل شده‌اند، جد مشترکی که از تخمک یا اسپرمی بوجود آمده که الحاق در آن اتفاق افتاده است. مدت زمانی که از آن الحاق اولیه تاکنون سپری شده است را نیز می‌توان از طریق تفاوت‌های توالی‌های عناصری که از تجمع جهش‌های تصادفی بوجود می‌آیند، تخمین زد. آنالیز چندشکلی‌های رتروترانسپوزونی بدون شک به درک ما از مهاجرت‌های انسانی از هنگامی که **انسان امروزی**[1] تکامل یافته و هم تاریخ جمعیت‌های معاصر اضافه خواهد کرد.

تجربه و تحلیل داده‌ها

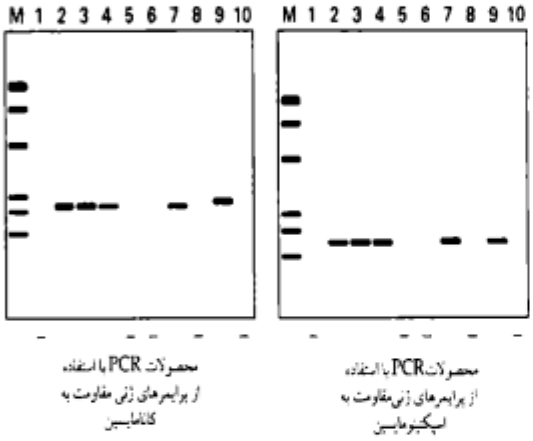
برای اینکه تعیین نماییم، آیا ژن از یک ژنوم اندامکی به هسته انتقال پیدا می‌کند یا نه را می‌توان در آزمایشگاه مشاهده نمود، یک وکتور انتقالی کلروپلاست ساخته شد. این وکتور حاوی دو مارکر انتخابی مقاوم به آنتی بیوتیک بوده و هر کدام پروموتر خویش را دارند: ژن مقاومت به اسپکتینومایسین و ژن مقاومت به کانامایسین. ژن مقاومت به اسپکتینومایسین توسط یک پروموتر کلروپلاستی کنترل می‌شود که حاوی یک مارکر انتخابی اختصاصی برای کلروپلاست می‌باشد. گیاهان رشدکرده روی اسپکتینومایسین سفید هستند، مگر

1- Homo sapine

اینکه ژن مقاومت به اسپکتینومایسین را در کلروپلاست بیان نمایند. ژن مقاومت به کانامایسین که به داخل پلاسمید مجاور ژن مقاومت به اسپکتینومایسین وارد شد، تحت کنترل یک پروموتر توانمند هسته‌ای است. گیاهان تراریخت تنباکو مقاوم به اسپکتینومایسین، به دنبال تغییر با این پلاسمید از طریق شناسایی گیاهان سبز رشد کرده روی محیط کشت حاوی اسپکتینومایسین، انتخاب شدند. این گیاهان حاوی دو ژن مقاوم به آنتی بیوتیک وارد شده به درون ژنوم کلروپلاست از طریق یک نوترکیبی، می‌باشند، هر چند مقاومت به کانامایسین بیان نمی‌گردد چون تحت کنترل یک پروموتر هسته‌ای می‌باشد. این گیاهان مقاوم به اسپکتینومایسین برای چندین نسل رشد داده شدند و در مطالعات زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

(a) برگ‌های گرفته شده از گیاهان تراریخت مقاوم به اسپکتینومایسین در یک محیط کشت رویش گیاهی حاوی کانامایسین قرار داده شدند. برخی از این سلول‌های گیاهی مقاوم به کانامایسین بودند و تبدیل به گیاهانی مقاوم به کانامایسین شدند. گرده‌های (پدری) حاصل از گیاهان مقاوم به کانامایسین جهت گرده افشانی گیاهان (غیر تراریخته) نوع وحشی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. در تنباکو، هیچ کلروپلاستی از گرده‌ها به ارث نمی‌رسند. دانه‌های حاصل روی محیط کشت با و بدون کانامایسین رشد داده شدند. نیمی از این دانه‌های رشد کرده حاصل، مقاوم به کانامایسین بودند. هنگامی که به این گیاهان مقاوم به کانامایسین امکان داده شد که خود گرده افشانی نمایند، زاده‌ها نسبت ۳ به ۱ از فنوتیپ‌ها مقاوم نسبت به فنوتیپ‌های حساس به کانامایسین را نشان دادند. از این داده‌ها در مورد موقعیت مکانی ژن مقاومت به کانامایسین، چه می‌توان نتیجه‌گیری کرد؟

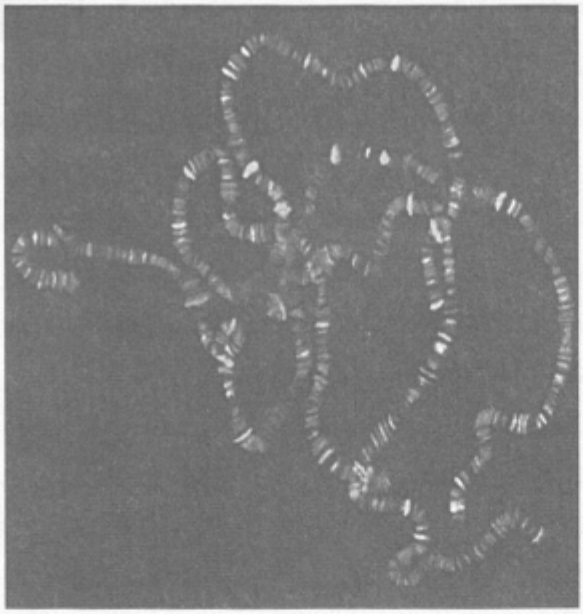
(b). برای اینکه تعیین شود که آیا انتقال ژن مقاومت به کانامایسین به هسته از طریق یک DNA یا RNA حدواسط انجام شده است، DNA از ده گیاه تازه رشد کرده استخراج گردید. این گیاهان از دانه‌های گیاه نوع وحشی که با گیاه مقاوم به کانامایسین گرده افشانی شده بود، حاصل شده بودند. ده گیاه تازه رشد کرده، که در ستون‌های ژل در شکل زیر از یک تا ده شماره گذاری شده‌اند، حاوی ۵ عدد گیاه مقاوم به کانامایسین (+) و ۵ عدد گیاه حساس به کانامایسین (−) می‌باشند. هر نمونه DNA با استفاده از پرایمرهایی جهت تکثیر ژن مقاومت به کانامایسین (ژل در سمت چپ) یا ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (ژل سمت راست)، در معرض آنالیز PCR قرار گرفت. آن ستونی که با M نام گذاری شده است، مارکرهای وزن مولکولی را نشان می‌دهد. این انطباق بین حضور و غیاب محصولات PCR که در گیاه یکسانی با هر دو سری از پرایمرها ایجاد می‌گردد، درباره‌ی سبک انتقال ژن کانامایسین به هسته چه می‌گوید؟



(c). هنگامی که گیاهان تراریخت اصلی، که براساس اسپکتینومایسین و نه براساس کانامایسین انتخاب شدند، جهت گرده افشانی گیاهان نوع وحشی مورد استفاده قرار گرفت، هیچ کدام از زاده‌ها مقاوم به کانامایسین نبودند. از این مشاهدات چه می‌توان استنتاج کرد؟

فصل ۷

کنترل بیان ژن در سطح رونویسی



(شکل رنگی) کروموزومهای پلی‌تن مگس سرکه رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی‌هایی برعلیه یک ATPase تغییرشکل کروماتینی که Kismet نامیده می‌شوند. RNA پلیمراز II با فسفریلاسیون کم CTD (قرمز) و RNA پلیمراز II با فسفریلاسیون بالای CTD (سبز).

رئوس مطالب

۷.۱ کنترل بیان ژن در باکتری

۷.۲ مروری بر کنترل بیان ژن در یوکاریوت و RNA پلی‌مرازها

۷.۳ توالی‌های تنظیمی در ژن‌های کدکننده پروتئین

۷.۴ مهارگرها و فعال‌کننده‌های رونویسی

۷.۵ آغاز رونویسی به وسیله RNA پلی‌مراز II

۷.۶ مکانیسم مولکولی مهار و فعال‌سازی رونویسی

۷.۷ تنظیم فعالیت عوامل کنترل رونویسی

۷.۸ تنظیم ادامه و خاتمه رونویسی

۷.۹ سایر سیستم‌های رونویسی یوکاریوت

در فصول قبل مشاهده کردیم که خواص و اعمال هر سلول با پروتئین‌هایی که آن سلول دارد، تعیین می‌شود. در این فصل و فصل بعدی، چگونگی تنظیم نوع و مقدار پروتئین‌هایی را که یک سلول موجود پرسلولی تولید می‌کند، بررسی می‌کنیم. کنترل **بیان ژن**، فرآیند اساسی است که رشد یک موجود پرسلولی یا ارگانیسم را مثل خود ما از یک سلول تخم لقاح یافته به هزاران سلول مختلف که ما را تشکیل می‌دهند، کنترل می‌کند. زمانی که بیان ژن دچار انحراف شود، خواص سلولی تغییر می‌کند و سلول به سوی سرطانی شدن پیش می‌رود. در فصل ۲۵ به طور مفصل خواهیم دید که ژن‌هایی وجود دارند که مانع رشد سلولی می‌شوند و همین ژن‌ها در حالت سرطانی سرکوب می‌شوند، در حالی که ژن‌هایی که پروتئین‌های مسئول تکثیر سلول را بیان می‌کنند، به طرز غیرمعمولی فعال می‌شوند. ناهنجاری‌های بیان ژن می‌تواند منجر به نارسایی‌های تکاملی و رشدی مانند شکاف کام و شکاف بین حفرات قلب و... نیز بشود. تنظیم بیان ژن در تک‌سلولی‌ها و باکتری‌ها نیز نقش مهمی بازی می‌کند، چراکه همین فرآیند باعث سازگاری میان بیان دستگاه آنزیمی و اجزای سلولی این موجودات و محیط غذایی و فیزیکی متغیر پیرامونشان می‌شود. در نهایت برای آنکه بدانیم یک تک‌سلولی چگونه به تغییرات محیطی پاسخ می‌دهد، چگونه ناهنجاری‌ها به واسطه بیان غلط ژن‌ها ایجاد می‌شود و اینکه یک موجود پرسلولی چگونه رشد می‌کند، ضروری است که میانکنش‌های مولکولی که بیان و تولید پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند، به خوبی درک کنیم.

مراحل اساسی بیان ژن (فرآیندهایی که باعث می‌شوند اطلاعاتی که درون یک ژن قرار دارد به صورت پروتئین خاصی رمزگشایی شوند)، در فصل چهار مرور شده‌اند. سنتز mRNA به RNA پلی‌مرازی احتیاج دارد تا رونویسی را آغاز و ریبونوکلوزید تری‌فسفات‌های مکمل رشته رمزکننده DNA را پلیمریزه کند و سپس رونویسی را خاتمه دهد. در پروکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها و

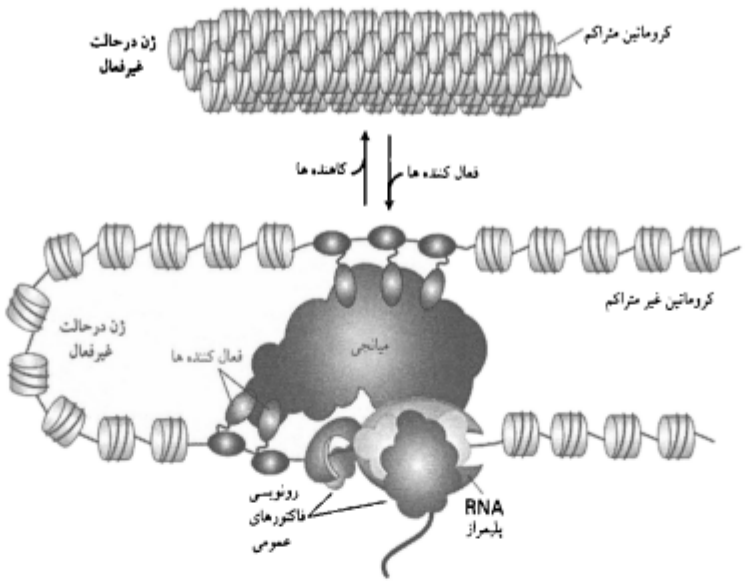
عوامل آغاز ترجمه به سرعت رونوشت جدید را شناسایی می‌کنند و این RNA به عنوان mRNA وارد عمل می‌شود، بدون آن که متحمل تغییرات دیگری شود. در یوکاریوت‌ها رونوشت اولیه مورد پردازش قرار می‌گیرد که در نهایت mRNA بالغ را تحویل می‌دهند (شکل ۲۵-۴). پس از این مرحله mRNA از محلی که ساخته شده یعنی از هستک‌ها به سیتوپلاسم که محل ترجمه آن به پروتئین است، (به کمک ریبوزوم‌ها، tRNA و عوامل ترجمه است)، منتقل می‌شود (شکل ۲۵-۴).

به طور نظری تنظیم در هر یک از سطوح ذکرشده در مسیر بیان ژن منجر به بیان افتراقی پروتئین‌ها در سلول‌های مختلف و یا در مراحل رشد و تکامل متفاوت و یا در پاسخ به تغییرات محیطی می‌شود. هرچند که مثال‌هایی برای تنظیم و بیان ژن در همهٔ این مراحل وجود دارد، کنترل آغاز رونویسی (گام اول) مهمترین مکانیسم برای تعیین این نکته که کدام ژن‌ها بیان شوند و چه مقدار mRNA و به تبع آن چه مقدار پروتئین تولید شود، می‌باشد. مکانیسم‌های مولکولی که بیان ژن را در سطح آغازی تنظیم می‌کنند، برای فرآیندهای مختلفی از سلول و از جمله رشد و نمو یک موجود زنده پرسلولی از یک سلول لقاح یافته تخم، پاسخ‌های ایمنی که ما را در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا حفظ می‌کنند و فرآیندهایی که نورون‌های دستگاه عصبی در طی یادگیری و حافظه انجام می‌دهند، ضروری می‌باشد.

زمانی که این مکانیسم‌های کنترلی که مسئول کنترل رونویسی هستند، به طور صحیح عمل نکنند، شرایط بیماری‌زا ممکن است رخ دهد. به طور مثال کاهش فعالیت ژن Pax6 منجر به نقص در تکامل عنبیه می‌شود. Pax6 یک عامل رونویسی است که به طور طبیعی بیان ژن‌های دخیل در رشد چشم‌ها را به عهده دارد (شکل ۲۶e-۱ را ملاحظه کنید). در جانداران دیگر، جهش در عوامل رونویسی منجر به تولید یک جفت بال اضافه در مگس سرکه (شکل ۳۱-۲۲ را ملاحظه کنید)، باعث تغییر ساختار گل در گیاهان (شکل ۳۶-۲۲ را ملاحظه کنید) و عامل تعداد زیادی از سایر ناهنجاری‌های رشد می‌شود. رونویسی فرآیند پیچیده‌ای است که لایه‌های مختلف تنظیمی دارد. در این فصل، روی این موضوع متمرکز می‌شویم که چه مکانیسم‌های مولکولی زمان بیان ژن را تعیین می‌کنند. فرآیند مکانیسم پایه‌ای تنظیم رونویسی در باکتری‌ها را که شامل پروتئین‌های مهارگر و فعال‌کننده‌ای است که به توالی‌های خاصی در DNA وصل می‌شوند و رونویسی ژن مجاورشان را کنترل می‌کنند، بررسی می‌کنیم. مابقی فصل روی تنظیم رونویسی در یوکاریوت‌ها و این که چگونه همان قواعد اولیه در پروکاریوت‌ها ولی به طرز پیچیده‌تری در یوکاریوت‌ها عمل می‌کند، متمرکز می‌شویم. شکل ۱-۷ یک مرور کلی بر چگونگی تنظیم بیان ژن‌های یوکاریوتی و مسیرهایی است که در این فصل ذکر خواهد شد. بحث می‌کنیم که چگونه یک توالی خاص DNA به عنوان ناحیه کنترل‌کننده رونویسی عمل می‌کند و محلی برای اتصال عوامل تنظیم رونویسی است (عامل‌هایی مانند فعال‌گر و مهارکننده) و این که RNA پلی‌مراز مسئول رونویسی، چگونه به توالی پروموتر متصل می‌شود و سنتز RNA مکمل با DNA الگو را شروع می‌کند. در مرحله بعد، چگونگی متأثر کردن فرآیند رونویسی توسط مهارکننده و فعال‌گرها از طریق میانکنش آنها با کمپلکس‌های بزرگ چندپروتئینی را بررسی می‌کنیم. برخی از این کمپلکس‌های چندپروتئینی باعث تغییر تراکم کروماتین و تغییر دسترسی DNAی کروموزومی به عوامل رونویسی و RNAپلی‌مرازها می‌شوند. کمپلکس‌های دیگری سرعت اتصال RNAپلی‌مراز به DNA در محل آغاز رونویسی و همچنین فراوانی فرآیند آغاز رونویسی را کنترل می‌کنند. سپس در مورد چگونگی بیان یک ژن خاص توسط ترکیب ویژه‌ای از ۲۰۰۰ نوع عامل رونویسی که توسط ژنوم انسان رمز می‌شود، بحث خواهیم کرد. در ضمن مراحل مختلفی را مورد نظر قرار خواهیم داد که فعالیت خود عوامل رونویسی را تنظیم می‌کنند تا از بیان ژن در مکان و زمان صحیح اطمینان حاصل شود. در نهایت کنترل مراحل ادامه رونویسی و خاتمه فرآیند رونویسی و همین طور کنترل رونویسی ژن‌هایی که RNA هایی تولید می‌کنند که پروتئین محصول نهایی آن‌ها نیست را نیز بررسی می‌کنیم. پردازش RNA و مسیرهای پس از رونویسی که بیان ژن‌های یوکاریوتی را کنترل می‌کنند، در فصل بعد بحث می‌شوند. فصول بعدی به خصوص ۱۶ و ۲۲، مثال‌هایی را بیان می‌کنند که چگونه رونویسی توسط میانکنش‌های میان سلولی کنترل می‌شود و چگونه این **کنترل ژنی** بر رشد و عمل نوع خاصی از سلول‌ها در موجود زنده پرسلولی مؤثر است.

۱-۷ کنترل بیان ژن در باکتری

از آنجایی که ساختار و عملکرد هر سلول توسط پروتئین‌های آن سلول تعیین می‌شود، کنترل بیان ژن از جنبه‌های اساسی در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی است. به طور رایج تصمیم در مورد اینکه رونویسی یک ژن آغاز شود، مکانیسم عمده کنترل بیان پروتئین‌ها در سلول است. زمانی که رونویسی یک ژن مهار شده است، mRNA و پروتئین مربوط به آن ژن با سرعت کمی سنتز می‌شوند. برعکس، زمانی که رونویسی یک ژن فعال می‌شود،



▲ **شکل ۱-۷ مروری بر کنترل رونویسی در یوکاریوت‌ها.** پروتئین‌های فعال‌کننده به مناطق خاصی از DNA متصل می‌شوند و با کمپلکس چندپروتئینی مولکول‌های کمک فعال‌کننده[1] مانند واسطه‌گر متصل می‌شود و باعث باز شدن کروماتین و اتصال RNA پلی‌مراز و سایر عوامل رونویسی به پروموتر می‌شود. ژن‌های غیرفعال در نواحی فشرده کروماتین قرار دارند به گونه‌ای که اتصال RNA پلی‌مراز و عوامل رونویسی عمومی مرتبط با آنها نیز به DNA مهار شده است. پروتئین‌های مهارگر به عکس، با اتصال به نواحی کنترلی دیگری باعث مهار فرآیند آغاز رونویسی توسط RNA پلی‌مرازها می‌شود و با میانکنش با کمپلکس چندپروتئینی کمک مهارگر[2] باعث متراکم شدن کروماتین می‌شود.

mRNA و پروتئین‌ها یا پروتئین مربوط به آن، با سرعت بیشتری تولید می‌شوند. در اغلب باکتری‌ها و موجودات تک‌سلولی بیان ژن‌ها به منظور تطبیق ماشین آنزیمی سلول و اجزاء ساختاری سلول مطابق با شرایط غذایی و فیزیکی محیط، تنظیم می‌شود. لذا یک باکتری در یک زمان آن بخشی از پروتئوم خود را بیان می‌کند که در شرایط حاضر برای بقای آن ضروری است. در این مرحله جنبه‌های اصولی کنترل رونویسی در باکتری را با اپرون lac و ژن گلوتامین سنتتاز در E.coli به عنوان مثال‌های اولیه بررسی می‌کنیم. تعدادی مکانیسم‌های مشابه و مکانیسم‌های دیگری مسئول کنترل بیان ژن یوکاریوتی هستند که در ادامه فصل به آن‌ها می‌پردازیم.

آغاز رونویسی توسط RNA پلی‌مراز باکتریایی نیازمند اتصال عامل سیگما به آن است

در E.coli تقریباً نیمی از ژن‌ها در دسته‌هایی به نام **اپرون** دسته‌بندی شده‌اند. این‌ها محل ژن‌های مسئول رمزدهی پروتئین‌های یک مسیر متابولیکی یا زیرواحدهای یک آنزیم چندزیرواحدی هستند. برای نمونه اپرون Trp که در فصل ۴ بحث شد، آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز تریپتوفان را تولید می‌کند (شکل ۱۳-۴). به طور مشابه اپرون lac مسئول رمزدهی آنزیم‌هایی برای متابولیسم قند لاکتوز موجود در شیر است. از آنجائی که یک اپرون باکتریایی از یک ناحیه آغاز می‌شود و یک mRNA تولید می‌کند، ژن‌های موجود در یک اپرون به طور **همزمان** کنترل می‌شوند؛ درواقع همگی این ژن‌ها به یک اندازه فعال و یا مهار می‌شوند. رونویسی از روی یک اپرون و همین طور یک ژن جدا توسط رفتار متقابل بین RNA پلی‌مراز و پروتئین‌های خاصِ فعال‌گر و یا مهارکننده کنترل می‌شود. در E.coli برای آغاز رونویسی، RNA پلی‌مراز می‌بایست به یکی از اعضای خانوادهٔ کوچک عوامل سیگما (σ) متصل شود. رایج‌ترین عوامل سیگما در یوباکترها σ^{70} است. σ^{70} به RNA پلی‌مراز و توالی پروموتر DNA متصل می‌شود. σ^{70} ناحیهٔ خاصی را شناسایی و به آن متصل می‌شود که یک ناحیه ۶ جفت بازی در ۱۰- و یک ناحیه ۷ جفت بازی در ۳۵- نسبت به محل آغاز رونویسی (+۱) است. درواقع توالی‌های ۱۰- و ۳۵- پروموتر RNA پلی‌مراز همراه با σ^{70} را در E.coli می‌سازند (شکل ۱۰-۴). توالی‌هایی از پروموتر که به پلی‌مراز بواسطه σ^{70} متصل‌اند در ناحیه ۳۵- و ۱۰- قرار دارند. RNA پلی‌مراز از E.coli به نواحی پروموتری DNA از حدود ۵۰- تا تقریباً ۲۰+ از طریق میانکنش‌هایی که نسبت به توالی

1- Coactivator 2- Corepressor

DNA اختصاصی نیستند، متصل می‌شود.

σ^{70} به RNA پلی‌مراز برای باز کردن رشته‌های DNA در ناحیه آغاز رونویسی و همین طور داخل کردن رشته رمزدهنده به جایگاه فعال پلی‌مراز و آغاز رونویسی در ۱+ کمک می‌کند (شکل ۱۱-۴، مرحله ۲ را ملاحظه کنید). توالی بهینه برای پروموتر کمپلکس RNA پلی‌مراز σ^{70} که توالی محافظت شده پروموترهای قدرتمندی می‌باشد، این چنین است:

ناحیه ۱۰- ناحیه ۳۵-

TTGACAT.....15-17 bp..... TATAAT

اندازه حروف نشانگر اهمیت آن باز در این موقعیت است. این توالی رشته‌ای از DNA را نشان می‌دهد که در جهت ۳'→۵' قرار دارد، همان جهتی که بصورت RNA رونویسی می‌شود (در واقع این رشته غیرالگوست). RNA پلیمراز σ^{70} در ابتدا به DNA دورشته‌ای متصل می‌شود. بعد از اینکه پلیمراز چند ده باز اولیه را رونویسی کرد، σ^{70} رها می‌شود. لذا σ^{70} بعنوان یک عامل آغازی عمل می‌کند که برای آغاز رونویسی لازم است، ولی این عامل برای طویل‌سازی RNA یی که فرآیند آغاز را سپری کرده است، ضروری نیست.

آغاز رونویسی اپرون lac می‌تواند مهار و یا فعال شود

زمانی که E.coli در شرایط محیطی قرار گیرد که فاقد قند لاکتوز است، سنتز mRNA مربوط به اپرون lac سرکوب می‌شود، لذا سلول انرژی خود را صرف تولید آنزیم‌هایی نمی‌کند که تولیدشان برای سلول سودی ندارد. در شرایطی که باکتری E.coli در محیطی باشد که حاوی لاکتوز و گلوکز باشد، E.coli به طور ترجیحی گلوکز را متابولیزه می‌کند. تنها زمانی با سرعت زیاد لاکتوز وارد مسیرهای متابولیسمی می‌شود که لاکتوز در محیط به مقادیر زیاد وجود داشته باشد ولی محیط از گلوکز خالی شده باشد. این تنظیم متابولیکی از طریق سرکوب کردن رونویسی اپرون lac تا زمانی است که لاکتور در محیط وجود دارد و باعث سنتز mRNA تحت شرایط مختلف به وسیله مهارگر lac و پروتئین فعال‌گر کاتابولیتی[1] (CAP) یا همان CRP[2] (پروتئین گیرنده کاتابولیتی) که هر یک به توالی خاصی در ناحیه کنترل رونویسی ژن lac متصل می‌شوند، کنترل می‌شود (شکل ۲-۷).

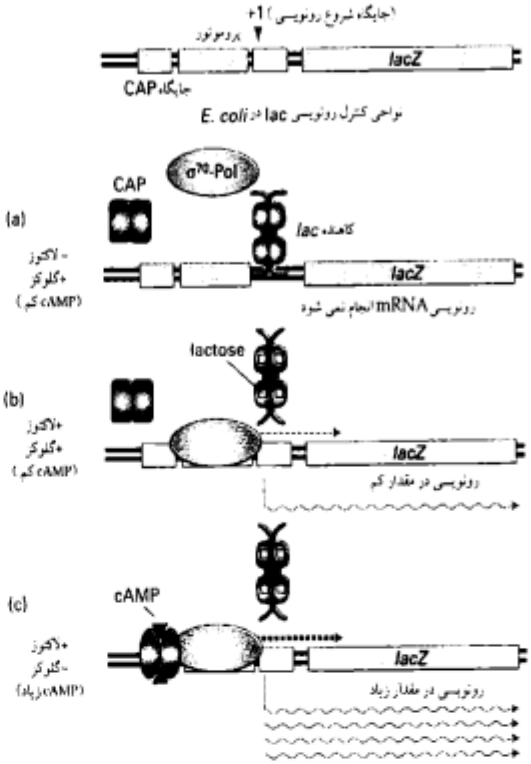
برای آنکه رونویسی اپرون lac آغاز شود، زیرواحد σ^{70} آنزیم RNA پلی‌مراز می‌بایست به پروموتر lac در نواحی ۳۵- و ۱۰- متصل شود. زمانی که لاکتوز در محیط نباشد، مهارگر lac به توالی خاصی به نام **اپراتور** lac متصل می‌شود. این توالی با ناحیه آغاز رونویسی همپوشانی دارد. بنابراین مهارگر lac با اتصال به اپراتور، اتصال و آغاز رونویسی RNA پلی‌مراز را مهار می‌کند (شکل ۲-۷). با ظهور لاکتوز در محیط، لاکتوز به نوعی خاصی از زیرواحدهای مهارگر lac که خود پروتئینی ۴ زیرواحدی است، متصل می‌شود و باعث ایجاد تغییرات کنفورماسیونی در پروتئین مذکور و باعث جدایی آن از توالی اپراتور می‌شود. درنتیجه پلی‌مراز می‌تواند به پروموتر متصل بشود و فرآیند رونویسی اپرون lac را آغاز کند. با این وجود زمانی که گلوکز هم در محیط وجود داشته باشد، سرعت فرآیند آغاز رونویسی (تعداد دفعات در دقیقه که آنزیم‌های مختلف رونویسی را آغاز می‌کنند) خیلی پایین است و درنتیجه مقدار کمی از mRNA و پروتئین‌های مربوط به اپرون lac تولید می‌شود. به این علت فراوانی آغاز رونویسی (در این شرایط) پایین است که توالی ۱۰- و ۳۵- پروموتر lac با توالی محل اتصال ایده‌آل برای σ^{70} تفاوت دارد.

به محض اینکه گلوکز محیط کم می‌شود و غلظت درون سلولی گلوکز پایین می‌آید، E.coli با تولید مولکول‌های AMP حلقوی (cAMP) به این تغییر پاسخ می‌دهد. با افزایش یافتن غلظت cAMP، این مولکول به جایگاه ویژه‌ای در هر یک از زیرواحدهای پروتئین CAP دیمر متصل می‌شود و با ایجاد تغییرات کنفورماسیونی در این پروتئین، باعث اتصال آن به ناحیه CAP در منطقه کنترل رونویسی ژن lac می‌شود. کمپلکس CAP توسط میانکنش با پلی‌مراز متصل به پروموتر، باعث افزایش چشمگیر سرعت آغاز رونویسی می‌شود. این فعالیت منجر به سنتز mRNA اپرون lac و بالطبع تولید پروتئین‌های اپرون lac به مقادیر زیاد می‌شود (شکل ۲-۷).

در واقع اپرون lac خیلی پیچیده‌تر از آنی است که در شکل ۲-۷ نشان داده شده است. مهارگر تترامری lac درواقع به طور همزمان به ۲ ناحیه متصل می‌شود، یکی به اپراتور اولیه ($lacO_1$) که با ناحیه‌ای که در آن DNA با RNA پلی‌مراز متصل می‌شود، همپوشانی دارد و دیگری با یکی از اپراتورهای ثانویه که در O_2 و ($lacO_2$) و ۸۲- ($lacO_3$) قرار دارند (شکل ۳-۷). مهارگر lac دیمری از مولکولی دیمر است. درواقع هر دیمر به یک اپراتور متصل می‌شود. اتصال همزمان مهارگر تترامری lac به اپراتور اولیه O_1 و یکی از اپراتورهای ثانویه به دلیل انعطاف پذیری DNA امکان‌پذیر است،

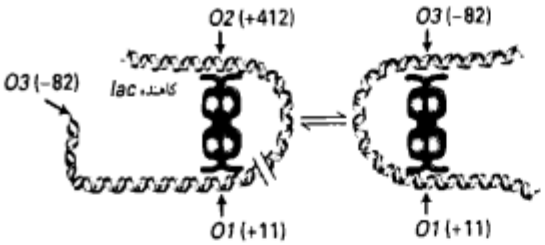
1- Catabolite activator protein

2- Catabolite receptor protein



▲ **شکل ۲-۷ تنظیم رونویسی از اپرون در E.coli.** (یالا) ناحیه کنترلی متشکل از صد جفت باز است که جایگاهی برای اتصال سه نوع پروتئین است: منطقه CAP که محل اتصال فعال‌کننده متابولیکی است، پروموتر lac که محل اتصال کمپلکس RNA پلی‌مراز - σ^{70} است و اپراتور lac که جایگاه اختصاصی اتصال مهارگر lac است. lacz اولین ژن اپرون lac است که در سمت راست نشان داده شده است. a) در شرایط فقدان لاکتور به دلیل اتصال مهارگر lac به منطقه خاص خود، باعث کاهش رونویسی اپرون lac می‌شود که از طریق مهار، فرایند آغاز صورت می‌گیرد. b) در حضور گلوکز و لاکتوز، لاکتوز با اتصال به مهارگر lac آن را از اپراتور جدا می‌کند و اجازه می‌دهد کمپلکس RNA پلی‌مراز - σ^{70} رونویسی را با سرعت کمی آغاز کند. c) حداکثر رونویسی از اپرون lac زمانی رخ می‌دهد که لاکتوز وجود داشته باشد و گلوکزی در محیط نباشد. در این شرایط در پاسخ به غلظت کم گلوکز، غلظت cAMP زیاد می‌شود و کمپلکس CAP-cAMP به منطقه CAP که در ناحیه کنترلی اپرون lac قرار دارد، متصل می‌شود و فرآیند آغاز رونویسی را تحریک می‌کند.

شبیه آنچه در پیچیدن DNA حول نوکلئوزوم‌های یوکاریوتی دیدیم (شکل ۲۹-۶). نقش این اپراتورهای ثانویه افزایش غلظت مهارگر به صورت موضعی حول ناحیه اپراتور اول، همان جایی که اتصال RNA پلی‌مراز مهار شده است، می‌باشد. از آنجا که تعادل فرآیند اتصال وابسته به غلظت مولکول‌های درگیر در فرایند اتصال است،



▲ **شکل ۳-۷ میانکنش مهارگر lac - اپراتور.** مهارگر تترامری lac به اپراتور اولیه O1 و یکی از اپراتور ثانویه O2 یا O3 به طور همزمان متصل می‌شود.

افزایش غلظت مهارگر lac در مجاورت O1 افزایش اتصال مهارگر به O1 را در پی دارد. تقریباً به ازای هر سلول E.coli ده مولکول تترامری مهارگر lac وجود دارد. به دلیل اتصال به O2 و O3 تقریباً همیشه یک مهارگر تترامری به O1 نزدیک‌تر است، در مقایسه با حالتی که این ده مولکول به صورت تصادفی در سلول پخش می‌شدند. در صورتی که O2 و O3 هر دو دچار جهش شوند، مهارگر lac دیگر توانایی اتصال به این توالی‌ها را از دست می‌دهد و تا ۷۰ برابر مهار پروموتر lac کاهش می‌یابد. در صورتی که تنها یکی از O2 یا O3 دچار جهش شود، فرایند مهار دو برابر کاهش می‌یابد. این امر حاکی از آن است که یکی از این دو ناحیه نقش تحریکی روی فرآیند مهار دارد. هرچند پروموترهای ژن‌های مختلف E.coli شباهت زیادی به هم دارند ولی توالی واقعی آن‌ها با هم فرق می‌کند. این توالی پروموتر است که در غیاب پروتئین‌های مهارگر و یا فعال‌کننده، سرعت آغاز رونویسی توسط کمپلکس RNA پلی‌مراز - σ^{70} را تعیین می‌کند. پروموترهایی که باعث میزان زیاد فرایند آغاز رونویسی می‌شوند توالی ۱۰- و ۳۵- مشابه با پروموتر ایده‌آل که قبلاً نشان دادیم، دارند. این دسته از پروموترها را **پروموترهای قوی** می‌گویند. آنهایی که با نرخ کم آغاز رونویسی را رهبری می‌کنند، با توالی ایده‌آل تفاوت دارند و آن‌ها را **پروموترهای ضعیف** می‌گویند. اپرون lac درواقع یک پروموتر ضعیف است. توالی این پروموتر که چندین جایگاه با پروموتر ایده‌آل تفاوت دارد، این کمبود سرعت آغاز رونویسی با حضور مهارگر lac باز هم بیشتر کم می‌شود و با فعال‌گر CAP-cAMP افزایش می‌یابد.

مولکول‌های کوچک از طریق مهارگرها و فعال‌کننده‌های متصل‌شونده به DNA بیان تعدادی از ژن‌های باکتریایی را کنترل می‌کنند

رونویسی اغلب ژن‌های E.coli توسط فرایندهایی شبیه به آنچه در مورد اپرون lac گفته شد، کنترل می‌شوند، هرچند که جزئیات

میانکنش برای هر پروموتر کمی با هم متفاوت است. مکانیسم کلی شامل اتصال یک مولکول مهارگر ویژه به ناحیه اپراتوری یک ژن یا اپرون است که آغاز رونویسی را مانع می‌شود. یک مولکول کوچک به مهارگر متصل می‌شود. از این طریق توانایی اتصال به DNA را در آن تنظیم می‌کند و درنتیجه سرعت رونویسی را متناسب با نیازهای سلول می‌کند. همانند آنچه در اپرون lac دیدیم، تعدادی از مناطق کنترلی رونویسی در یوباکترها دارای یک یا بیش از یک اپراتور ثانویه نیز هستند که در تنظیم مهار نقش دارند.

پروتئین‌های فعال‌کننده‌ای مانند CAP در اپرون lac، رونویسی دسته‌ای از ژن‌ها را که دارای محلی برای این پروتئین هستند نیز کنترل می‌کنند. مانند CAP، سایر مولکول‌های فعال‌کننده همراه با RNA پلی‌مراز به DNA متصل می‌شوند و رونویسی از ژن خاصی را تحریک می‌کنند. توانایی اتصال به DNAی مولکول‌های فعال‌کننده می‌تواند در پاسخ به نیازهای سلول تنظیم شود، این عمل از طریق اتصال مولکول‌های لیگاند کوچک (مانند cAMP) و یا فرایندهای پس‌ترجمه‌ای مانند فسفریلاسیون پروتئین که ساختمان فضایی پروتئین را تغییر می‌دهند، صورت می‌پذیرد.

آغاز رونویسی از برخی پروموترها نیازمند عوامل سیگمای متفاوتی است

اکثر پروموترهای E.coli با شکل رایجی از آنزیم RNA پلی‌مراز که در کمپلکس با σ^{70} است، رونویسی را آغاز می‌کنند. رونویسی دسته خاصی از ژن‌ها توسط RNA پلی‌مراز باکتری E.coli صورت می‌گیرد که به یکی از انواع دیگر عامل سیگما متصل است و توالی حفظ شده دیگری به غیر از آنچه σ^{70} شناسایی می‌کرد را شناسایی می‌کنند (جدول ۱-۷). این عوامل سیگمای متفاوت، برای رونویسی از دسته‌ای از ژن‌ها که مربوط به عملکرد مشابهی هستند، (مانند آنهایی که در پاسخ به شوک حرارتی یا فقر غذایی، تحرک و یا هاگزایی در یوباکترهای گرم مثبت)، دخالت دارند. در باکتری E.coli علاوه بر عامل سیگمای رایج که همان σ^{70} است، شش عامل سیگمای دیگر وجود دارد. ژنوم باکتری گرم مثبت هاگزای *Streptomyces coelicolor*، ۶۳ عامل سیگمای متفاوت را رمز می‌کند. این گزارش براساس بررسی بیش از صد ژنوم یوباکتریایی است که تاکنون انجام شده است. اکثر آن‌ها ساختار و عملی مشابه با σ^{70} دارند. اما یک دسته که با قبلی‌ها بی‌ارتباط است σ^{54} در *E.coli* است. آغاز رونویسی توسط RNA پلی‌مرازهایی که حاوی عوامل سیگمای شبیه σ^{70} هستند به وسیله اتصال مهارگرها و فعال‌کننده‌ها به نواحی مجاور محل اتصال پلی‌مراز صورت می‌گیرد و فرآیند آغاز توسط کمپلکس RNA پلی‌مراز - σ^{70} صورت می‌گیرد.

رونویسی توسط کمپلکس RNA پلی‌مراز - σ^{54} با فعال‌کننده‌هایی که به ناحیه‌ای در دوردست پروموتر متصل می‌شوند، کنترل می‌شود.

توالی یکی از عوامل سیگمای *E.coli*، (σ^{54}) خیلی با توالی سایر عوامل سیگمای شبیه σ^{70} متفاوت است. رونویسی ژن‌ها توسط RNA پلی‌مراز حاوی σ^{54} فقط از طریق اتصال فعال‌کننده‌هایی که محل اتصالشان بر روی DNA را **افزاینده**[1] گویند، تنظیم می‌شود. افزاینده‌ها (تشدیدکننده‌ها) عموماً ۱۶۰-۸۰ باز بالادست نقطه آغاز هستند. حتی زمانی که افزاینده بیش از یک کیلو باز از نقطه آغاز فاصله داشته باشد، فعال‌کننده‌های σ^{54} می‌توانند رونویسی را فعال کنند. بهترین مثال شناخته شدهٔ فعال‌کننده‌های σ^{54}، پروتئین NtrC (پروتئین تنظیمی نیتروژن) است که رونویسی ژن glnA را تحریک می‌کند. glnA آنزیم گلوتامین سنتتاز که اسید آمینه گلوتامین را از اسید گلوتامیک و آمونیاک می‌سازد، تولید می‌کند. RNA پلی‌مراز - σ^{54} به پروموتر glnA متصل می‌شوند ولی باعث جدایی دو رشته DNA از هم نمی‌شوند و رونویسی را آغاز نمی‌کنند تا این کمپلکس توسط پروتئین دیمر NtrC فعال شود. پروتئین NtrC از طریق پروتئین کینازی به نام NtrB تنظیم می‌شود. در پاسخ به میزان پایین گلوتامین در باکتری، NtrB پروتئین دیمر NtrC را فسفریله می‌کند و این پروتئین فسفریله به توالی افزاینده در بالادست پروموتر **glnA** متصل می‌شود. NtrC دیمر فسفریله متصل شده به افزاینده پلی‌مراز - σ^{54} را به منظور بازکردن DNA به پروموتر متصل می‌کند و آغاز رونویسی را تحریک می‌کند.

مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهند که NtrC فسفریله متصل به توالی افزاینده و پلی‌مراز - σ^{54} متصل به توالی پروموتری به طور مستقیم با هم میانکنش دارند و یک لوپ در DNA بین این دو جایگاه تشکیل می‌شود (شکل ۴-۷). همان طور که بعداً در همین فصل شرح می‌دهیم این مکانیسم فعال کردن رونویسی یادآور مکانیسم شایع فعال کردن رونویسی در یوکاریوت‌ها است.

1- enhancer

جدول ۱-۷: عوامل سیگما E.coli

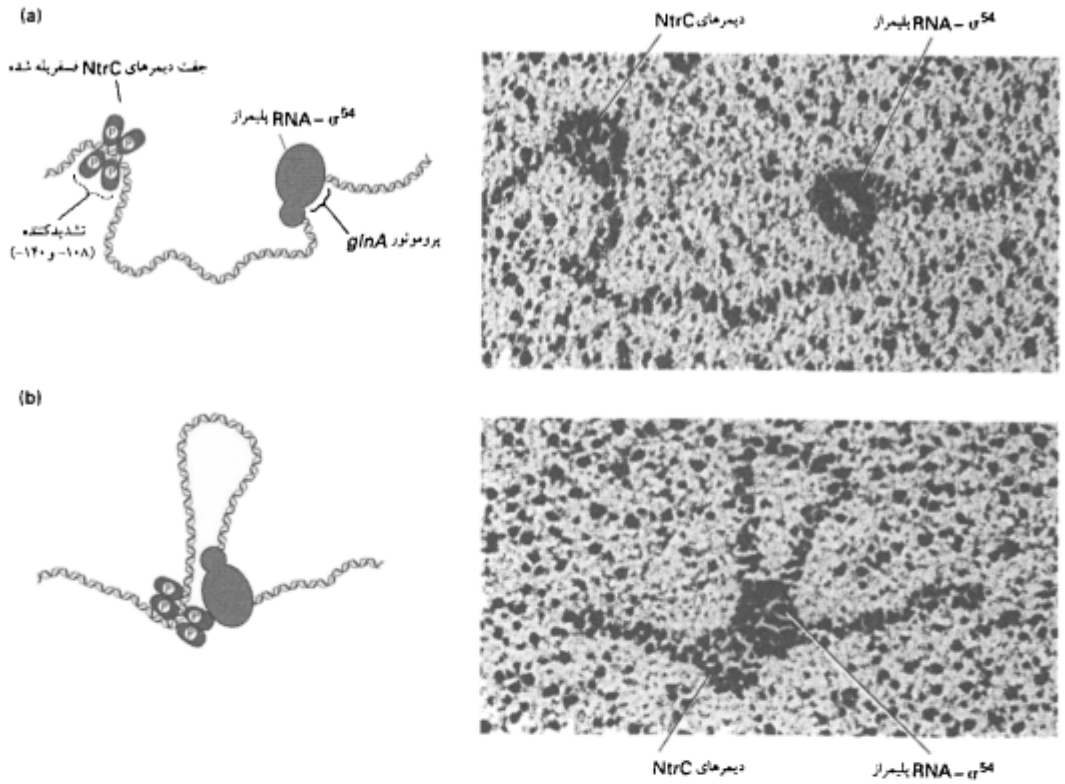
عامل پروتئینی سیگما	پروموتری که شناسایی می‌شود	پروموترمور توافق: ناحیه ۱۰-	پروموترمور توافق: ناحیه ۳۵-
σ^{70}	ژن‌هایی که برای سلول ضروری‌اند (خانه‌نگه‌دار) و اغلب ژن‌ها در سلول‌هایی که در فاز نهایی تکثیراند	TATAAT	TTGACA
σ^{5}	ژن مرحله سکون فاز سلولی و اغلب ژن‌های استرس‌های عمومی	TATAAT	TTGACA
σ^{32}	ژن‌هایی که با حضور پروتئین‌های دناتوره شده در سیتوزول فعال می‌شوند، ژن‌هایی که چاپرون‌های مسئول ترمیم پروتئین‌های تانخورده و همین طور سیستم پروتئازی که برای انهدام پروتئین‌های تانخورده سیتوزول آماده می‌شود، رمز می‌کنند.	CCCCATNTA	TCTCNCCCTTGAA GAACTT
σ^{E}	درنتیجه حضور پروتئین‌های دناتوره در فضای پری‌پلاسمی و غشاء سلولی بیان می‌شوند، ژن‌هایی که پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که یکپارچگی را به پوسته سلولی می‌دهند.	TCTGA	CTAAA TTGGAAA
σ^{F}	ژن‌های مربوط به تجمع تاژک	CCGATAT	
FecI	ژن‌های مربوط به جذب آهن FecI	GTAATG	
		ناحیه ۱۲-	ناحیه ۲۴-
σ^{54}	ژن‌های مربوط به متابولیسم نیتروژن و اعمال دیگر	TTGCA	CTGGNA

NtrC دارای فعالیت ATPaseی نیز هست و هیدرولیز ATP برای فعال کردن پلی‌مراز - σ^{54} متصل به پروموتر توسط NTrC فسفریله لازم است. شاهد این ادعا آن است که جهش یافته‌های حاوی NtrC که فاقد عمل ATPaseی هستند در تحریک پلی‌مراز - σ^{54} برای باز کردن دورشته‌ای DNA در نقطه آغاز دچار نقص هستند. چنین نتیجه‌گیری می‌شود که هیدرولیز ATP انرژی مورد نیاز برای باز کردن دورشتهٔ DNA را تأمین می‌کند. در مقابل پلی‌مراز - σ^{70} برای باز کردن دورشته‌ای DNA در نقطه آغاز نیازی به هیدرولیز ATP ندارد.

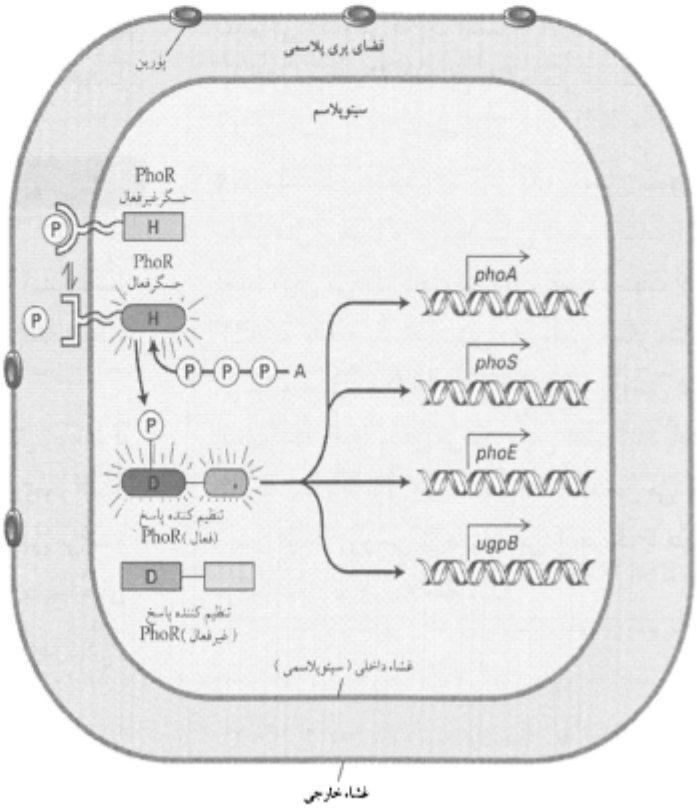
بسیاری از پاسخ‌های باکتریایی توسط سیستم‌های کنترلی دوجزیی کنترل می‌شوند

همانطور که دیدیم، کنترل بیان ژن glnA در E.coli به واسطه دو پروتئین NtrC و NtrB صورت می‌گیرد. چنین سیستم دوپروتئینی برخی از پاسخ‌های باکتری به تغییرات محیطی را کنترل می‌کنند. مثال دیگر مربوط به پروتئین‌های PhoR و PhoB است که رونویسی را در پاسخ به غلظت فسفات آزاد تنظیم می‌کنند. PhoR یک پروتئین گذرنده از غشاء است که در غشاءی داخلی باکتری قرار دارد. دُمین پری‌پلاسمی این پروتئین با اختصاصیت نه چندانی، به فسفات متصل می‌شود و دمین سیتوزولی آن عملکرد پروتئین کینازی دارد و PhoB یک پروتئین سیتوزولی است.

حفرات بزرگ پروتئینی موجود در غشاء خارجی E.coli به یون‌ها اجازه می‌دهد آزادانه بین محیط خارجی و فضای پری‌پلاسمی حرکت کنند. درنتیجه زمانی که غلظت فسفات محیط کم می‌شود، غلظت آن در فضای پری‌پلاسمی نیز کم می‌شود و باعث جدا شدن فسفات از دمین پری‌پلاسمی PhoR می‌شود (عکس ۵-۷). این تغییر باعث تغییرات کنفورماسیونی در دمین سیتوپلاسمی PhoR می‌شود و فعال شدن عملکرد پروتئین کینازی آن را در پی خواهد داشت. PhoR فعال شده در ابتدا فسفات گاما را از ATP به یکی از زنجیره‌های جانبی هیستیدین دمین کینازی خودش انتقال می‌دهد (خود فسفریلاسیون). با انتقال همان فسفات به یک آسپارتیک اسید خاص در PhoB، این پروتئین را از حالت غیرفعال به یک فعال‌کننده رونویسی فعال تبدیل می‌کند. شکل فسفریله و فعال PhoB باعث اتکاء بیان چندین ژن می‌شود که به سلول کمک می‌کنند با شرایط



▲ **شکل تجربی ۴-۷ تشکیل لوپ DNA اجازه میانکنش NtrC متصل شده و RNA پلی‌مراز - σ^{54} را می‌دهد.** a) طرح (چپ) و عکس میکروسکوپ الکترونی (راست) منطقه‌ای از DNA را نمایش می‌دهد که در یک انتها، دیمر NtrC به آن متصل است و در انتهای دیگر پلی‌مراز - σ^{54} متصل به پروموتر glnA. b) طرح (چپ) و عکس میکروسکوپ الکترونی (راست) اتصال NtrC به RNA پلی‌مراز - σ^{54} از طریق تشکیل لوپ در جداکنندهٔ این دو محل اتصال را نشان می‌دهد.



◀**شکل ۵-۷ سیستم کنترل دوتایی PhoB PhoR در E.coli.** در پاسخ به غلظت کم فسفات در محیط و فضای پری‌پلاسمی یک یون فسفات از دُمین پری‌پلاسمی PhoR غیرفعال جدا می‌شود. این امر باعث تغییر کنفورماسیونی می‌شود که دُمین انتقال‌دهنده پروتئین‌کیناز در ناحیه سیتوپلاسمی PhoR را فعال می‌سازد. دُمین انتقال‌دهنده فعال شده یک فسفات گاما را از ATP به یک هیستیدین حفظ شده در دُمین انتقال می‌دهد. سپس این فسفات به یک آسپارتیک اسید در دُمین دریافت‌کننده پروتئین تنظیم‌کننده پاسخ PhoB منتقل می‌شود. چندین PhoB می‌توانند توسط یک PhoR فعال فسفریله شوند. پروتئین PhoB فسفریله باعث فعال شدن رونویسی از ژن‌هایی می‌شود که مسئول رمز کردن پروتئین‌هایی‌اند که به سلول کمک می‌کنند که به غلظت کم فسفات پاسخ دهند. این ژن‌ها شامل، phoA، phoS، phoE و ugpB هستند.

کمبود فسفات مقاومت کنند.

تعدادی دیگر از پاسخ‌های باکتریایی توسط دو پروتئین که با PhoR و PhoB هومولوژی دارند، کنترل می‌شوند. در هر یک از این سیستم‌های تنظیمی، یک پروتئین که حسگر نام دارد حاوی دُمین انتقال‌دهنده[۱] مشابه با دُمین پروتئین کینازی PhoR است. انتقال‌دهنده پروتئین حسگر نیز توسط یک دُمین پروتئینی ثانویه (مانند دُمین پری‌پلاسمی PhoR) که تغییرات محیطی را حس می‌کند، کنترل می‌شود. پروتئین ثانویه که آن را تنظیم‌کننده پاسخ[۲] می‌گویند، حاوی دُمین دریافت‌کنندهٔ[۳] مشابه ناحیه‌ای از PhoB است که توسط PhoR فعال فسفریله می‌شود. دُمین دریافت‌کننده پروتئین تنظیم‌کننده پاسخ، مرتبط با دُمین ثانویه‌ای است که عملکرد این پروتئین را تعیین می‌کند. فعالیت این دُمین ثانویه عملکردی توسط فسفریلاسیون دُمین دریافت‌کننده تنظیم می‌شود. هرچند که همه دُمین‌های انتقال‌دهنده (همین طور دُمین‌های دریافت‌کننده) به هم شبیه هستند، دُمین انتقال‌دهنده هر حسگر ویژه تنها دُمین دریافت‌کننده یک تنظیم‌کننده پاسخ خاص را فسفریله می‌کنند و باعث می‌شوند که پاسخ خاصی به تغییرات مختلف محیطی داده شود. یادآور می‌شویم که NtrB و NtrC که در بالا بحث شد، به ترتیب به صورت پروتئین‌های حسگر و تنظیم‌کننده پاسخ عمل می‌کنند، این دو در یک سیستم دوجزیی تنظیمی عمل می‌کنند که بیان ژن glnA را کنترل می‌کنند. سیستم‌های دوتایی تنظیمی هیستیدیل - آسپارتیل فسفریله مشابهی در گیاهان نیز وجود دارد.

نکات کلیدی بخش ۱-۷

کنترل رونویسی ژن در باکتریها

- بیان ژن در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها در ابتدا توسط مکانیسم‌هایی که آغاز رونویسی را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌شود.
- اولین مرحله در آغاز رونویسی در E.coli اتصال زیرواحد σ کمپلکس شده با یک RNA پلی مراز به یک پروموتر است.
- توالی نوکلئوتیدی یک پروموتر طول آن را تعیین می‌کند و تعیین می‌کند چه تعداد مولکولهای RNA پلیمرازهای مختلف می‌توانند به پروموتر متصل شده و رونویسی را بر هر دقیقه شروع کنند.
- مهارگرها پروتئین‌هایی هستند که به توالی‌های اپراتور که با پروموتر همپوشانی دارد و یا نزدیک آن قرار می‌گیرند متصل می‌شوند. اتصال مهارگر به یک اپراتور آغاز رونویسی را مهار می‌کند.
- فعالیت اتصال به DNA ی بیشتر مهارگرهای باکتریایی توسط‌های مولکولهای لیگاند کوچک تنظیم می‌شود. این امر به سلول‌های باکتریایی اجازه می‌دهد تا رونویسی ژن‌های خاصی را در پاسخ به تغییر غلظت مواد غذایی مختلف در محیط و متابولیت در سیتوپلاسم تنظیم کنند.
- اپرون lac و برخی ژن‌های باکتریایی دیگر نیز توسط پروتئین‌های فعال‌کننده تنظیم می‌شود که به نزدیکی پروموترها متصل شده و سرعت آغاز رونویسی را توسط RNA پلیمراز افزایش می‌دهند.
- عامل سیگمای عمده در E.coli σ^{70} است ولی چندین عامل سیگمای با مقدار کمتر نیز بافت شده‌اند که هر کدام توالی‌های پرموتری مورد توافق متفاوتی را شناسایی می‌کنند.
- آغاز رونویسی توسط RNA پلیمرازهای E.coli به جزء آنهایی که دارای σ^{54} هستند می‌تواند توسط مهارگرها و فعالسازهایی تنظیم شود که به نزدیکی جایگاه شروع متصل می‌شوند.
- ژن‌هایی که توسط RNA پلیمراز σ^{54} رونویسی می‌شوند توسط فعالسازهایی که به افزاینده‌هایی متصل می‌شوند که حدود ۱۰۰ جفت باز در بالادست جایگاه شروع قرار گرفته‌اند تنظیم می‌شود. وقتی که یک فعالساز و RNA پلیمراز- σ^{54} میانکنش می‌دهند، DNA بین جایگاه اتصال آنها تشکیل حلقه را می‌دهد (شکل ۴-۷ را ملاحظه کنید).
- در سیستم‌های تنظیمی دو جزئی یک پروتئین بصورت حسگر عمل می‌کند و میزان مواد غذایی یا سایر ترکیبات را در محیط آگهی می‌دهد. تحت شرایط مناسب فسفات γ از ATP در ابتدا به یک هیستیدین در پروتئین حسگر منتقل می‌شود و سپس به یک آسپارتیک اسید در پروتئین دوم (تنظیم‌کننده پاسخ) منتقل می‌شود. سپس تنظیم‌کننده پاسخ فسفریله شده و به توالی‌های تنظیمی DNA متصل می‌شود و بدین ترتیب رونویسی ژن‌های خاصی را تحریک یا مهار می‌کند (شکل ۵-۷ را ملاحظه کنید).

1- Transmitter
2- Response regulator
3- Receiver domain

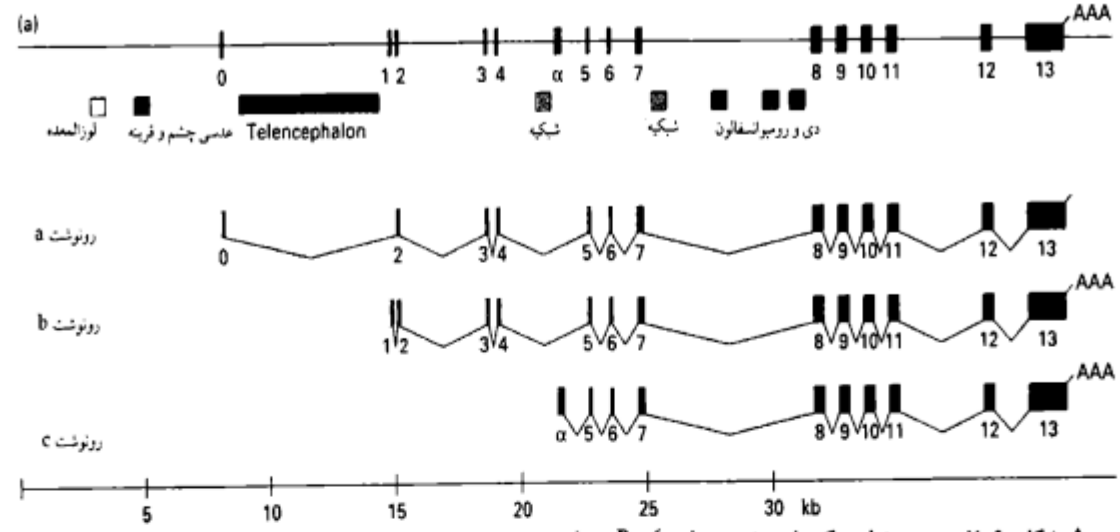
۷-۲ مروری بر کنترل ژن یوکاریوتی و RNA پلی‌مرازهای آن

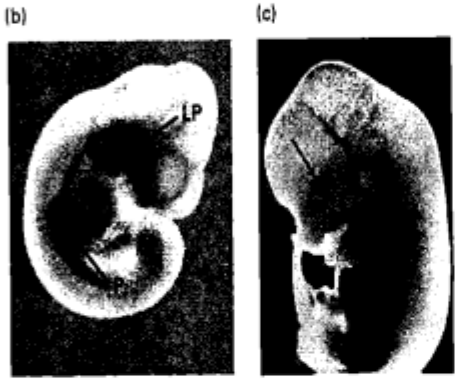
در باکتری‌ها کنترل ژن اساساً به سلول اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی تطابق پیدا کند و رشد و تکثیرش در بهترین حالت باشد. در موجودات پرسلولی، تغییرات محیطی نیز در بیان ژن تغییراتی ایجاد می‌کنند. یک مثال از این دست ژن‌هایی هستند که در پاسخ به شرایط کمبود اکسیژن (هیپوکسی) القا می‌شوند و به سلول کمک می‌کنند در شرایط هیپوکسیک زنده بماند. محصول این ژن‌ها شامل پروتئین‌هایی‌اند که جز عوامل رگ‌زایی ترشحی‌اند که باعث تحریک و نفوذ مویرگ‌های جدید به بافت‌های مجاور می‌شود. با این حال شاخص‌ترین هدف نهایی بیولوژیکی کنترل بیان ژن در موجودات پرسلولی، اجرای برنامه ژنتیکی است که طی آن رشد مراحل جنینی صورت می‌گیرد. تولید انواع سلول‌های مختلف که همگی با هم یک موجود پرسلولی را می‌سازند، به فعال شدن صحیح ژن‌ها در سلول‌های مناسب و در زمان خاص در روند رشد بستگی دارد. در اغلب موارد زمانی که یک مرحله تکاملی توسط یک سلول طی می‌شود برگشت‌پذیر نخواهد بود. در نتیجه، این نوع تصمیم‌گیری اصولاً با فعال شدن و خاموش شدن ژن‌های باکتریایی به تغییرات محیطی متفاوت است. در اجرایی شدن فرمان‌های ژنتیکی سلول‌های تمایزیافته (مانند سلول‌های پوست، سلول‌های قرمز خون و سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی) به سمتی حرکت می‌کنند که در انتها سلول خواهد مرد و نسلی باقی نخواهد گذاشت. الگوی ثابت کنترل بیان ژن باعث ایجاد تمایزی می‌شود که نیازهای کل موجود زنده و نه بقای یک سلول واحد را تأمین می‌کند. علی‌رغم تفاوت در هدف کنترل بیان ژن در باکتریها و یوکاریوت‌ها، دو جنبه کلیدی کنترل رونویسی که اولین بار در باکتری‌ها شناخته شد و در بخش قبلی شرح داده شد، در سلول‌های یوکاریوت هم اجرا می‌شود. اول، توالی‌های تنظیمی DNA متصل‌شونده به پروتئین همراه ژن‌ها دیده می‌شود. دوم، پروتئین‌های ویژه‌ای که به توالی‌های تنظیمی ژن متصل می‌شوند تعیین‌کنندهٔ این هستند که کجا رونویسی آغاز خواهد شد و یا فعال یا خاموش بشود. همانطور که در شکل ۱-۷ نشان داده شد، در یوکاریوت‌های پرسلولی ژن‌های غیرفعال در کروماتین متراکم جمع می‌شوند که این امر اتصال RNA پلی‌مرازها و عوامل عمومی رونویسی لازم برای آغاز رونویسی را مهار می‌کند. فعال‌کننده‌ها پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به عناصر تنظیمی نزدیک جایگاه آغاز رونویسی ژن، همین طور با فاصله چندین کیلوبازی از آن باعث باز شدن کروماتین و اتصال RNA پلی‌مراز به پروموتر می‌شوند. پروتئین‌های مهارگر به عناصر کنترلی دیگری متصل می‌شوند و باعث متراکم شدن کروماتین و مهار اتصال پلی‌مراز می‌شوند. در این بخش ما در مورد قوانین کلی کنترل بیان ژن یوکاریوتی بحث می‌کنیم و به شباهت‌ها و تفاوت‌های میان سیستم یوکاریوتی و پروکاریوتی می‌پردازیم. بخش‌های بعدی این فصل جنبه‌های خاص رونویسی یوکاریوت‌ها را با جزئیات بیشتر تشریح می‌کنند.

عناصر تنظیمی موجود در DNA ی یوکاریوت‌ها در مجاورت هم در چندین کیلوبازی ناحیه آغاز رونویسی یافت می‌شوند

سنجش‌های مستقیم سرعت رونویسی ژن‌های مختلف در سلول‌های مختلف نشان داده است که تنظیم فرایند آغاز رونویسی شایع‌ترین روند تنظیمی در بیان ژن موجودات یوکاریوت، همانند باکتری‌ها است. در یوکاریوت‌ها مانند باکتری‌ها به توالی خاصی از DNA که مختص اتصال RNA پلی‌مراز است و رونویسی ژن از آنجا آغاز می‌شود پروموتر گویند. رونویسی از یک پروموتر خاص توسط پروتئین‌های متصل شونده به DNA که عملکردی معادل مهارگر فعال‌کننده باکتریایی دارند، تنظیم می‌شود. از آنجا که پروتئین‌های تنظیم‌کننده رونویسی اغلب می‌توانند رونویسی را در همراهی با پروتئین‌های دیگری فعال یا مهارکنند، لذا به آنها به صورت عمومی، عوامل رونویسی گویند. توالی‌های کنترلی DNA که عوامل رونویسی به آن‌ها متصل می‌شوند اغلب در یوکاریوت‌ها از پروموتری که آن‌ها تنظیم می‌کنند برخلاف ژنوم پروکاریوتی فاصله زیادی دارند. در برخی از موارد عوامل رونویسی که بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین را در یوکاریوت‌های عالی کنترل می‌کنند به نواحی تنظیمی که چند ده هزار جفت باز **بالادست** (مخالف با جهت رونویسی) و یا **پایین دست** (هم جهت با رونویسی) پروموتر قرار دارند متصل می‌شوند. به واسطه حضور چنین آرایشی، رونویسی از یک ژن ممکن است با اتصال چندین عامل رونویسی به نواحی تنظیمی مختلفی کنترل شود و عامل بیان ژن مشابهی در سلول‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت و در طی رشد موجود باشد.

به عنوان مثال چندین توالی تنظیم‌کننده رونویسی DNA در پستانداران وجود دارد که بیان عامل رونویسی Pax6 را کنترل می‌کنند. پروتئین Pax6 برای تکوین چشم، نواحی خاصی از مغز و نخاع و سلول‌هایی از پانکراس که هورمون‌هایی چون انسولین را می‌سازند، لازم است. انسان‌های هتروزیگوتی که فقط یک کپی فعال از ژن Pax6 را دارند، با نقص مادرزادی *aniridia* که فقدان عنبیه در

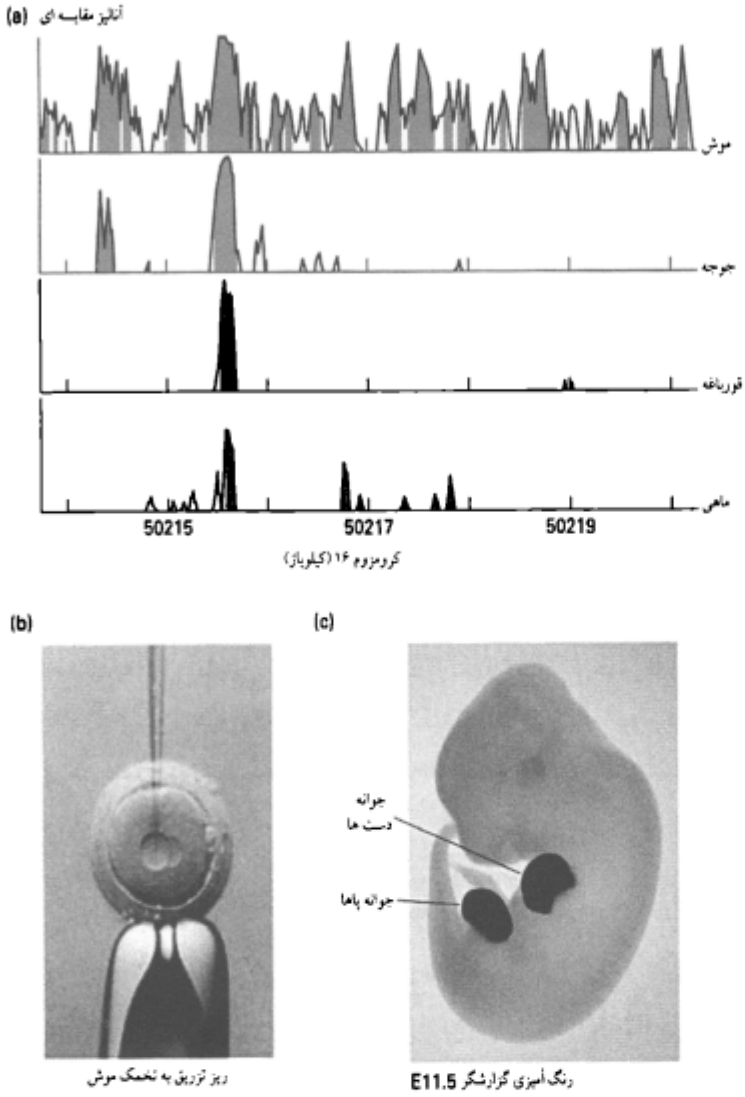




▲ **شکل ۶-۷ بررسی نواحی کنترل رونویسی ژن Pax6 موش در موش‌های ترانس ژن.** (a) سه پروموتر مختلف Pax6 برای بیان این ژن در زمان‌های مختلف در طی دوران جنینی و در بافت‌های خاص متفاوتی به کار می‌رود. نواحی تنظیم‌کننده رونویسی ژن Pax6 در بافت‌های مختلف توسط چهارگوش‌های رنگی نمایش داده شده‌اند. ناحیهٔ تنظیمی تلنسفال در اینترون این اگزون‌های صفر و یک با تفکیک بالایی مکان‌یابی نشده است. سایر نواحی تنظیمی نشان داده شده طولی معادل ۵۰۰-۲۰۰ جفت باز دارند. (b) بیان بتاگالاکتوزیداز در بافت‌هایی از جنین موش حامل گزارشگر بتاگالاکتوزیداز را ۱۰/۵ روز پس از لقاح نشان می‌دهد. ژنوم این موش حاوی ۸ کیلوباز از بالادست اگزون صفر ادغام شده با بخش رمزدهنده ژن بتاگالاکتوزیداز است. لکه عدسی (LP) بافتی است که در آینده به عدسی چشم تکوین خواهد یافت. بیان ژن در ناحیه‌ای که پانکراس (P) را خواهد ساخت نیز مشاهده می‌شود. (c) بیان بتاگالاکتوزیدازی که تحت کنترل نواحی میان اگزون ۴ و ۵ شکل a که با علامت شبکیه است در روز ۱۳/۵ جنینی را نشان می‌دهد. پیکان جهت جانبی - پیش سری شبکیه تکوین‌یافته را نشان می‌دهد. نواحی تنظیمی از Pax6 در ۱۷ کیلوبازی پایین دست اگزون 3′ در اینترون ژن مجاورش شناسایی شده است.

چشم است، به دنیا می‌آیند (شکل ۲۶-۱). ژن *Pax6* حداقل از سه پروموتر متفاوت که در سلول‌های متفاوت و در زمان‌های مختلفی در طی دوران جنینی فعال می‌شوند، بیان می‌شود (شکل ۶a-۷). زمانی که موش ترانس ژنتیکی که **ژن گزارشگر** بتاگالاکتوزیداز در هشت کیلوبازی اگزون ژن *Pax6* آن ادغام شده را بررسی کنیم، فعالیت بتاگالاکتوزیدی را در رشد عدسی، شبکیه و پانکراس جنین در اواسط دوران جنینی مشاهده می‌کنیم (شکل ۶b-۷). بررسی موش ترانس ژنیکی با قطعات کوچک‌تری از DNAی این ناحیه، اجازه نقشه‌برداری از نواحی تنظیم‌گر رونویسی مجزایی که رونویسی را در پانکراس و شبکیه و عدسی کنترل می‌کنند، را داد. موش‌های ترانس ژنیک که حامل ژن‌های گزارشگر دیگری بودند، نواحی کنترل‌کننده رونویسی دیگری را آشکار کردند (شکل ۶a-۷). این وضعیت کنترل رونویسی را در رشد شبکیه (مناطق مختلفی از مغز و آنسفالین) بر عهده دارند. برخی از این نواحی تنظیم‌کننده رونویسی در نواحی اینترونی بین اگزون ۴ و ۵ و بین اگزون ۷ و ۸ قرار دارند. به عنوان مثال، ژن گزارشگری که تحت کنترل ناحیه‌ای با شبکیه نشاندار در شکل ۶-۷ است باعث بیان ژن گزارشگر به طور ویژه در شبکیه می‌شود (شکل ۶c-۷).

نواحی کنترلی ژن‌های متعددی پیدا شده است که چند صدکیلو باز از اگزون‌های رمزکننده ژن فاصله دارند. یکی از روش‌های شناسایی چنین نواحی کنترلی دوردستی، مقایسه توالی‌های موجودات هم‌خانواده‌ای است که از هم فاصله فامیلی دوری دارند.

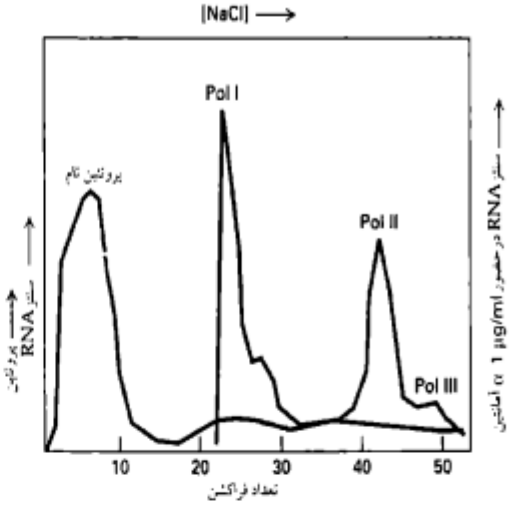


◀ شکل ۷-۷ افزایندهٔ ژن SALL1 انسانی بیان ژن گزارشگر را در جوانه عضوی موش در حال رشد فعال می‌کند. (a) این شکل نواحی حفظ شده DNA ژنومی انسانی (از ۵۰۲۱۴ - ۵۰۲۲۰/۵ کیلوبازی کروموزوم ۱۶) که معادل ۵۰۰ کیلوباز بالادست ژن رمزکنندهٔ مهارگر رونویسی SALL1 که از نوع انگشت - روی است را نشان می‌دهد. یک ناحیه ۵۰۰ جفت بازی از بخش غیر رمزکننده از ماهی‌ها تا انسان حفظ شده است. ۹۰۰ جفت باز شامل این ناحیه حفاظت شده، در یک پلاسمید پس از ناحیه رمزکننده بتاگالاکتوزیداز وارد شد. (b) پلاسمید حاصله را به پیش هسته یک تخم لقاح یافته موش به روش ریزتزریقی وارد کرده و این تخم در رحم یک موش قرار داده می‌شود تا یک جنین موش ترانس ژن با یک ژن گزارشگر حاصل شود. (c) بعد از ۱۱/۵ روز زمانی که جوانه‌های اعضاء رشد کردند، جنین تثبیت و نفوذپذیر شده در معرض سوبسترای X-gal قرار می‌گیرد که توسط بتاگالاکتوزیداز به یک مادهٔ نامحلول به شدت آبی تبدیل می‌شود. ناحیه ۹۰۰ جفت بازی DNA انسانی حاوی یک افزاینده است که باعث رونویسی شدید بتاگالاکتوزیداز در جوانه‌های اعضاء می‌شود.

نواحی تنظیم‌کننده رونویسی یک ژن حفظ شده اغلب حفظ می‌شود و در طی تکامل به راحتی در میان پس زمینه توالی‌های غیرعملکردی که در طی تکامل منشعب شده‌اند قابل شناسایی هستند. برای مثال یک توالی ۵۰۰ کیلوبازی در DNA انسان وجود دارد که در پایین دست ژن SALL1 وجود دارد و به شدت در موش، قورباغه و ماهی محافظت شده است (شکل ۷-۷a). این ژن مسئول رمز کردن مهارکننده رونویسی موردنیاز برای تکوین طبیعی روده تحتانی، کلیه‌ها، دست و پا و گوش‌ها می‌باشد. زمانی که موش ترانس ژنی که دارای این توالی DNAیی محافظت شده متصل با ژن گزارشگر بتاگالاکتوزیداز، ایجاد شدند (شکل ۷-۷b)، به میزان زیادی ژن گزارشگر بتاگالاکتوزیداز را بطور ویژه در مرحله تکوین جوانه‌های اعضاء بیان کردند (شکل ۷-۷c). افراد بیماری که در این ناحیه از ژنوم دارای حذف ژنتیکی هستند، ناهنجاری‌هایی در اعضاء خود دارند. این نتایج نشان می‌دهند که این نواحی حفظ شده عامل رونویسی از ژن SALL1 در طی رشد دست و پا هستند. شاید افزاینده‌های دیگری بیان این ژن را در مناطق دیگری که به طور طبیعی در رشد رودهٔ تحتانی و کلیه‌ها و گوش‌ها دخالت دارد، کنترل می‌کنند.

سه نوع پلی‌مراز یوکاریوتی تولید RNA های مختلف را به عهده دارند

هسته همه یوکاریوت‌هایی که تاکنون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (مهره‌داران، مگس سرکه، مخمر و سلول‌های گیاهی) حاوی سه نوع متفاوت RNA پلی‌مراز بنام‌های I و II و III می‌باشند. این آنزیم‌ها در خلال کروماتوگرافی تعویض یونی در غلظت‌های متفاوتی از نمک از ستون خارج می‌شوند که این حاکی از تفاوت در بار کلی هر یک از این آنزیم‌ها است. سه نوع پلی‌مراز در حساسیت‌شان نسبت به α - آمانیتین که یک ترکیب سمی هشت پپتیدی حلقوی تولید شده توسط برخی قارچ‌ها است، نیز با هم تفاوت دارند (شکل ۸-۷).



▲ **شکل ۸-۷ (شکل رنگی) جداسازی RNA پلی‌مرازهای یوکاریوتی توسط کروماتوگرافی ستونی و شناسایی آن‌ها با حساسیتشان به آلفا - آمانیتین.** عصاره پروتئینی استخراج شده از کشت سلول‌های یوکاریوتی از ستون DEAE - سفادکس عبور داده شد و پروتئین‌های متصل شده (منحنی سیاه) با محلولی از NaCl که غلظت آن به طور ثابت در افزایش است جدا شده‌اند. سه بخش از نمونه‌های جدا شده از ستون فعالیت RNA پلی‌مرازی از خودشان دارند (منحنی قرمز) غلظت ۱μg/ml از آلفا - آمانیتین فعالیت پلی‌مرازی نوع II را و نه هیچ یک از پلی‌مراز I و II را مهار می‌کند (بخش سبز). پلی‌مراز III با غلظت ۱۰μg/ml از α - آمانیتین مهار می‌شود در حالی که پلی‌مراز I حتی در این غلظت بالا متأثر نمی‌شود.

RNA پلی‌مراز I نسبت به آلفا - آمانیتین خیلی غیرحساس است در حالی که RNA پلی‌مراز II خیلی حساس است، دارو به نزدیکی جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود و جابجایی آنزیم را روی DNAی الگو مهار می‌کند. RNA پلی‌مراز III حساسیت متوسطی دارد. هر یک از RNA پلی‌مرازهای یوکاریوتی فرایند رونویسی ژن‌هایی را کاتالیز می‌کند که رمزکننده انواع مختلفی از RNA ها هستند (جدول ۲-۷).

RNA پلی‌مراز I که در هستک قرار دارد، رونویسی ژن‌هایی را به عهده دارد که رمزکنندهٔ پیش‌سازهای rRNA، (pre-rRNA) هستند. pre-rRNA با پردازش به 28S، 5.8S و 18S rRNA تبدیل می‌شود. RNA پلی‌مراز III رونویسی ژن‌های رمزکنندهٔ tRNA ها، 5S rRNA و مجموعه‌ای از RNA های پایدار و کوچک را که یکی از آن‌ها در پیرایش[1] RNA (U6) دخالت دارد همچنین جزء RNA یی ذره شناسایی کنندهٔ پیام پپتیدی[2] (SRP) که در هدایت پروتئین تازه سنتز شده به شبکهٔ آندوپلاسمی خشن نقش دارد (فصل ۱۳)، به عهده دارد. RNA پلی‌مراز II همهٔ ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین را رونویسی می‌کند و عمل این آنزیم باعث تولید mRNA می‌شود. RNA پلی‌مراز II همچنین مسئول تولید چهار تا از پنج RNAی کوچک هسته‌ای نیز هست که در پیرایش RNA دخالت دارند.

هر یک از سه نوع RNA پلی‌مراز یوکاریوتی خیلی پیچیده‌تر از RNA پلی‌مراز *E.coli* هستند هرچند که ساختارشان شباهت‌هایی دارد (شکل ۹-۷). همهٔ این سه نوع آنزیم حاوی دو زیرواحد بزرگ و ۱۴-۱۰ زیرواحد کوچک‌اند که برخی از آنها بین دو و یا همهٔ سه نوع پلی‌مراز مشترک‌اند. شناخته شده‌ترین RNA پلی‌مراز یوکاریوتی، مربوط به ساکارومایسس سرویزیه است. هر یک از ژن‌های رمزکننده زیرواحدهای پلی‌مراز این مخمر کلون و تعیین توالی شده‌اند و آثار جهش‌های تخریب‌کننده ژن[3]، نیز در آن‌ها بررسی شده است. علاوه بر اینکه ساختار سه بعدی RNA پلی‌مراز II مخمر تعیین شده است (شکل ۹-۷) سه RNA پلی‌مراز هسته‌ای همه یوکاریوت‌هایی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته، به گونه مخمری خیلی شبیه است.

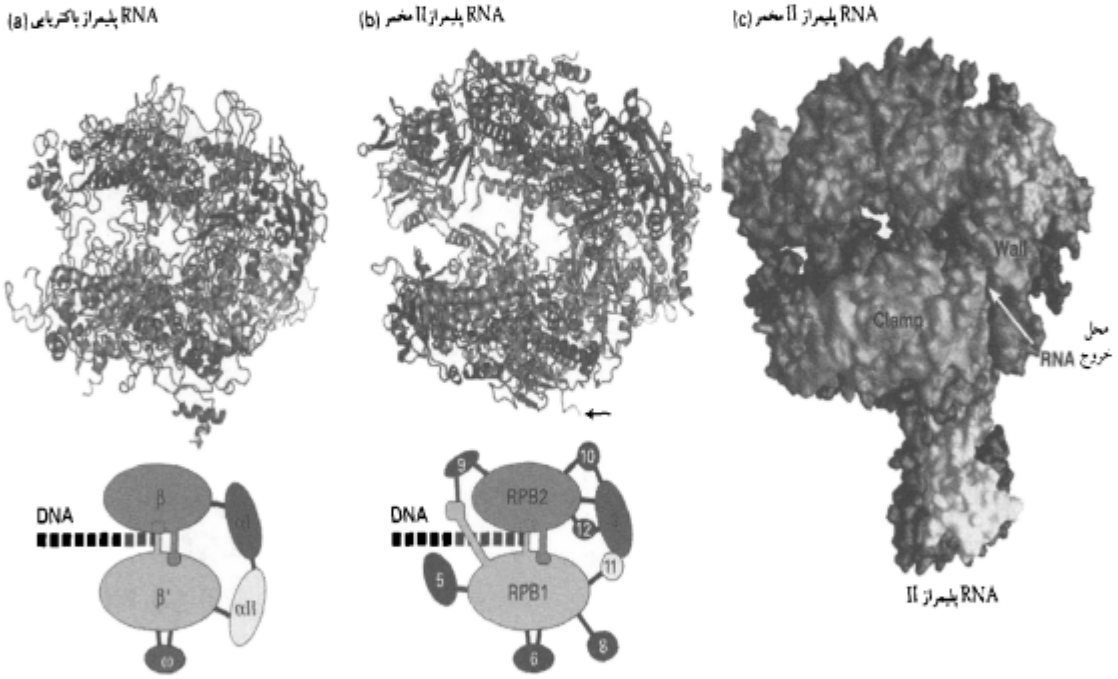
دو زیرواحد بزرگ (RPB2 و RPB1) همهٔ سه نوع RNA پلی‌مراز یوکاریوتی به همدیگر شبیه‌اند و با زیرواحدهای β و β' RNA پلی‌مراز *E.coli* شباهت دارند (شکل ۱۰-۷). همچنین هر یک از پلی‌مرازهای یوکاریوتی حاوی یک زیرواحد شبه ω و دو زیرواحد نامتشابه شبه α هستند. شباهت زیادی که در ساختار این زیرواحدهای هستهٔ RNA پلی‌مرازهای گونه‌های مختلف وجود دارد حاکی از آن است که این آنزیم در مراحل اولیهٔ تکامل ظاهر شده و به شدت حفاظت شده است. این نتیجه‌گیری برای آنزیمی که فرایند پایه‌ای چون نسخه‌برداری RNA از DNA را به عهده دارد، منطقی به نظر می‌رسد.

علاوه بر زیرواحدهای مرکزی مرتبط با زیرواحدهای RNA پلی‌مراز *E.coli*، همه سه نوع RNA پلیمراز مخمری حاوی چهار زیرواحد کوچک دیگری هستند که بین خودشان مشترک است ولی در RNA پلی‌مراز *E.coli* همتایی ندارند. در نهایت هر یک از RNA پلی‌مرازهای هسته‌ای یوکاریوت‌ها دارای چندین زیرواحد اختصاصی است که در دو نوع دیگر RNA پلی‌مراز هسته‌ای دیده نمی‌شود. آزمایشات تخریب ژنی در مخمر نشان داده‌اند که اغلب این

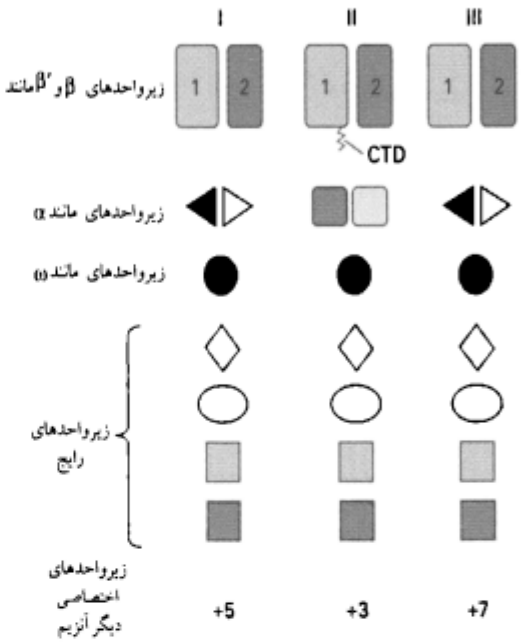
1- Splicing
2- Signal - recognition particle (SRP)
3- Gene - knockout

جدول ۲-۷: دسته‌های RNA رونویسی شده توسط سه پلیمراز هسته‌ای یوکاریوتی و اعمال آنها

پلیمراز	RNA رونویسی شده	عملکرد RNA
RNA پلیمراز I	Pre r-RNA (۲۸S, ۱۸S, ۵/۸S rRNAs)	محتویات ریبوزومی، سنتز پروتئین
RNA پلیمراز II	mRNA	رمز کردن پروتئین
	snRNAs	پیرایش RNA
	miRNAs	کنترل پس از ترجمه ژن
RNA پلیمراز III	tRNAs	سنتز پروتئین
	۵S rRNAs	محتویات ریبوزومی، سنتز پروتئین
	sn RNA ub	پیرایش RNA
	۷s RNA	ذرهٔ شناسایی پیام برای دخول پلی پپتیدها به شبکهٔ آندوپلاسمی
	سایر RNA های کوتاه پایدار	عملکردهای ویژه، اکثر موارد ناشناخته

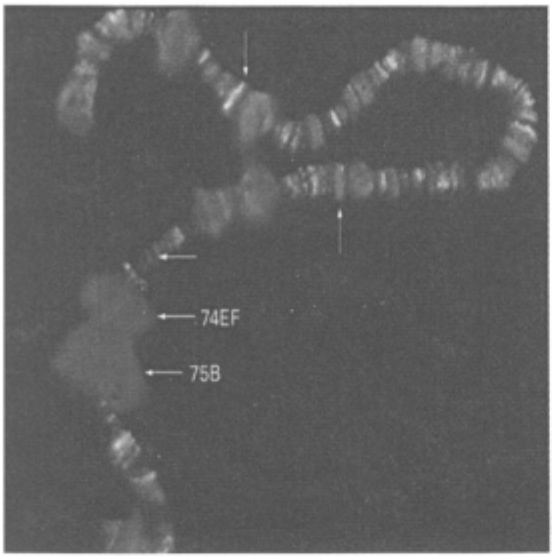


▲ **شکل ۹-۷ (شکل رنگی) مقایسه ساختار سه بعدی RNA پلی‌مرازهای یوکاریوتی و باکتریایی.** a و b) مقایسه‌ای از شکل حضور کربن‌های α پروتئین‌های RNA پلی‌مراز باکتری T.aquaticus و RNA پلی‌مراز II مخمری بر مبنای داده‌های کریستالوگرافی اشعه x. (a) ۵ زیرواحد آنزیم باکتریایی با رنگ مجزا نشان داده شده‌اند. تنها دُمین انتهای N از زیرواحد α در این مدل ارایه شده است. (b) ۱۰ تا ۱۲ زیرواحد تشکیل‌دهندهٔ RNA پلی‌مراز II مخمر در این مدل نشان داده شده است. زیرواحدهای با ساختمان فضایی مشابه نوع باکتریایی با رنگ‌های مشابه نشان داده می‌شوند. دُمین انتهای C زیرواحد بزرگ RPB1 در ساختار کریستالی مشاهده نشده است. اما معلوم شده است که از ناحیه نشان داده شده با پیکان قرمز امتداد پیدا می‌کند. (RPB خلاصه RNA polymerase B است که راه دیگری برای نشان دادن به RNA polymaale II است)، (c) مدل فضاپرکن RNA پلی‌مراز مخمر که شامل زیرواحدهای ۴ و ۷ است. این زیرواحدها از هسته آنزیم که در شکل b نشان داده شده است در نواحی مجاور (CTD) زیرواحد بزرگ امتداد می‌یابند. Clamp دُمینی از RPB1 است که حول یک لولا زمانی که RNA در کانال خروج است می‌چرخد و تا DNA ناحیه بالادست را می‌پوشاند، در نتیجه پلی‌مراز قادر به رها کردن الگو تا مادامی که رونویسی نیابد، نیست. Wall دُمینی از RPB2 است که به DNA که وارد شیار پلی‌مراز شده از چپ نیرو وارد می‌کند تا آن را قبل از خروج پلی‌مراز خم کند. کانال خروج RNA نشان داده شده است.



▲ **شکل ۱۰-۷ نمایش شماتیک ساختار زیرواحد RNA پلیمراز مرکزی E.coli و RNA پلیمرازهای هسته‌ای مخمری.** هر سه RNA پلیمراز مخمری پنج زیرواحد مرکزی مشابه با زیرواحدهای β، β'، ۲ زیرواحد α و ω RNA پلیمراز E.coli دارند. بزرگ‌ترین زیرواحد (RPB1) پلیمراز II دارای دُمین انتهای کربوکسیل ضروری (CTD) است. RNA پلیمرازهای I و III دارای دو زیرواحد α غیرمشابه هستند، در صورتی که RNA پلیمراز II دارای دو زیرواحد شبه α غیرمشابه دیگر است. هر سه پلیمراز دارای زیرواحد شبه ω و چهار زیرواحد مشترک دیگر هستند. مضافاً اینکه، هر پلیمراز مخمری دارای سه الی هفت زیرواحدهای منحصر به فرد کوچکتر است.

زیرواحدها برای حیات سلول ضروری‌اند. تخریب ژن‌های زیرواحدهای کمی از پلی‌مراز که اساساً برای بقاء سلول ضروری نمی‌باشند (زیرواحدهای ۴ و ۷) منجر به رشد خیلی ضعیف سلول می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که همه زیرواحدها برای عملکرد طبیعی RNA پلی‌مراز یوکاریوتی لازم‌اند.



▲ **شکل تجربی ۱۱-۷ (شکل رنگی) رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی تأیید می‌کند که دُمین انتهای کربوکسیل (C - ترمینال) RNA (CTD) پلیمراز II در طی رونویسی در *invivo* فسفریله می‌شود.** کروموزم‌های پلی‌تن غده بزاقی از لارو دروزوفیلا درست قبل از پوست‌اندازی تهیه شده و سپس با آنتی‌بادی خرگوشی مختص CTD فسفریله و با آنتی‌بادی بزی مختص برای CTD غیرفسفریله تیمار شده، سپس این نمونه با و آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌بادی بزی نشاندار با فلورسین (سبز) و آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌بادی خرگوشی نشاندار با رُدامین (قرمز) رنگ‌آمیزی شد. بنابراین مولکول‌های پلیمراز با CTD غیرفسفریله رنگ سبز و با CTD فسفریله رنگ قرمز را گرفتند. هورمون پوست‌اندازی اِکدیزون سرعت‌های خیلی بالایی از رونویسی را در نواحی پاف نشان داده شده با 74EF و 75B القاء کرد. توجه کنید که فقط CTD فسفریله در این نواحی وجود دارد. نواحی پافی کوچک‌تر که در سرعت بالا رونویسی می‌شوند نیز قابل مشاهده هستند. مکان‌های غیرپافی که با رنگ قرمز (پیکان بالا) یا سبز (پیکان افقی)، نیز نشان داده شده‌اند. همچنین نواحی وجود دارد که هر دو رنگ سبز و قرمز را دارند و تولید رنگ زرد (پیکان پایین) را کرده‌اند.

بزرگ‌ترین زیرواحد RNA پلی‌مراز II، دارای یک ناحیهٔ تکراری ضروری در انتهای کربوکسیل خود است

انتهای کربوکسیل بزرگ‌ترین زیرواحد RNA پلی‌مراز II (RPB1) حاوی ۶ الی ۷ آمینواسیدی است که تقریباً به طور دقیق برای چند بار تکرار شده است. نه RNA پلی‌مراز نوع III و نه نوع I هیچ کدام چنان واحدهای تکراری را ندارند. این تکرار ۷ پپتیدی که توالی حفظ شده آن Tyr - Ser - Pro - Thr - Ser - Pro - Ser می‌باشد، دُمین انتهای کربوکسیل (CTD) نام دارد. RNA

پلی‌مراز II مخمری حاوی ۲۶ یا تعداد بیشتری از این توالی تکراری، نوع مهره‌داری حاوی ۵۲ تکرار و در مابقی یوکاریوت‌ها تعداد تکرارهای موجود در RNA پلی‌مراز II مابین این دو محدوده است. CTD برای بقاء سلول ضروری است و حداقل حضور ۱۰ نسخه از این تکرار برای حیات مخمر ضروری است. آزمایشات انجام شده در شرایط *invivo* با پروموترهای مدل برای اولین بار نشان دادند که مولکول‌های RNA پلی‌مراز II که رونویسی را آغاز می‌کنند، دارای CTD غیرفسفریله هستند. به محض آغاز رونویسی و حرکت و دور شدن از پروموتر تعدادی از سرین‌ها و برخی از اسیدهای آمینه تیروزین CTD فسفریله می‌شوند. بررسی کروموزوم‌های پلی‌تن غدد بزاقی مگس سرکه پیش از دگردیسی لارو در زمانی که رونویسی به صورت فعال انجام می‌شود، نشان داد که CTD در حین رونویسی در حالت *invivo* نیز فسفریله است. مناطق پاف عظیم موجود در کروموزوم نشان می‌دهد که در این مرحله از رشد، این مناطق نواحی هستند که رونویسی در آن‌ها به شدت صورت می‌گیرد. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های خاص CTD های فسفریله و غیرفسفریله نشان می‌دهد که RNA پلی‌مراز II همراه با پاف‌های در حال رونویسی شدید دارای CTD فسفریله است (شکل ۱۱-۷).

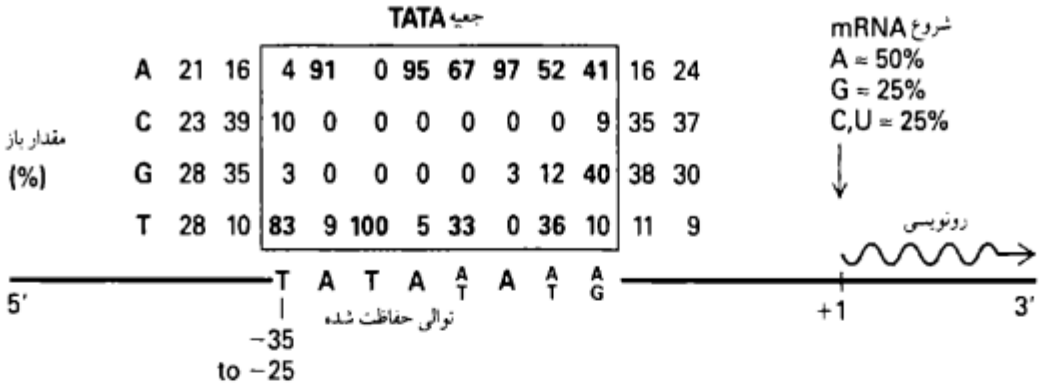
RNA پلی‌مراز II رونویسی را در ناحیه‌ای از DNA آغاز می‌کند که معادل با کلاهک ′۵ در mRNA است

آزمایشات رونویسی در حالت *invivo* که شامل RNA پلی‌مراز II (عصاره پروتئینی حاصل از هسته سلول‌های کشت داده شده) و الگوی DNA حاوی ناحیه رمزکنندهٔ انتهای ′۵، mRNA های تکراری از ژن‌هایی که به طور شایع بیان می‌شود نشان می‌دهد که رونوشت‌های حاصل همیشه دارای ساختار کلاهک مانندی در انتهای ′۵ خود هستند که مشابه نوعی است که از انتهای ′۵ تقریباً همه mRNA یوکاریوتی دیده می‌شود (شکل ۱۴-۴). در این آزمایشات، کلاهک ′۵ به انتهای ′۵ در RNA های نابالغ توسط آنزیم‌های موجود در عصاره پروتئینی اضافه می‌شود که تنها می‌توانند یک کلاهک را به RNA اضافه کنند که در انتهای ′۵ خود سه یا دو فسفات دارند. چرا که انتهای ′۵ تولید شده از شکستن RNA های بزرگتر که تولید انتهای ′۵ تک فسفاته می‌کند، نمی‌تواند کلاهک‌دار شود. در نتیجه محققان نتیجه‌گیری کردند که نوکلئوتیدهای کلاهک تولید شده، در رونویسی انجام شده در شرایط *In Vitro* می‌بایست نوکلئوتیدهایی باشند که با آن‌ها رونویسی آغاز شده است. بررسی توالی‌ها نشان داد که برای یک ژن، توالی انتهای ′۵ رونوشتی که در شرایط *In Vitro* تولید می‌شود مشابه انتهای ′۵ آن در mRNA های جدا شده از سلول است و تأییدکنندهٔ این نکته است که نوکلئوتیدهای کلاهک mRNA های یوکاریوتی با ناحیه آغاز رونویسی هم‌خوانی دارند. امروزه شناسایی ناحیه آغاز رونویسی یک رونوشت تازه شناخته شده عموماً با تعیین ناحیه‌ای از DNA که مسئول رمزکردن انتهای ′۵ از mRNA است به راحتی انجام‌پذیر است.

نکات کلیدی بخش ۲-۷

مروری بر کنترل ژن یوکاریوتی و RNA پلیمراز

- هدف اولیه کنترل ژن در موجودات زنده پرسلولی اجرای دقیق تصمیمات تکوینی است چنانکه ژن‌های مورد نظر در سلول‌های مورد نظر در طی تکوین و تمایز سلولی بیان می‌شوند.
- کنترل رونویسی ابزار اولیه تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها و همچنین در باکتریها است.
- در ژنومهای یوکاریوتی، عناصر کنترلی رونویسی DNA ممکن است چندین کیلوباز از پروموتری که آنها را تنظیم می‌کنند فاصله داشته باشند. نواحی کنترلی متفاوت رونویسی یک ژن یکسان را در انواع متفاوت می‌توانند کنترل کنند.
- یوکاریوت‌ها دارای سه نوع RNA پلیمراز هسته‌ای هستند. هر سه دارای دو زیرواحد بزرگ و سه زیرواحد کوچکتر دارای هومولوژی با زیرواحدهای α β β' و ω از RNA پلیمراز *E.coli* و همچنین چندین زیرواحد کوچک دیگر است (شکل ۱۰-۷ را ملاحظه کنید).
- RNA پلیمراز I فقط pre-rRNA را سنتز می‌کند. RNA پلیمراز II mRNAها و برخی از RNAهای هسته‌ای کوچک را که در پیرایش mRNA نقش دارند سنتز می‌کند. RNA پلیمراز III، tRNAها، ۵srRNA و چندین RNA نسبتاً کوچک و پایدار را سنتز می‌کند (جدول ۲-۷ را ملاحظه کنید).
- دُمین انتهای کربوکسیل (CTD) در بزرگترین زیرواحد آنزیم RNA پلیمراز II در طی آغاز رونویسی فسفریله می‌شود و همچنان که آنزیم رشته الگو را رونویسی می‌کند فسفریله باقی می‌ماند.
- RNA پلیمراز II رونویسی ژن‌ها را در نوکلئوتیدی از DNA الگو که مرتبط با نوکلئوتید ′۵ است شروع می‌کند که در mRNA رمز شده کلاهک دار می‌شود.



▲ **شکل ۱۲-۷ تعیین توالی حفظ شده جعبه TATA.** توالی نوکلئوتیدی بالادست ناحیه آغاز ۹۰۰ ژن رمزکننده پروتئین یوکاریوتی به گونه‌ای قرار گرفته‌اند که بیشترین شباهت را در ناحیه ۳۵- تا ۲۵- داشته باشند. اعداد نشان داده شده درصد فراوانی هر یک از بازها در هر جایگاه است. بیشترین شباهت در ناحیه‌ای هشت بازی که همان جعبه TATA است دیده می‌شود که در پایین نشان داده شده است. اولین بازی که در mRNA رمز می‌شود اغلب A در ژن‌های حاوی جعبه TATA است.

۳-۷ توالی‌های تنظیمی در ژن‌های رمزکننده پروتئین

همان طور که در بخش قبلی متذکر شدیم، بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین توسط توالی‌های اتصال پروتئین متعددی کنترل می‌شوند که به طور عمومی نواحی کنترل رونویسی نامیده می‌شوند. این توالی‌ها شامل پروموترها و سایر عناصر تنظیمی مجاور به ناحیه آغاز رونویسی هستند و همین طور توالی‌هایی که در دوردست ژنی که آن را کنترل می‌کنند قرار می‌گیرند از این جمله‌اند. در این بخش نگاه دقیق‌تری به خصوصیات عناصر تنظیمی که در ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین یوکاریوت قرار دارند و برخی روش‌هایی که برای شناسایی آنان به کار می‌رود، خواهیم داشت.

جعبه TATA، آغازگرها و جزایر CpG به صورت پروموترهایی در DNA یوکاریوتی عمل می‌کنند

اولین ژن‌هایی که تعیین توالی شدند و توسط سیستم‌های رونویسی (*In Vitro*) مطالعه شد، ژن‌های ویروسی و ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی که به شدت در زمان خاصی از چرخه سلولی بیان می‌شدند و یا در ردهٔ سلولی خاصی بیان می‌شوند، بودند. در همهٔ این ژن‌هایی که به شدت رونویسی می‌شوند یک توالی حفاظت شده بنام جعبه TATA وجود دارد که تقریباً ۳۵-۲۵ جفت باز بالادست ناحیه آغاز قرار دارد (شکل ۱۲-۷). مطالعات جهش‌زایی نشان‌می‌دهد که یک تغییر باز در این نوکلئوتیدها به شدت رونویسی ژن‌هایی که در مجاورت جعبه TATA هستند و توسط RNA پلی‌مراز II رونویسی می‌شوند را کاهش می‌دهد. در اغلب موارد، تغییر توالی‌هایی که بین جعبه TATA و ناحیه آغاز قرار دارند تأثیر چندانی روی سرعت رونویسی ندارند. اگر جفت بازهای میان جعبه TATA و ناحیه آغاز حذف شوند، رونویسی از الگوی کوتاه شده از یک جایگاه جدید در ۲۵ جفت باز پایین دست جعبه TATA آغاز می‌شود. در نتیجه جعبه TATA مشابه یک پروموتر *E.coli* برای قرارگیری RNA پلی‌مراز II و آغاز رونویسی عمل می‌کند (شکل ۱۲-۴). برخی ژن‌های یوکاریوتی بجای جعبه TATA عنصر پروموتری دیگری بنام آغازگر[1] دارند. اغلب آغازگرهایی که به طور طبیعی یافت می‌شوند در ناحیه ۱- یک سیتوزین (C) و در جایگاه آغاز رونویسی (۱+) یک آدنین (A) دارند. مطالعه جهش‌زایی هدف‌دار ژن‌های پستانداران نشان می‌دهد که پروموترهای حاوی آغازگر توالی‌های مجاور ناحیه آغازی قدرت این پروموتر را تعیین می‌کنند. برعکس آنچه در مورد توالی جعبه TATA مطرح است، یک توالی حفظ شده متغیر برای آغازگر تعیین شده است.

(5′)Y-Y-A^{+1}-N-T/A-Y-Y-Y(3′)

در این توالی، A^{+1} بازی است که رونویسی ژن از آنجا آغاز می‌شود، Y یک باز پیریمیدین (T یا C)، N هر یک چهار باز و T/A به معنای حضور T یا A در ناحیه ۳+ است.

رونوسی ژن‌هایی که پروموترهای حاوی جعبه TATA و یا آغازگر دارند در یک جایگاه آغاز مشخص، آغاز می‌شود. هرچند که

1- Initiator

رونویسی تعدادی از ژن‌های رمزکننده پروتئین نشان داده شده که در یکی از چندین جایگاه ممکنی که اغلب ۲۰۰-۲۰ جفت باز طول دارد، آغاز می‌شود. این ژن‌ها، که اغلب در سطح کمی رونویسی می‌شوند (مانند ژن‌هایی رمزکننده آنزیم‌های مورد نیاز برای فعالیت‌های متابولیک پایه که در همه سلول‌ها وجود دارند و آن‌ها را ژن‌های خانه نگه‌دار[1] نامند) حاوی جعبه TATA و یا آغازگر نمی‌باشند. اغلب ژن‌های این دسته حاوی توالی‌های غنی از CG به طول ۵۰-۲۰ نوکلئوتید در حدود ۱۰۰ جفت باز بالادست ناحیه آغاز هستند. دی‌نوکلئوتید CG از نظر آماری در DNA مهره‌داران بررسی شده است و حضور ناحیه غنی از CG یا جزیره CpG[2] بالادست ناحیه آغاز ژن‌ها به طور واضحی توزیع اتفاقی ندارد. به همین دلیل، حضور جزایر CpG در DNA ژنومی این احتمال را مطرح می‌کند که این ناحیه حاوی جایگاه آغاز رونویسی است.

عناصر نزدیک پروموتری به تنظیم ژن‌های یوکاریوتی کمک می‌کند

روش‌های نوترکیب DNA برای مطالعه منظم جهش دادن توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های متعدد یوکاریوتی جهت شناسایی نواحی تنظیمی رونویسی به کار می‌روند. برای مثال، عناصر گوناگون کنترل رونویسی پستانداری که ترانستیریتین (TTR) را که مسئول انتقال هورمون تیروئید در خون و مایع مغزی نخاعی احاطه کننده مغز و نخاع است، کنترل می‌کنند. ترانستیریتین در سلول‌های هپاتوسیت جایی که محل سنتز و ترشح اکثر پروتئین‌های خون است، بیان می‌شود. البته در سلول‌های عنکبوتیه مغز که محل ترشح مایع مغزی نخاعی و پروتئین‌های آن است نیز تولید می‌شود. عناصر شناسایی شده تنظیمی مورد نیاز برای رونویسی ژن (ترانستیریتین) TTR توسط روشی که در شکل ۱۳-۷ نمایش داده شده، حاصل شده‌اند.

در این روش آزمایشگاهی قطعات DNA با طول مختلف از بالادست جایگاه آغازی در پلاسمید باکتری که حاوی یک ژن گزارشگر است کلون شدند. ژن گزارشگر آنزیمی را تولید می‌کند که مقدار آن را با تعیین فعالیتش در عصاره سلولی می‌توان سنجید. از جمله ژن‌های رایج گزارشگر می‌توان ژن Lacz از *E.coli* که مولد بتاگالاکتوزیداز است، ژنی که لوسیفراز را رمز می‌کند و انرژی هیدرولیز ATP را به نور تبدیل می‌کند و ژن تولیدکننده پروتئین فلورسانت سبز (GFP) از ماهی ژله‌ای را نام برد.

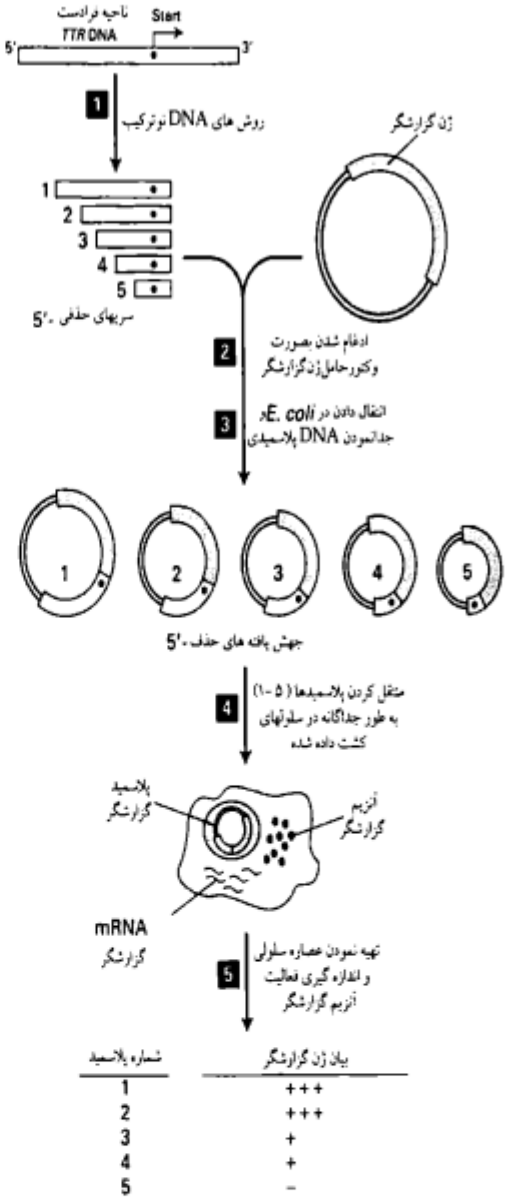
با ساختن و بررسی یک سری حذف‌های انتهای ′۵ بالادست از ژن TTR، محققان متوجه شدند که دو جایگاه کنترلی باعث تحریک بیان ژن گزارشگر در سلول‌های کبدی و نه سلول‌های دیگر می‌شوند. یک ناحیه بین ناحیه آغاز و ۲۰۰ باز بالادست آن و ناحیه دیگر بین ۱/۸۵ تا ۲/۰۱ کیلو باز قرار دارد جایگاه آغاز است. شناسایی نواحی کنترلی دیگر در سلول‌های عنکبوتیه نشان می‌دهد که ژن‌های یوکاریوتی دارای عناصر تنظیمی مختلفی هستند که در سلول‌های متفاوت بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند.

امروزه صدها ژن یوکاریوتی بررسی شده‌اند و مناطق کنترلی آنها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. این عناصر تنظیمی همراه با جعبه TATA و یا آغازگر اغلب به عنوان پروموتر ژنی که تحت کنترل است، شناخته می‌شوند. با این حال ما ترجیح می‌دهیم که عبارت پروموتر را به جعبه TATA و یا توالی آغازگری که محل آغاز را بر روی رشته الگو تعیین می‌کند نسبت دهیم. ما از بیان عناصر مجاور پروموتر به عنوان ناحیه‌ای که بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز بالادست ناحیه آغاز قرار دارند، استفاده می‌کنیم. در برخی موارد عناصر مجاور پروموتر خاص نوع سلول‌اند و در یک نوع سلول خاص کنترل ژن را به عهده دارند. در یوکاریوت‌ها واژه افزاینده[3] به ناحیه کنترل رونویسی اطلاق می‌شود که بیش از ۲۰۰ جفت باز از ناحیه آغاز فاصله داشته باشد.

زمانی که ناحیه کنترلی یک ژن شناسایی شد به کمک روش جهش‌های پویشگر واصل[4] می‌توان مناطقی از این ناحیه که نقش کنترل رونویسی را دارند، شناسایی کرد. در این روش یکسری از توالی‌هایی که حاوی جهش‌های مشترک همپوشان هستند، ساخته می‌شود و اثر این نواحی روی بیان ژن گزارشگر یا تولید RNA خاص بررسی می‌شود (شکل ۱۴-۷). از اولین کاربردهای این روش شناسایی عناصر مجاور پروموتر ژن تیمیدین کیناز (tk) ویروس سیمپلکس هرپس است. بررسی‌ها نشان داد که ناحیه بالادست ژن tk حاوی سه ناحیه کنترلی مجزا است: یک جعبه TATA در فاصله‌ای بین ۳۲- تا ۱۶- و دو عناصر کنترلی بالادست دورتر (شکل ۱۴-۷).

برای بررسی اثر فاصله بر روی عناصر تنظیمی در پروموتر tk در HSV که توسط روش جهش‌های پویشگر واصل شناسایی شده بودند، محققان توالی‌هایی را با حذف و یا دخول‌هایی را میان عناصر کنترلی ایجاد کردند. تغییر فاصله میان پروموتر و عناصر مجاور پروموتر در حد ۲۰ نوکلئوتید یا کمتر اثر کمی خواهد داشت. با این حال

1- House keeping genes
2- CpG island
3- Enhancer
4- Linker scanning mutations



شماره پلاسمید	بیان ژن گزارشگر
1	+++
2	+++
3	+
4	+
5	–

دخول ۵۰-۳۰ جفت باز میان عناصر مجاور پروموتر و جعبه TATA اثری معادل حذف آن عناصر را نشان می‌دهد. بررسی مشابهی که روی سایر ژن‌های یوکاریوتی انجام شده است، نشان می‌دهند که انعطاف‌پذیری فضای بین عناصر پروموتر مجاور عموماً قابل تحمل است اما جدایی بیش از چندین ده جفت باز آن‌ها باعث کاهش رونویسی می‌شود.

افزاینده‌های دارای فاصله زیاد از ناحیه آغاز اغلب رونویسی توسط RNA پلی‌مراز II را تحریک می‌کنند

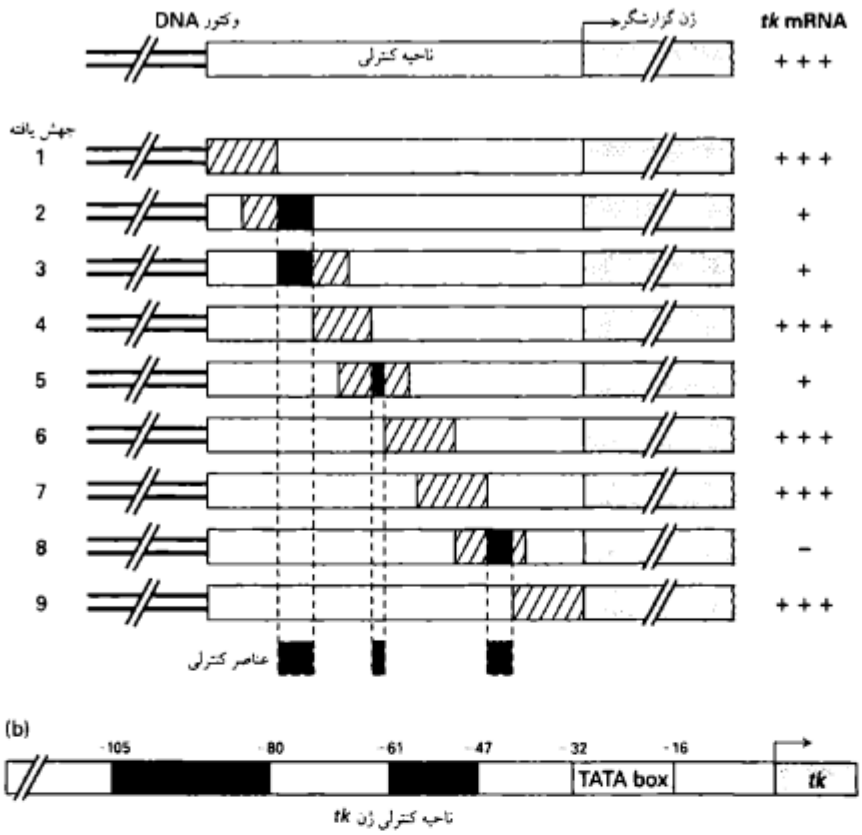
همان طور که قبلاً اشاره شد، رونویسی از برخی از پروموترهای یوکاریوتی توسط عناصر تنظیمی که هزاران جفت باز از ناحیه آغاز فاصله دارند تحریک می‌شود. چنین عناصر تنظیمی رونویسی دوردست که به آن‌ها افزاینده گویند در ژنوم یوکاریوتی رایج هستند

◀ شکل تجربی ۱۳-۷ تجزیه و تحلیل حذف ′۵ می‌تواند توالی‌های کنترلی رونویسی را در بالادست ژن یوکاریوتی شناسایی کند. (مرحله ❶): تکنیک‌های DNA نوترکیب به منظور ایجاد یک سری از قطعات DNA یی استفاده می‌شود که از ناحیه ترجمه نشده ′۵ ژن تا بالادست با فاصله زیاد امتداد می‌یابد. (مرحله ❷): قطعات DNA به بالادست پلاسمید گزارشگر از یک ژن گزارشگر با سنجش آسان متصل می‌شوند. (مرحله ❸): DNA به منظور جداسازی پلاسمیدهایی با حذف‌هایی دارای اندازه‌های متغیر ′۵ در جایگاه آغاز رونویسی، به E.coli منتقل شدند. (مرحله ❹) سپس هر پلاسمید به سلول‌های کشت داده شده (یا مورد استفاده برای ایجاد موجودات زنده ترانس‌ژن) منتقل شده و بیان ژن گزارشگر مورد سنجش قرار گرفت (مرحله ❺). نتایج مثال فرضی (پایین صفحه) حاکی از آن است که قطعات آزمایشی دارای دو عنصر کنترلی هستند. انتهای ′۵ یکی میان حذف‌های ۲ و ۳ قرار می‌گیرد و انتهای ′۵ دیگری میان حذف‌های ۴ و ۵ قرار می‌گیرد.

اما در ژنوم باکتریایی نادرند. اولین افزاینده یوکاریوتی شناخته شده که رونویسی ژن‌های یوکاریوتی را تحریک می‌کند یک توالی ۳۶۶ جفت بازی از ویروس میمونی ۴۰[1] (SV40) است. بررسی بیشتر این ناحیه از ژنوم SV40 نشان می‌داد که یک توالی ۱۰۰ جفت بازی در حدود صد جفت باز در بالادست ناحیه آغاز رونویسی ژن‌های اولیه SV40 قرار دارد که مسئول عمل افزایشگری رونویسی‌اند. در SV40 این توالی افزاینده مسئول تحریک رونویسی از روی پروموترهای ویروسی است. افزاینده SV40 همچنین رونویسی از همه پروموترهای یوکاریوتی که تاکنون مطالعه شده را چه در جهت پروموتر مورد آزمایش باشد و یا در جهت آن نباشد را حتی اگر هزاران جفت باز دورتر از ناحیه آغاز باشد تحریک می‌کند. بررسی‌های متعدد جهش‌های پویشگر واصل نشان می‌دهد که افزاینده SV40 حاوی عناصر ویژه‌ای است که هر یک برای اِعمال اثر افزایشگری مؤثر هستند. بعداً خواهیم دید که هر یک از این عناصر تنظیمی محل اتصال یک پروتئین هستند.

به زودی پس از کشف افزاینده SV40، افزاینده‌های دیگری در ژنوم ویروس‌ها و DNA سلولی یوکاریوت‌ها شناسایی شد. برخی از این عناصر تنظیمی در ۵۰ یا حتی چندین کیلوباز جلوتر از پروموتری که کنترل می‌کنند قرار دارند. بررسی انواع مختلف افزایشگرهای سلول‌های یوکاریوتی نشان داد که این توالی‌ها می‌توانند بالادست

1- Simion virus 40 (SV40)

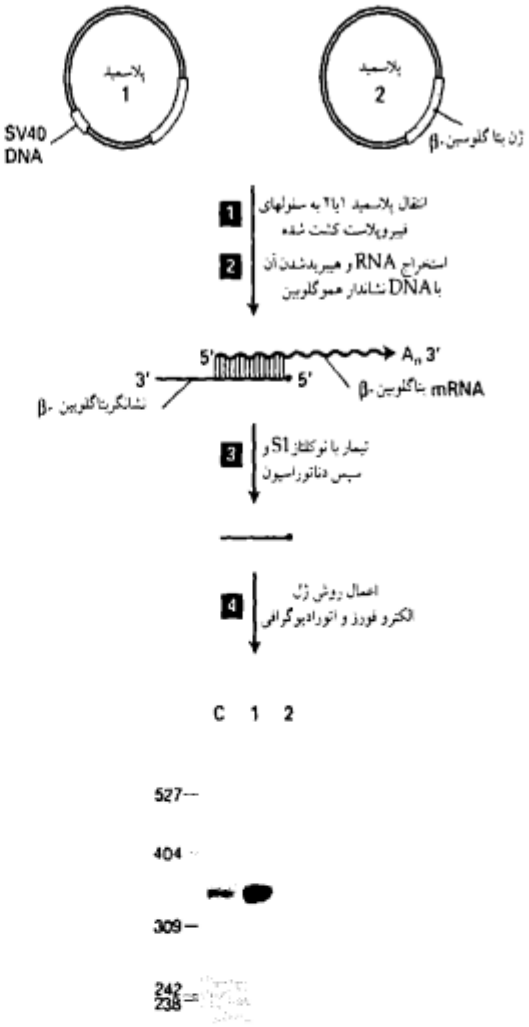


▲ **شکل تجربی ۱۴-۷ شناسایی عناصر تنظیمی رونویسی با روش جهش‌های پویشگر واصل.** (a) یک ناحیه از DNA یوکاریوتی که مسئول رونویسی بالای یک ژن گزارشگر است در یک ناقل پلاسمیدی کلون می‌شود. جهش‌های پویشگر (LS) واصل از یک انتها تا انتهای دیگر ایجاد می‌شوند (نواحی هاشور خورده). این جهش‌ها نتیجه به هم زدن طول قطعات کوچکی از DNA هستند. بعد از این که پلاسمید جهش‌ها به طور جداگانه به سلول منتقل می‌شوند، بیان گزارشگر سنجیده می‌شود. در مثال فرضی که این جا نشان داده شده است، جهش‌های پویشگر واصل از ۱، ۴، ۶ و ۷ یا ۹ اثر ندارند و یا اثر کمی بر روی بیان ژن گزارشگر دارند. این امر نشان می‌دهد که این نواحی حاوی عناصر تنظیمی نیستند. بیان ژن گزارشگر بعد از جهش‌های ۲، ۳، ۵ و ۸ کاهش چشمگیری نشان می‌دهند که گویای حضور عناصر کنترلی فواصل نشان داده شده زیر است. تحلیل جهش‌های پویشگر واصل در ناحیه کنترلی تیمیدین کیناز از ویروس هرپس نشان می‌دهد که حاوی یک جعبه TATA و دو ناحیه کنترلی مجاور پروموتر در (PE-1 و PE-2) است.

پروموتر، پایین دست پروموتر در ناحیه اینترون و یا حتی در پایین دست آخرین اگزون ژن مانند ژن *Pax6* دیده شوند (شکل ۶-۷). همانند عناصر مجاور پروموتر، تعدادی از افزاینده‌ها خاص سلول ویژه‌ای هستند. برای مثال افزاینده‌ای که بیان *Pax6* را کنترل می‌کند در سلول‌های شبکیه در ناحیه‌ای اینترونی بین اگزون ۴ و ۵ قرار دارد (شکل ۶-۷). بررسی آثار حذف و جهش‌های پویشگر واصل روی افزاینده‌های سلولی نشان می‌دهد که مانند افزاینده SV40 آن‌ها عموماً از عناصری تشکیل شده‌اند که برای عمل کلی افزاینده مهم‌اند.

اغلب ژن‌های یوکاریوتی توسط عناصر کنترلی چندگانه‌ای کنترل می‌شوند

در ابتدا افزاینده‌ها و عناصر نزدیک پروموتری گمان می‌شد که انواع متفاوتی از عناصر کنترل رونویسی هستند. با این حال با بررسی عناصر نزدیک پروموتر و افزاینده‌ها تفاوت میان این دو کمتر شد. برای مثال هر دوی این عناصر اگر جهت‌شان عوض شود می‌توانند رونویسی را تحریک کنند و یا خاص نوع سلول هستند. نتیجه کلی این است که طیف وسیعی از عناصر تنظیمی، کنترل رونویسی توسط RNA پلی‌مراز II را به عهده دارند. در یک انتها، افزاینده‌ها قرار دارند که می‌توانند رونویسی را از فاصله‌ای چند ده هزار جفت بازی از پروموتر تحریک کنند (مانند افزاینده SV40). در انتهای دیگر عناصر نزدیک پروموتری قرار دارند که مانند عناصر تنظیمی ژن tk در HSV اند و جابجایی‌شان بیش از ۵۰-۳۰ جفت باز از پروموتر باعث از بین رفتن اثرشان می‌شود. محققان تعداد زیادی عناصر کنترل‌کننده رونویسی را شناسایی کرده‌اند که می‌توانند رونویسی را از



◀ شکل تجربی ۱۵-۷ پلاسمیدی که حاوی بخشی از DNAی SV40 است به طور چشمگیری تولید mRNAی بیشتری در مقایسه با نوعی که افزاینده ندارد، نشان می‌دهد. پلاسمیدی که حاوی ژن β گلوبین است همراه و یا بدون ناحیه‌های ۳۶۶ جفت بازی از DNAی SV40 ساخته می‌شود. این پلاسمیدها وارد سلول‌های کشت داده شده می‌شوند و هر RNA یی که تولید می‌شود، در معرض نشانگر β گلوبین قرار می‌گیرند (مرحله ❶ و ❷). مقدار mRNA تولید شده از ژن β گلوبین توسط نوع سلول به کمک روش محافظت در مقابل نوکلئاز ′۵ سنجیده می‌شود (مرحله ❸). نشانگری که از cDNAی بتاگلوبین ساخته شده با انتهای ′۵ mRNAی بتاگلوبین مکمل می‌شود. انتهای ′۵ نشانگر توسط فسفات رادیواکتیو نشاندار شده است. مکمل شدن mRNAی بتاگلوبین با نشانگر باعث محافظت ناحیه‌ای ۳۴۰ نوکلئوتیدی از نشانگر در مقابل عمل نوکلئازی ′۵ می‌شود که باعث هضم توالی تک رشته‌ای و نه دو رگه RNA - DNA می‌شود. اتورادیوگرافی قطعات محافظت شده از عمل نوکلئاز که تحت الکتروفورز قرار گرفته‌اند، نشان می‌دهد که سلول‌های (مرحله ❹) آلوده شده با پلاسمید 1، mRNAی بتاگلوبین زیادتری در مقایسه با انواع آلوده شده با پلاسمید ۲ تولید کرده‌اند. نوار C در ژل یک کنترل بتاگلوبین جداسازی شده از رتیکولوسیت‌ها است که به طور فعال بتاگلوبین می‌سازد. این نتایج نشان می‌دهند که بخشی از DNAی SV40 که در پلاسمید است حاوی بخشی از افزاینده است و این امر عامل تولید چشمگیر و تحریک سنتز mRNAی بتاگلوبین است.

فاصله دور میان این دو انتها تحریک کنند. شکل ۱۶-۷ مکان قرارگیری توالی‌های کنترل‌کننده رونویسی را برای یک ژن فرعی پستاندار نشان می‌دهد. ناحیه آغاز که در آن جا رونویسی آغاز می‌شود اولین نوکلئوتید ′۵ از اولین اگزون mRNAیی که رمز می‌شود، کلاهک‌دار شده است. برای بسیاری از ژن‌ها بخصوص آن‌هایی که به صورت فراوانی پروتئین بیان می‌کنند یک جعبه TATA در توالی ۳۵-۲۵ جفت بازی بالادست ناحیه آغاز رونویسی قرار دارد و باعث هدایت RNA پلی‌مراز II برای آغاز رونویسی از نوکلئوتید صحیح می‌شود. عناصر مجاور پروموتری که عمدتاً کوچک‌اند و ۱۰ جفت باز بالادست جایگاه آغاز قرار دارند. افزاینده‌ها برخلاف آنها عموماً در حدود ۲۰۰-۵۰ جفت باز طول دارند و عمدتاً از عناصر متعدد ۱۰ جفت بازی تشکیل شده‌اند. افزاینده‌ها ممکن است تا ۵۰ کیلوباز و یا حتی بیشتر در پایین دست و یا بالادست جایگاه آغاز یا داخل اینترون قرار داشته باشند. برخی از ژن‌های پستانداران توسط بیش از یک نوع ناحیه افزاینده کنترل می‌شوند. ژنوم مخمر ساکارومایسس سرویزیه حاوی عناصر تنظیمی بنام **توالی‌های فعالگر بالادست** (UAS)[1] است که عمل آن‌ها شبیه افزاینده‌ها و عناصر نزدیک پروموتری در یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر است. اغلب ژن‌های مخمری حاوی یک UAS هستند که عموماً در ناحیه‌ای چند صد جفت بازی از جایگاه آغاز قرار دارند و به علاوه ژن‌های مخمری حاوی یک جعبه TATA هستند که تقریباً ۹۰ جفت باز بالادست جایگاه آغاز قرار دارد (شکل ۱۶-۷).

نکات کلیدی بخش ۳-۷

توالی‌های تنظیمی در ژن‌های رمزدهنده پروتئین

■ بیان ژن‌های رمزدهنده پروتئین یوکاریوتی عموماً از طریق نواحی کنترلی اتصال پروتئین چندگانه تنظیم می‌شود که نزدیک و یا دور از جایگاه شروع قرار گرفته‌اند (شکل ۱۶-۷).

1- Upstream activating sequences (UAS)

■ پروموترها اتصال RNA پلیمراز II رابه DNA هدایت می‌کنند و جایگاه شروع رونویسی را تعیین می‌کنند و سرعت رونویسی را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

■ سه نوع اصلی از توالی‌های پروموتری در DNA یوکاریوتی شناخته شده است. جعبه TATA در ژن‌های زیاد رونویسی شونده شایع است. پروموترهای آغازگر در برخی ژن‌ها یافت می‌شوند و جزئی از CpG مشخصه ژن‌های رونویسی شده در سرعت پائین هستند.

■ عناصر نزدیک پروموتری ۲۰۰ جفت باز بالادست جایگاه شروع قرار دارند. چنین عناصری دارای حدود ۱۰ جفت باز هستند که ممکن است به تنظیم یک ژن خاص کمک کنند.

■ افزاینده‌ها که دارای عناصر کنترلی کوتاه چندگانه هستند ممکن است از ۲۰۰ جفت باز تا ده‌ها کیلوباز در بالادست یا پائین دست پروموتر در داخل اینترون یا پائین دست آخرین اگزون آن قرار بگیرند.

■ عناصر نزدیک پروموتری و افزاینده‌ها اغلب مختص نوع سلول هستند و فقط در انواع سلولی تمایز یافته ویژه عمل می‌کنند.

۷-۴ فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌های رونویسی

عناصر تنظیمی مختلفی که در DNA یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند محل اتصال پروتئین‌های تنظیمی هستند. ساده‌ترین سلول یوکاریوتی صدها پروتئین عامل رونویسی را رمز می‌کند و این میزان در سلول‌های انسانی به بیش از ۲۰۰۰ عامل می‌رسد. رونویسی یک ژن خاص از ژنوم به طور مستقل توسط ترکیب چندین عامل رونویسی خاص کنترل می‌شود. ترکیب احتمالی این عوامل رونویسی یک عدد نجومی را می‌سازد که امکانات کنترل هر ژنی در ژنوم را فراهم می‌کند. در این بخش ما در مورد شناسایی، خالص سازی و ساختار این عوامل رونویسی صحبت می‌کنیم که آن‌ها مسئول خاموش کردن یک ژن خاص در سطح رونویسی هستند.

روش سنجش جابجایی در ژل و ردپانمایی[1] میانکنش‌های پروتئینی - DNA را ردیابی می‌کنند

در مخمر، دروزوفیلا و سایر یوکاریوت‌های آزمایشگاهی تعداد زیادی عامل رونویسی از نوع فعالگر یا مهارگر توسط روش‌های ژنتیکی کلاسیک که در فصل ۵ ذکر شده‌اند، شناسایی شده است. با این حال در پستانداران و مهره‌دارانی که چنین بررسی‌های ژنتیکی در آن‌ها ممکن نیست، به‌کمک روش‌های بیوشیمی، پروتئین‌های مورد نظر را استخراج و شناسایی می‌کنند. در این یافته‌ها یک توالی DNA که به روش‌های جهش‌زایی که قبلاً ذکر شد، شناسایی می‌شود و از آن برای ردیابی پروتئینی که به این توالی متصل می‌شد، به کار می‌رود. از روش‌های مرسوم در این مورد می‌توان به ردپانمایی DNAseI و سنجش جابجایی در ژلی اشاره کرد.

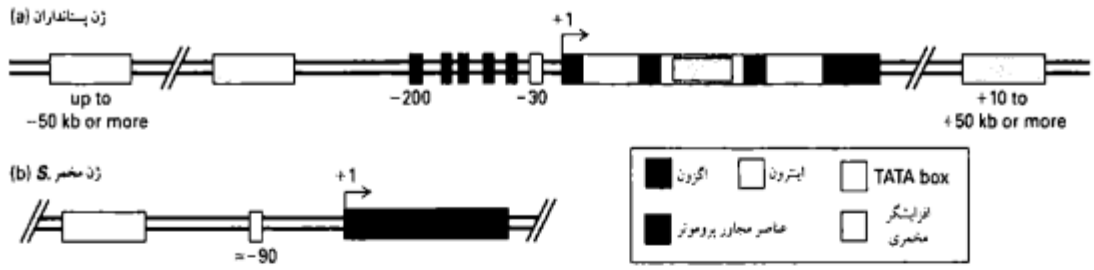
ردپانمایی DNAseI از این نکته استفاده می‌کند که زمانی که یک پروتئین به DNA متصل می‌شود باعث حفظ توالی DNA از هضم شدن توسط نوکلئازها می‌شود. همانطور که در شکل ۱۷-۷ شرح داده شده است زمانی که DNA نشاندار در یک انتها را در شرایط کنترل شده یک مرحله در معرض هضم شدن با نوکلئاز قرار دهیم و در مرحله‌ای دیگر در غیاب پروتئین تنظیمی اثر نوکلئاز روی DNA را بررسی می‌کنیم، بعد از مقایسه ژل الکتروفورز این دو دسته یک جای خالی یا در اصل ردپایی در نمونه حاوی پروتئین تنظیمی مشاهده می‌کنیم که همان محل اتصال پروتئین است. زمانی که قطعه DNAی ما حاوی یک عنصر تنظیمی باشد، ظهور یک رد پا دال بر حضور یک عامل تنظیمی است. البته از این روش برای شناسایی قطعه خالی از DNA که پروتئین تنظیمی به آن متصل می‌شود، نیز استفاده می‌شود.

سنجش تحرک و جابجایی الکتروفورزی[2] (EMSA) که به آن جابجایی ژلی یا جابجایی باند هم می‌گویند، از روش ردپانمایی برای بررسی‌های کمّی میانکنش پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA، مناسب‌تر است. در کل حرکت الکتروفورزی قطعه DNA که به آن پروتئین متصل شده باشد، کم می‌شود و در نهایت یک جابجایی در مکان باند مورد نظر در ژل رخ می‌دهد. از این روش برای شناسایی عامل رونویسی در عصاره پروتئینی که با DNA نشاندار انکوبه شده و حاوی یک عنصر کنترلی معلوم است استفاده می‌شود (شکل ۱۸-۷).

در روش‌های بیوشیمیایی جداسازی یک عامل رونویسی از مراحل پی در پی کروماتوگرافی روی عصاره حاصل از هسته استفاده می‌کنند، فراکشن‌هایی که از ستون‌های کروماتوگرافی شسته می‌شوند توسط ردپایابی با DNAseI یا EMSA (شکل ۱۸-۷ و ۱۷-۷).

1- Foot Printing

2- Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)



▲ **شکل تجربی ۱۶-۷ سازمان‌بندی عمومی از عناصر تنظیمی که بیان ژن را در یوکاریوت‌های پرسلولی و مخمر کنترل می‌کنند.** (a) ژن‌های موجودات زنده پرسلولی حاوی هر دوی عناصر نزدیک پروموتری و افزاینده‌ها و همچنین جعبه TATA و یا سایر عناصر پروموتری هستند. عناصر پروموتری باعث جایابی RNA پلی‌مراز II در ناحیه آغاز و آغاز رونویسی در جایگاه آغاز می‌شوند و سرعت رونویسی را متأثر می‌سازند. افزاینده‌ها ممکن است یا در بالادست و یا پایین دست در فاصله ۵۰ کیلوبازی یا حتی بیشتر از جایگاه آغاز رونویسی قرار داشته باشند و در برخی از موارد در داخل اینترون قرار دارند. برای برخی ژن‌ها عناصر نزدیک پروموتری در ناحیه‌ای پائین‌دست ناحیه آغاز همان طور در بالادست آن دیده می‌شوند. (b) اغلب ژن‌های ساکارومایسس سرویزیه حاوی تنها یک ناحیه کنترلی بنام توالی فعالگر بالادست (UAS) و یک جعبه TATA که ۹۰ جفت باز بالادست جایگاه آغاز قرار دارند، هستند.

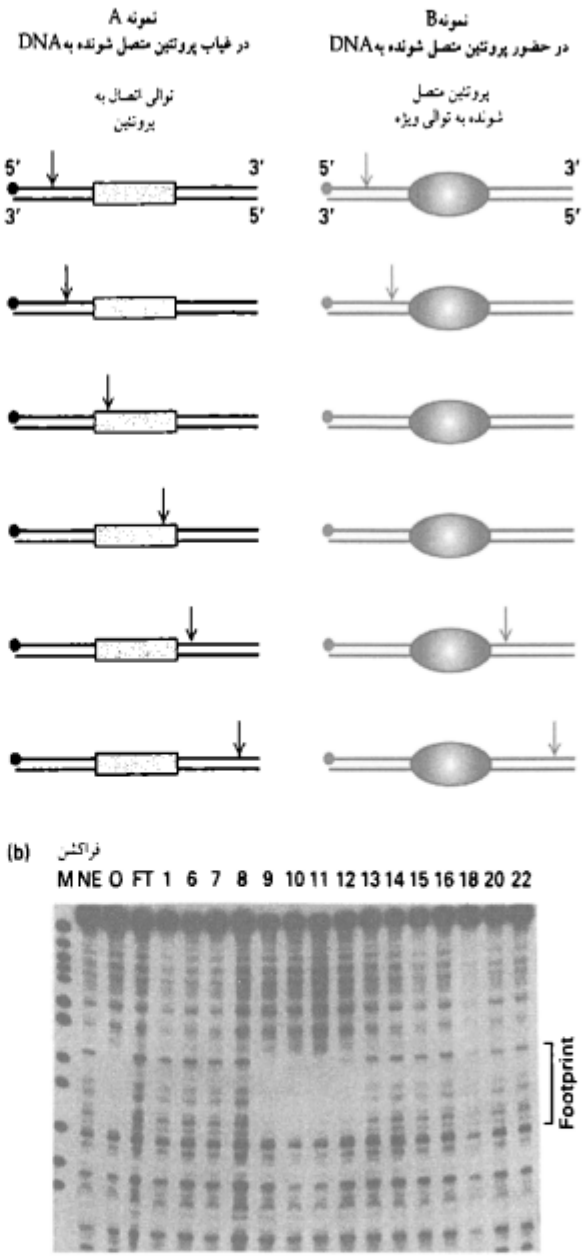
با استفاده از قطعات DNAی دارای یک عنصر تنظیمی شناخته شده، بعد از ردیابی قرار می‌گیرند. فراکشن‌هایی که حاوی پروتئین هستند و به عناصر تنظیمی متصل می‌شوند درواقع حاوی عوامل رونویسی بالقوه می‌باشند. یک تفکیک قدرتمندی که به نحو رایجی برای مرحله نهایی خالص‌سازی عوامل رونویسی به کار می‌رود روش کروماتوگرافی میل ترکیبی خاص DNA است. این نوعی از کروماتوگرافی میل ترکیبی است که در آن رشته‌های طویل DNA حاوی کپی‌های متعددی از محل اتصال عامل رونویسی به ستون متصل شده‌اند. برای اطمینان از عامل رونویسی بودن، پروتئین جدا شده، توانایی این پروتئین را در شرایط *In Vitro* بر روی کنترل رونویسی یک رشته الگوی حاوی محل اتصال آن عامل بررسی می‌کنند. شکل ۱۹-۷ نتایج سنجش مشابهی را برای عامل رونویسی SP1 که به توالی غنی از GC متصل شده و باعث فعال شدن رونویسی از ناحیه مجاور پروموتر می‌شود را نشان می‌دهد.

زمانی که یک عامل رونویسی جداسازی و خالص‌سازی شد، توالی نسبی آمینواسیدی آن برای محلول کردن ژن و یا cDNA رمزکننده (همانطور که در فصل ۵ گفته شد)، به کار می‌رود. ژن جداسازی شده برای بررسی توانایی پروتئین رمز شده به عنوان یک مهارگر یا فعال‌کننده رونویسی در بخش *invivo* به کار می‌رود (شکل ۲۰-۷).

فعال‌کننده‌ها مولکولهای پروتئینی چندبخشی دارای دُمین‌های مجزایی هستند که باعث آغاز رونویسی می‌شوند

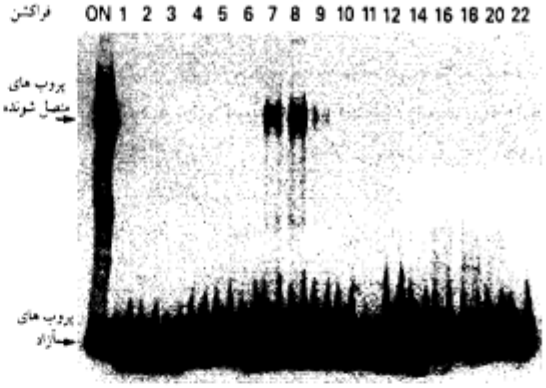
مطالعات با یک فعال‌گر مخمری بنام GAL4 نگرشی اولیه را برای ساختار دُمینی عوامل رونویسی فراهم آورده است. ژن رمزکننده پروتئین GAL4 که مسئول آغاز رونویسی از آنزیم‌های مورد نیاز در مسیر متابولیکی گالاکتوز است با شناسایی جهش‌های مکمل GAL4 شناسایی شد (فصل ۲۵). جهش‌زایی مستقیم که قبلاً شرح داده شد، باعث شناسایی UAS برای ژن‌هایی شد که GAL4 آن‌ها را فعال می‌کند. هر یک از این UAS ها حاوی یک یا چند توالی ۱۷ بازی بنام UAS_{GAL} است. سنجش ردپایابی DNAse I که با یک GAL4 نوترکیب انجام گرفت نشان داد که GAL4 به توالی UAS_{GAL} متصل می‌شود. زمانی که توالی UAS_{GAL} به بالادست یک توالی TATA متصل شود که همراه یک مخمر LacZ باشد، بیان ژن LacZ در سلول و حتی در محیط حاوی گالاکتوز فعال می‌شود ولی در سلول جهش‌دار gal4 بیان نمی‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که UAS_{GAL} یک توالی تنظیمی رونویسی است که با GAL4 در محیط حاوی گالاکتوز فعال می‌شود.

یکسری از آزمایشات برجسته که روی جهش یافته‌های دارای حذف در gal4 انجام شد، نشان داد که عامل رونویسی GAL4 حاوی دُمین‌های عملکردی مجزا است. انتهای N دارای دُمین متصل‌شونده به DNA است که به توالی خاصی از DNA متصل می‌شود و یک دُمین فعالگر انتهای C که با پروتئین‌های دیگر میانکنش می‌کند و باعث تحریک رونویسی از پروموتر مجاورش می‌شود (شکل ۲۱-۷). زمانی که دُمین متصل‌شونده به DNA انتهای N از GAL4 به طور مستقیم به مناطق مختلفی از انتهای C خودش متصل شود، این پروتئین ناقص توانایی فعال کردن رونویسی



◀ شکل تجربی ۱۷-۷ (شکل رنگی). (a) ردپایابی DNAase I باعث معلوم شدن توالی عناصر کنترلی می‌شود و برای تعیین خلوص عوامل رونویسی به کار می‌رود. (a) ردپایابی DNAse I می‌تواند توالی‌های عناصر کنترلی را شناسایی کند. یک قطعه DNA که می‌دانیم دارای عناصر کنترلی است را با فسفر ۳۲ (نقاط قرمز) نشاندار می‌کنیم. بخش‌هایی از DNA نشاندار را در حضور و یا غیاب‌گونه نمونه پروتئینی حاوی پروتئین تنظیمی مورد عمل نوکلئازی قرار می‌دهیم. DNAse I به صورت اتفاقی باعث هیدرولیز باند فسفودی‌استری بین اکسیژن '۳ یک دئوکسی ریبوز و فسفات '۵ نوکلئوتید بعدی می‌شود. غلظت کم DNAse I استفاده می‌شود و درنتیجه هر DNA یکبار برش می‌خورد (پیکان‌های افقی). اگر نمونه پروتئینی حاوی پروتئین‌های تنظیمی مورد نظر در توالی DNAی ما نباشد لذا DNA از مناطق مختلفی بین ۲ انتهای نشان‌دار برش می‌خورد مانند نمونه A در سمت چپ. اگر نمونه پروتئینی حاوی پروتئین مورد نظر باشد لذا بخشی از DNA را در مقابل عمل نوکلئازی حفاظت می‌کند. در پی عمل DNAseI قطعات DNA برابر روی ژل برای الکترفورز می‌برند ولی قبل از آن پروتئین از DNA جدا می‌شود و دو رشته‌ای‌های DNA نیز تک‌رشته‌ای می‌شوند. اتورادیوگرافی هر یک از ژل‌ها فقط قطعات را از محل شکست تا دو ناحیه نشان‌دار نمایان می‌کند. عناصر برش خورده حاوی عناصر تنظیمی بالای ژل برای نمونه A نشان داده شده‌اند. اما این قطعات در نمونه B حذف شده‌اند چرا که اتصال پروتئین مورد نظر باعث مهار برش شده است. درواقع باندهای حذف شده روی ژل ردپای اتصال عوامل تنظیمی هستند. (b) فراکشن حاوی پروتئین متصل شونده به ناحیه خاصی از DNA توسط کروماتوگرافی قابل خالص‌سازی است. بعد از آن روش ردپایابی DNAseI می‌تواند بگوید که فراکشن حاصل از شستشوی ستون کروماتوگرافی حاوی پروتئین کنترلی است. در غیاب پروتئین (عصاره‌های NE ، no) DNAseI توالی DNA را در نقاط متعدد می‌شکند و باندهای متعددی روی ژل می‌سازد. با افزودن عصاره پروتئین‌ها به ستونی که حاوی پروتئین هدف است، یک رد پا در ژل ایجاد می‌شود (onput ، O). این پروتئین به ستون متصل شده است چرا که فعالیت ردپازایی نداشته است و بعد از شستشوی ستون با شیب نمک، اکثر پروتئین‌های مورد نظر از ستون در فراکشن‌های ۱۲-۹ به دلیل ایجاد رد پا در ژل خارج شده‌اند، توالی ناحیه اتصال پروتئین توسط مقایسه با مارکرهای DNA با طول مشخص که روی همین ژل قرار دارند (M) قابل تشخیص است.

را هنوز حفظ می‌کند و این براساس نتایج سنجش‌های *invivo* است که مشابه روندی‌اند که در شکل ۲۰-۷ شرح داده شده‌اند. بنابراین نواحی داخلی GAL4 برای عمل آن بصورت عامل رونویسی مهم نیستند. آزمایشات مشابهی بر روی عامل رونویسی مخمری دیگر بنام GCN4 انجام شد که مسئول کنترل ژن‌های مورد نیاز برای سنتز برخی اسیدهای آمینه است و نشان می‌دهد که این پروتئین حاوی یک دُمین ۶۰ آمینواسیدی متصل‌شونده به DNA در انتهای C و یک ناحیه ۲۰ آمینواسیدی فعالگر در نزدیک نواحی میانی پروتئین است. شواهد بیشتر در مورد حضور دُمین مجزای فعال‌سازی در پروتئین‌های GAL4 و GCN4 از آزمایشات ادغام دُمین‌های فعال‌سازی این پروتئین‌ها با دُمین اتصال یابنده به DNA از



▲ **شکل تجربی ۱۸-۷ روش تغییر تحرک الکتروفورزی می‌تواند برای شناسایی عامل رونویسی در خلال خالص‌سازی به کار رود.** در این مثال فراکشن‌های حاوی پروتئین که با ستون کروماتوگرافی از هم جدا شده‌اند در مورد توانایی آن‌ها به اتصال به قطعه نشاندار DNA که حاوی توالی خاصی برای یک پروتئین است مورد بررسی قرار می‌گیرند. وقتی که نمونه‌ای از پروتئین که روی ستون برده شد (ON) و فراکشن‌های پیوسته ناشی از شستن ستون (اعداد) با پروب نشاندار ما انکوبه شوند، نمونه‌ها در شرایطی که به کمپلکس DNA - پروتئین آسیب نمی‌زند الکتروفورز می‌شوند. پروب‌های بدون پروتئین در پایین ژل مهاجرت می‌کنند در فراکشن‌های ۷ و ۸ پروتئین در نمونه‌ها وجود دارد که به پروب (قطعه DNA نشاندار حاوی عنصر تنظیمی) متصل می‌شود و یک کمپلکس DNA - پروتئین می‌سازد که در مقایسه با پروب‌های آزاد به کندی حرکت می‌کند، لذا این فراکشن‌ها احتمالاً حاوی عامل پروتئینی تنظیمی هستند که مورد جستجو بوده است.

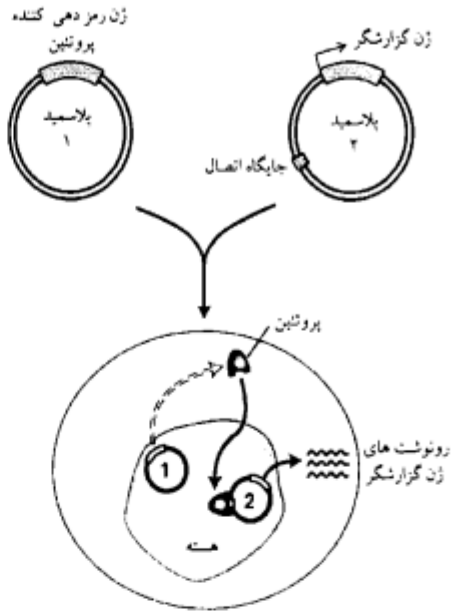
▲ **شکل ۱۹-۷. عوامل رونویسی از طریق سنجش فعالیت در شرایط *In Vitro* قابل ردیابی‌اند.** SP1 از طریق توانایی‌اش به اتصال به ناحیه‌ای از ژنوم SV40 که حاوی عناصر نزدیک پروموتری غنی از GC بود شناسایی شد و توسط کروماتوگرافی خالص‌سازی شده. برای بررسی توانایی فعال‌کنندگی رونویسی این عامل، SP1 را در حضور DNA الگو و عصاره پروتئینی حاوی RNA پلی‌مراز و سایر عوامل عمومی رونویسی و ریبونوکلئوتید تری‌فسفات نشاندار در شرایط *In Vitro* انکوبه کردند. محصولات RNA حاصله که نشاندار بودند در معرض الکتروفورز اتورادیوگرافی قرار گرفتند. اینجا اتورادیوگرام از سنجش‌هایی با آدنوویروس و DNAی SV40 در حضور (+) و یا غیاب (-) SP1 نشان داده شده است. SP1 اثر چندانی روی رونویسی پروموتر آدنوویروس نداشته چرا که فاقد محل اتصال SP1 است، در عوض SP1 رونویسی را از پروموتر SV40 حدود ۱۰ برابر بیشتر تحریک می‌کند.

پروتئین اتصال‌یابنده (به DNA از منبع *E.coli* کاملاً غیرمربوط) حاصل شد. زمانیکه این پروتئین‌های ادغامی در *invivo* مورد آزمایش واقع شدند، آنها رونویسی یک ژن گزارشگر دارای جایگاه مرتبط با پروتئین *E.coli* را فعال کردند. بنابراین یک عامل رونویسی عملکردی را می‌توان از ترکیب جدید عناصر پروکاریوتی و یوکاریوتی ساخت. مطالعاتی از این دست امروزه بر روی برخی از فعال‌کننده‌های یوکاریوتی انجام شده است. مدل ساختاری که از این بررسی حاصل شده است حاکی از دُمینی بودن این دسته از پروتئین‌ها است که یک یا تعداد بیشتری دُمین فعال‌کننده از طریق یک دُمین منعطف به یک دُمین متصل‌شونده به توالی خاص DNA متصل هستند (شکل ۲۲-۷). در برخی موارد، اسیدهای آمینه دخیل در دُمین اتصال‌یابنده به DNA، در فعال‌سازی رونویسی نیز شرکت می‌کنند. همانطور که در بخش بعدی خواهیم گفت دُمین‌های فعال‌کننده از طریق میانکنش با سایر پروتئین‌های دخیل در رونویسی عمل می‌کنند. حضور دُمین‌های منعطف ارتباط‌دهنده دُمین متصل‌شونده به DNA به دُمین فعال‌کننده ممکن است توجیه کنند که چرا فاصله انداختن میان عناصر تنظیمی در یوکاریوت‌ها این قدر تحمل‌پذیر و انجام‌پذیر است. بنابراین اگر هم محل اتصال عوامل رونویسی به DNA را نسبت به هم عوض کنیم ممکن است دُمین فعال‌کننده با هم میانکنش بکنند چرا که از طریق یک ناحیه منعطف به بخش متصل‌شونده به DNA متصل هستند.

مهارگرها رونویسی را مهار می‌کنند و عمل‌شان معکوس فعال‌کننده‌ها است

رونویسی یوکاریوت‌ها توسط مهارگرها و همین طور فعال‌کننده‌ها کنترل می‌شود. برای مثال ژنتیک‌دان‌ها در مخمر جهش یافته‌هایی را پیدا کرده‌اند که به طور پیوسته[1] یک ژن را بیان می‌کنند. به این دسته از جهش یافته‌ها که در آن‌ها رونویسی از روی

1- Constitutive



▲ **شکل تجربی ۲۰-۷. سنجش انتقال ژنی در *In Vivo* فعالیت رونویسی را به منظور برآوردن کردن پروتئین‌هایی که گمان می‌شود عوامل رونویسی شده اندازه‌گیری می‌کند.** این سیستم سنجشی نیاز به دو پلاسمید دارد. یک پلاسمید دارای ژن رمزکننده عامل رونویسی شناخته شده است (پروتئین X). پلاسمید دوم دارای ژن گزارشگر (مانند LacZ) و یک یا چند جایگاه اتصالی برای پروتئین X می‌باشد. هر دو پلاسمید به طور همزمان به سلول‌هایی که فاقد ژن رمزکننده پروتئین X هستند، وارد می‌شوند. تولید رونوشت‌های RNAی ژن گزارشگر اندازه گرفته می‌شود و در نتیجه فعالیت پروتئین رمزشده می‌تواند ارزیابی شود. اگر رونویسی ژن گزارشگر در حضور پلاسمید رمزکننده پروتئین X بیش از حالتی باشد که وجود ندارد، این پروتئین (X) فعال‌کننده است. اگر رونویسی کاهش یابد این پروتئین (X) مهارگر است. با استفاده از پلاسمیدهای رمزکننده عامل رونویسی جهش‌یافته و یا تغییریافته، دُمین‌های مهم پروتئین می‌توانند شناسایی شوند.

یک ژن به صورت غیرطبیعی پیوسته انجام می‌شود و ناشی از غیرفعال شدن مهارگری است که در صورت سالم بودن بیان این ژن را مهار می‌کرده، ژن پیوسته گویند.

به طور مشابه جهش یافته‌هایی از مگس سرکه و کرم حلقوی[1] جدا شده‌اند که در مراحل رشد جنینی دچار مشکل‌اند چرا که ژن‌هایی را بیان می‌کنند که در حالت طبیعی می‌بایست خاموش باشند. جهش‌ها در این جهش یافته‌ها باعث غیرفعال شدن مهارگرها می‌شود و در نتیجه رشد ناهنجار از خود نشان می‌دهند. محل اتصال مهارگرها در DNA توسط روش جهش‌های پویشگر واصل شبیه آنچه در شکل ۱۴-۷ است شناسایی می‌شود. در این مطالعات اگر جهش در محل اتصال فعال‌کننده باشد بیان ژن گزارشگر کم می‌شود و اگر جهش در جایگاه اتصال مهارگر باشد ژن به صورت پیوسته بیان می‌شود. مهارگرها به چنین توالی‌هایی متصل می‌شوند و با روش‌هایی که قبلاً گفته شد جدا می‌شوند.

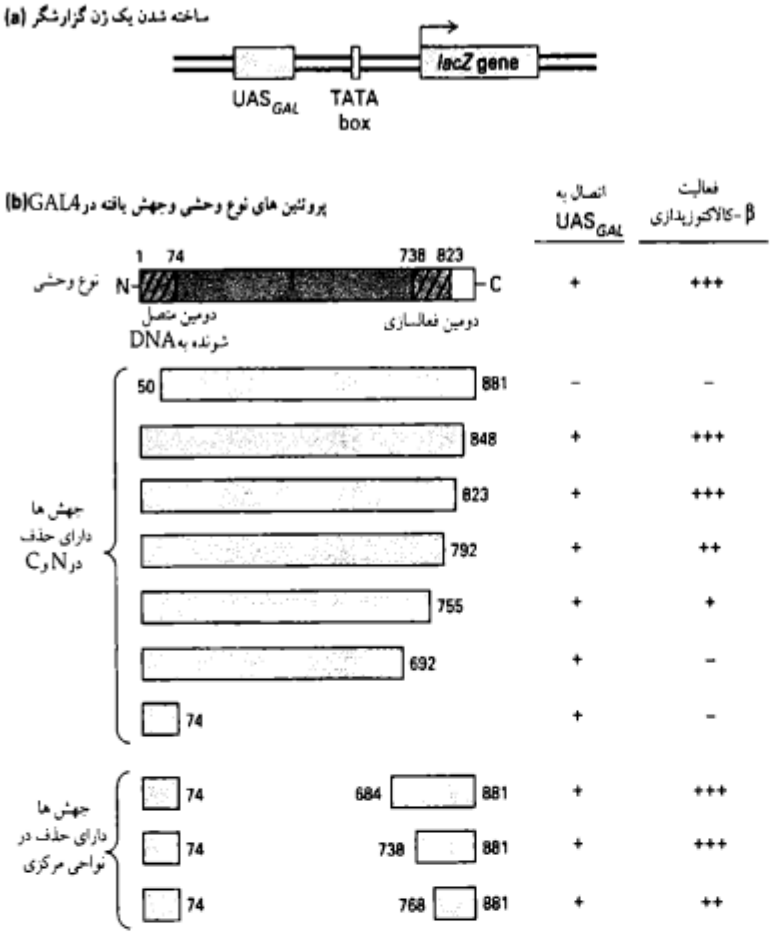
مهارگرهای رونویسی یوکاریوتی از لحاظ عملکردی برعکس فعال‌کننده‌ها هستند. این پروتئین‌ها می‌توانند ژنی را که به طور طبیعی توسط آن‌ها مهار نمی‌شده است را در صورتی که عمل اتصالشان تا چند صد باز از ناحیه آغاز قرار داشته باشند را مهار کنند. مانند فعال‌کننده‌ها، اغلب مهارگرهای یوکاریوتی پروتئین‌های چندبخشی[2] هستند. یک دُمین متصل شونده به DNA و یک دُمین با عملکرد مهارگری دارند. شبیه فعال‌کننده‌ها، اگر دُمین مهارگری به پروتئین دیگری که حاوی دُمین اتصال به DNA است متصل شود، هنوز عملکردی است. اگر جایگاه اتصال دُمین اخیر به DNA چند صد باز داخل پروموتر یک ژن باشد در این صورت نیز عمل مهارگری رخ می‌دهد. مانند فعال‌کننده، دُمین مهارکننده با پروتئین‌های دیگری میانکنش دارد که بعداً در همین فصل شرح خواهیم داد.

غیاب یک مهارگر می‌تواند عواقب ویران‌کننده‌ای در پی داشته باشد. برای مثال تومور **ویلمز**[3] *(WT1)* مهارگری را رمز می‌کند که در رشد کلیه‌ها نقش دارد. کودکانی که به واسطه به ارث رسیدن نسخه‌های جهش‌دار *WT1* از پدر و مادر، حامل مهارگر غیرعملکردی می‌شوند، در اوایل زندگی خود دچار تومورهای کلیوی می‌شوند، پروتئین *WT1* به ناحیه کنترلی یک عامل تنظیمی دیگر بنام EGR1 وصل می‌شود (شکل ۲۳-۷). این ژن مانند سایر ژن‌های یوکاریوتی در معرض فعالگری و مهارگری است. آزمایشات نشان می‌دهند که اتصال WT1 رونویسی ژن *EGR1* را مهار می‌کند بدون اینکه اتصال فعال‌کننده‌های رونویسی را که در حالت طبیعی بیان این ژن را تحریک می‌کنند، مهار کنند. این آزمایشات دال بر این نکته‌اند که WT1 یک مهارگر رونویسی است. WT1 مهارگری ژن‌های متعدد دیگری بجز *EGR1* را نیز به عهده دارد، لذا ایجاد تومور در افراد هتروزیگوت WT1 شاید به خاطر فعالیت چند ژن مانند *EGR1* باشد.

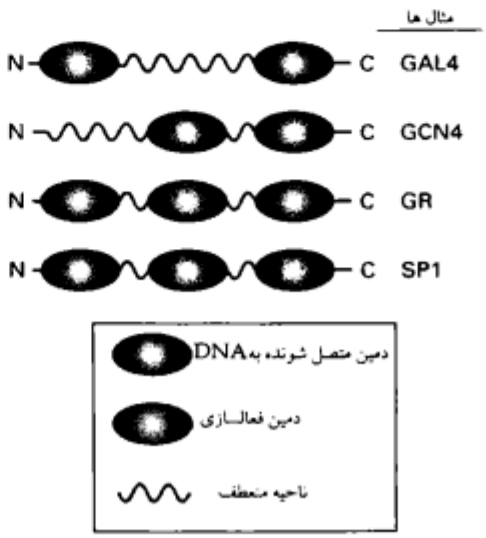
1- Caenorhabditis elegans

2- Modular protein

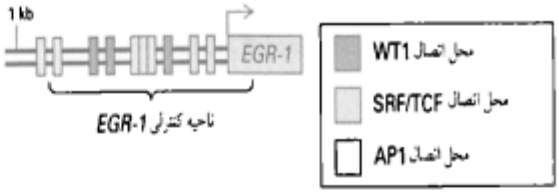
3- Wilm's tumor



◀ **شکل تجربی ۲۱-۷. مخمرهای جهش‌یافته که ژن GAL4 آنها دچار حذف شده است و دارای سازه ژنی گزارشگر UAS$_{Gal}$ هستند و وجود دُمین‌های عملکردی مجزا را در یک فعال‌کننده تأیید می‌کنند.** (a) دیاگرامی از سازه DNA یی دارای یک ژن گزارشگر LacZ و جعبه TATA متصل شده به UAS$_{GAL}$ (یک عنصر تنظیمی که دارای چندین جایگاه اتصالی GAL4 است). سازهٔ ژن گزارشگر و DNA ی رمزکنندهٔ GAL4 گونه وحشی یا GAL4 (حذف شده) مخمر جهش‌یافته به طور همزمان وارد سلول‌های مخمری جهش‌یافته (GAL4) شدند و فعالیت ژن بتاگالاکتوزیدازی که از LacZ رمز می‌شد، اندازه‌گیری شد. اگر DNA ی GAL4 رمزکننده پروتئین عملکردی وارد شده باشد، فعالیت بتاگالاکتوزیداز بالا خواهد بود. (b) دیاگرامهای شماتیک GAL4 گونه وحشی و چندین نوع مخمر جهش‌یافته. اعداد موقعیت‌های توالی گونه وحشی را نشان می‌دهند. حذف ۵۰ اسیدهای آمینه از انتهای آمینی توانایی GAL4 برای اتصال به UAS$_{GAL}$ و همچنین تحریک بیان بتاگالاکتوزیداز ژن گزارشگر را از بین می‌برد. پروتئین‌های دارای حذف‌های زیاد در انتهای کربوکسیل متصل به UAS$_{GAL}$ می‌مانند. این نتایج دُمین اتصالی به DNA را در انتهای آمینی GAL4 جابجا می‌کند. توانایی فعال کردن بیان ژن بتاگالاکتوزیداز کاملاً حذف نمی‌شود مگر اینکه اسیدهای آمینه بین ۱۲۶ تا ۱۸۹ و یا بیشتر از انتهای کربوکسیلی حذف شوند. بنابراین دُمین فعال‌سازی در ناحیه انتهای کربوکسیلی GAL4 قرار می‌گیرد. پروتئین‌هایی که دارای حذف‌های داخلی (در زیر شکل) بودند، قادر به تحریک بیان بتاگالاکتوزیداز بودند و این امر نشان می‌دهد که ناحیه مرکزی GAL4 برای عملکردش در این آزمایش ضروری نیست.



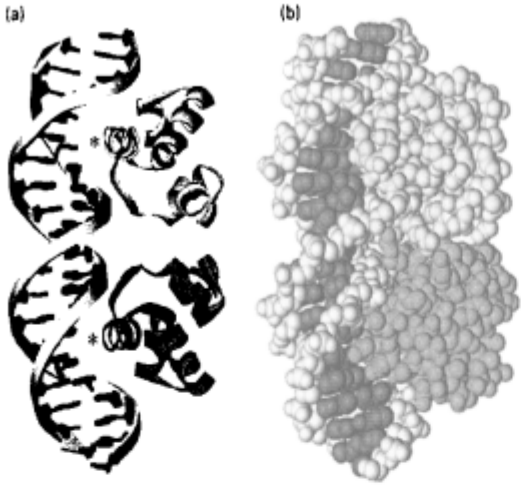
◀ **شکل تجربی ۲۲-۷. دیاگرامهای شماتیک ساختار چندبخشی فعالسازهای رونویسی یوکاریوتی را به تصویر کشیده‌اند.** این عوامل رونویسی ممکن است دارای بیش از یک دُمین فعالسازی ولی به ندرت دارای بیش از یک دُمین اتصالی به DNA باشند. GAL4 و GCN4 فعال‌کننده‌های رونویسی مخمر هستند. گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی (GR) باعث رونویسی ژن هدف وقتی که هورمونهای معینی به دُمین فعالساز انتهای کربوکسیل متصل شدند، می‌شود. SP1 به عناصر غنی از GC در تعداد زیادی از ژن‌های پستانداری متصل می‌شود.



▲ **شکل تجربی ۲۳-۷. دیاگرام ناحیه کنترلی ژن رمزکننده EGR-1 (فعال‌کننده رونویسی).** جایگاههای اتصالی پروتئین مهارگر یوکاریوتی WT1 با جایگاههای اتصالی فعال‌کننده AP1 یا جایگاه‌های اتصالی ترکیبی فعال‌کننده‌های SRF و TCF همپوشانی ندارد. بنابراین مهار توسط WT1 شامل دخالت مستقیم با اتصال سایر پروتئین‌ها همانند مهارگرهای باکتریایی نمی‌شود.

دُمین متصل شونده به DNA می‌تواند به چندین نوع ساختاری طبقه‌بندی شود

دُمین متصل شونده به DNA در مهارگرها و فعال‌کننده‌های یوکاریوتی از انواع موتیف‌های ساختاری خاصی تشکیل شده است. توانایی اتصال یک پروتئین اتصال شونده به DNA در یک توالی خاص، اغلب نتیجه پیوندهای غیرکووالان بین برخی از اتم‌های یک مارپیچ آلفا در دُمین متصل شونده به DNA و برخی از اتم‌های لبه‌های بازهای شیار بزرگ DNA است. در برخی از موارد علاوه بر اتم‌های بازها، اتم‌های قند - فسفات هم دخیل هستند. اصول اتصال اختصاصی پروتئین - DNA ابتدا از مطالعه مهارگرهای باکتری شناسایی شد. در تعدادی از مهارگرهای باکتریایی که دیمر هستند از هر مونومر یک مارپیچ آلفا وارد شیار بزرگ DNA می‌شود (شکل ۲۴-۷). این مارپیچ آلفا را مارپیچ شناسایی یا مارپیچ توالی‌خوان می‌گویند چراکه اکثر زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه که با DNA در تماس‌اند از این مارپیچ خارج شده‌اند. مارپیچ شناسایی که از سطح پروتئین مهارگر باکتریایی بیرون زده است وارد شیار بزرگ DNA شده و میانکنش‌های ویژه‌ای را با اتم‌های DNA که در داخل ساختار پروتئین از طریق میانکنش‌های هیدروفوب و با یک مارپیچ α در انتهای N آن پشتیبانی می‌شوند را ایجاد می‌کنند. به این عنصر ساختاری که در تعدادی از مهارگرهای باکتریایی دیده می‌شود موتیف مارپیچ - دور - مارپیچ[1] گویند. تعدادی موتیف دیگر که می‌توانند یک مارپیچ آلفا را به شیار بزرگ DNA عرضه کنند در عوامل رونویسی یوکاریوتی شناسایی شده است که براساس دُمین متصل شونده به DNA، طبقه‌بندی می‌شوند. از آنجایی که اغلب این موتیف‌های شناخته شده توالی اسید



▲ **شکل تجربی ۲۴-۷. (شکل رنگی) میانکنش مهارگر 434 باکتریوفاژی با DNA.** (a) دیاگرام رویانی مهارگر 434 متصل شده به DNA ی اپراتور اختصاصی‌اش. مونومرهای مهارگر به رنگ زرد و سبز هستند. مارپیچ‌های شناسایی توسط ستاره نشان داده شده‌اند. مدل فضا پرکن از کمپلکس اپراتور با مهارگر. (b) نشان می‌دهد که چگونه این پروتئین با یک طرف مولکول DNA با طول بیش از ۱/۵ دور میانکنش می‌دهد.

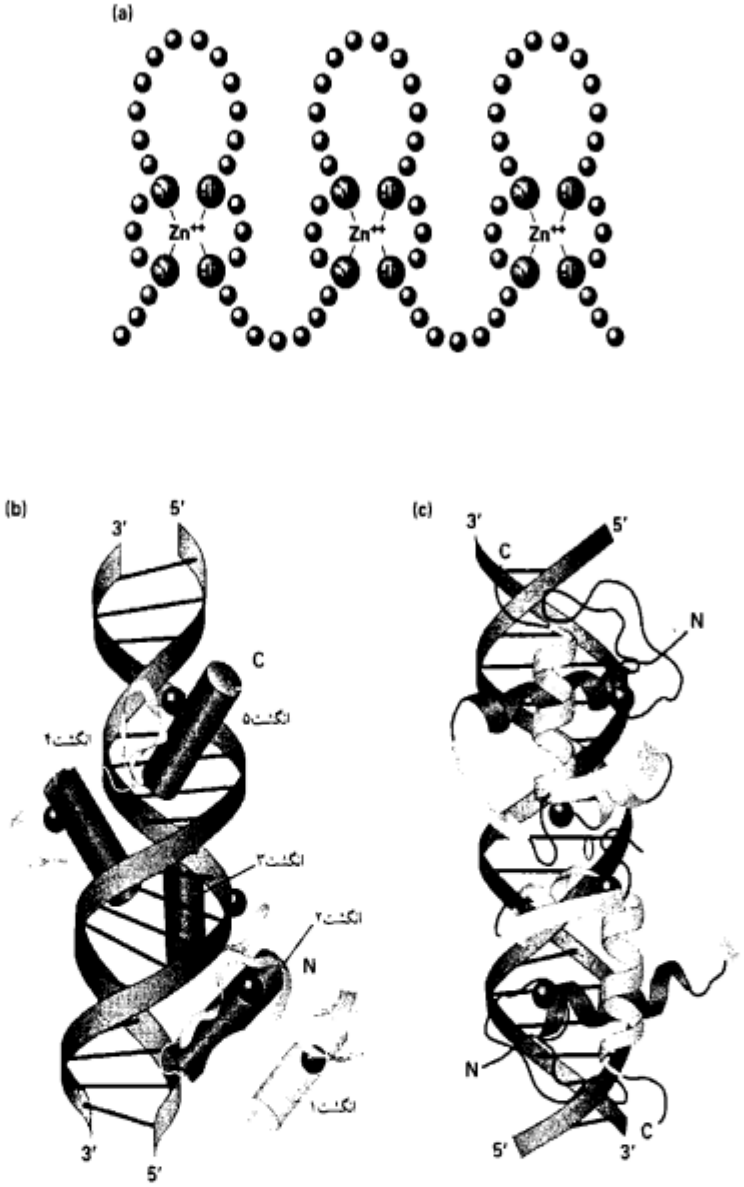
آمینه‌ای حفظ شده‌ای دارند، یک عامل رونویسی تازه شناسایی شده عمدتاً با شناسایی ژن و کلون کردن آن و تعیین توالی شدنش قابل طبقه‌بندی در یکی از این دسته‌ها است. ژنوم یوکاریوت‌های عالی‌تر یک دُمین از انواع دُمین‌های متصل شونده به DNA و صدها تا هزارها عامل رونویسی را رمز می‌کنند. برای مثال ژنوم انسان حدود ۲۰۰۰ عامل رونویسی را رمز می‌کند.

در این جا، چندین نوع از پروتئین‌های متصل شونده به DNA را که ساختارشان مشخص شده است معرفی می‌کنیم. در همهٔ این مثال‌ها و برخی انواع دیگر حداقل یک مارپیچ آلفا وارد شیار بزرگ DNA می‌شود. هرچند که برخی دیگر از ساختارها (مانند صفحات β یا لوپ) نیز در برخی عوامل کنترلی با DNA میانکنش دارند.

پروتئین‌های هومئودُمین[2]

تعدادی از عوامل رونویسی یوکاریوتی که در خلال رشد عمل می‌کنند دارای موتیف متصل شونده به DNA محافظت شده با ۶۰ آمینه‌اسید بنام هومئودُمین است که شبیه موتیف مارپیچ - دور مارپیچ مهارگرهای باکتریایی‌اند. این نوع برای اولین بار در

1- Helix - turn - helix 2- Homeodomain proteins



◀ شکل تجربی ۲۵-۷. (شکل رنگی) پروتئین‌های انگشت روی. (a) این طرح دوبعدی از انگشت‌های روی C_2H_2 شکلی را به تصویر می‌کشد که این موتیف نامش را از آن گرفته است. اسیدهای آمینه منفرد با رنگ ارغوانی هستند. اسیدهای آمینه‌ای که با یون Zn^{2+} تماس دارند به رنگ آبی هستند. (b GL1 پروتئین مونومری است که دارای پنج انگشت روی C_2H_2 است. مارپیچ‌های آلفا بصورت استوانه و یون‌های Zn^{2+} به صورت کروی نشان داده شده‌اند. انگشت ۱ با DNA میانکنش نمی‌دهد در حالی که ۴ انگشت روی دیگر میانکنش می‌دهند. (c) گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی یک پروتئین انگشت روی C_4 هومودیمری است. مارپیچ‌های آلفا به صورت روبان‌های ارغوانی و زنجیره‌های بتا به صورت پیکانهای سبز و یونهای Zn^{2+} به صورت کروی نشان داده شده است. دو مارپیچ آلفا (کدرتر) (یکی در هر مونومر) با DNA میانکنش می‌دهند. مانند همه هومودیمری‌های انگشت روی C_4، این عامل رونویسی متقارن چرخشی دوگانه دارد، مرکز تقارن توسط بیضی زردرنگی نشان داده شده است. در مقابل، گیرنده‌های هسته‌ای هومودیمری تقارن چرخشی نشان نمی‌دهند.

مگس‌های سرکه‌ای شناسایی شد که یک بخش بدن آن‌ها در حین رشد به بخش دیگری تغییر می‌یافت (فصل ۲۲). توالی محافظت شده هومئودُمین در عوامل رونویسی مهره‌داران نیز شناسایی شده است. منجمله آن‌هایی که در رشد انسان نقش کنترلی مهمی دارند.

پروتئین‌های با انگشت روی. تعدادی از انواع مختلف پروتئین‌های یوکاریوتی دارای نواحی هستند که حول یک یون Zn^{2+} تا می‌خورند و یک ساختار فشرده با توالی کوچک از زنجیره پپتیدی می‌سازند (شکل ۲۵a-۷). اصطلاح انگشت روی در ابتدا به عنوان یک موتیف ساختاری که در دُمین متصل شونده به DNA است شناخته شد، اما معلوم شده است که این موتیف در پروتئین‌هایی که به DNA متصل نمی‌شوند نیز وجود دارد. در اینجا ما دو نوع از چندین نوع موتیف‌های انگشت روی را که در عوامل رونویسی یوکاریوتی شناسایی شده را شرح می‌دهیم.

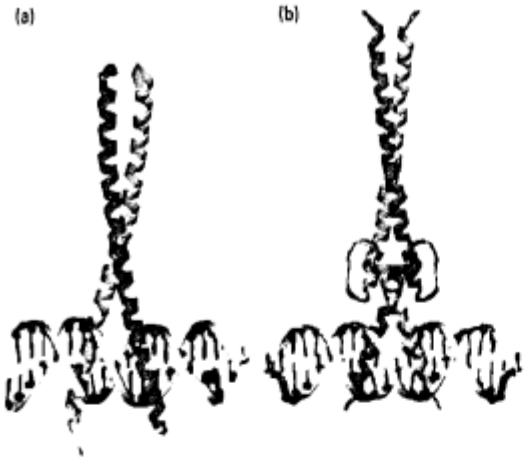
انگشت روی C_2H_2 رایج‌ترین موتیف اتصال شونده به DNA است و ژنوم انسان و اغلب یوکاریوت‌های جانوری پرسلولی آن را رمز می‌کنند. این موتیف در گیاهان هم شایع است ولی مثل جانوران نوع مرسوم دُمین‌های متصل شونده به DNA نیست. این موتیف از ۲۶-۲۳ آمینواسید حفاظت شده تشکیل شده که حاوی دو سیستئین ثابت و دو هیستیدین حفاظت شده است که زنجیره‌های جانبی آن‌ها به Zn^{2+} متصل می‌شود (شکل ۹-۳). به این دلیل اصطلاح انگشت روی مطرح شد که نمای دو بُعدی این موتیف شبیه انگشت است. زمانی که ساختار سه بُعدی این موتیف معلوم شد واضح گردید که اتصال Zn^{2+} توسط دو سیستئین و دو هیستیدین باعث تا خوردگی توالی پلی‌پپتیدی کوچک به یک دُمین فشرده می‌شود که می‌تواند

مارپیچ آلفای خود را وارد شیار بزرگ DNA بکند. تعدادی از عوامل رونویسی حاوی چندین انگشت روی متوالی‌اند که با یکسری متوالی از بازها که در شیار بزرگ قرار دارند میانکنش دارند و مانند پروتئینی عمل می‌کنند که حول مارپیچ دوتایی DNA تاب خورده است (شکل ۲۵b-۷).

نوع دوم انگشت روی بنام C_4 (بخاطر آنکه چهار سیستئین در تماس با Zn^{2+} هستند) است که حدوداً در ۵۰ عامل رونویسی انسانی یافت می‌شود. اولین عضو این خانواده به عنوان پروتئین متصل‌شونده سلولی با میل زیاد برای هورمون‌های استروئیدی شناخته شده و این امر باعث شد آن‌ها را ابرخانواده گیرنده‌های استروئیدی گویند. از آنجا که گیرنده‌های مشابهی در درون سلول برای هورمون‌های غیراستروئیدی نیز شناخته شد، این عوامل رونویسی را امروزه به نام **گیرنده‌های هسته‌ای** می‌شناسند. خصوصیت مشخصه انگشت روی وجود دو گروه از چهار سیستئین ضروری است که هر یک در انتهاهای دُمین ۵۶-۵۵ اسید آمینه‌ای‌اند. هرچند انگشت‌های روی C_4 در ابتدا بخاطر شباهتشان با انگشت روی C_2H_2 نامگذاری شدند ولی بعد از معلوم شدن ساختار سه بُعدی پروتئین‌هایی که حاوی این موتیف متصل شونده به DNA هستند معلوم شد که ساختارشان کاملاً متفاوت است. تفاوت مهم بین این دو آن است که پروتئین‌های انگشت روی C_2H_2 بیشتر به صورت مونومر به DNA متصل می‌شوند و حاوی سه یا تعداد بیشتری واحد انگشتی‌اند، در حالیکه پروتئین‌های انگشت روی C_4 عمدتاً تنها دو واحد انگشتی دارند که به صورت هومودیمر یا هترودیمر به DNA متصل می‌شوند. انواع هومودیمر دُمین متصل شونده به DNA ی انگشت روی C_4 دارای تقارن چرخشی دوگانه‌اند (شکل ۲۵c-۷). در نتیجه گیرنده‌های هسته‌ای هومودیمر به توالی مورد توافقی از DNA متصل می‌شوند که تکرارهای معکوس می‌باشند.

پروتئین‌های زیپ لوسین[1]

این نوع موتیف، ساختار دیگری است که در دُمین‌های متصل شونده به DNA ی دسته بزرگی از عوامل رونویسی وجود دارند که در هر هفتمین نقطه از توالی خود حاوی اسید آمینه هیدروفوب هستند. این پروتئین‌ها به صورت دیمر به DNA متصل می‌شوند و جهش در لوسین‌ها نشان داد که آنها برای دیمر شدن مهم هستند، لذا اصطلاح **زیپ لوسین** برای نشان دادن این موتیف ساختاری به کار رفته است.



▲ **شکل ۲۶-۷. میانکنش پروتئین‌های هومودیمری زیپ لوسین و مارپیچ - حلقه - مارپیچ بازی (bHLH) با DNA.** (a) در پروتئین‌های زیپ لوسین، ریشه‌های بازی در نواحی مارپیچ آلفای امتداد یافته از مونومرها با اسکلت DNA در نزدیکی شیارهای بزرگ میانکنش می‌دهند. دُمین دیمریزاسیون کویل کویل[2] توسط میانکنش‌های آبگریز بین مونومرها پایدار می‌شود. (b) در پروتئین‌های bHLH، مارپیچ‌های اتصال یابنده به DNA در زیر (انتهاهای N مونومرها) توسط حلقه‌های غیرمارپیچی از ناحیه شبه زیپ لوسین دارای دُمین دیمریزاسیون پیچ در پیچ جدا می‌شود.

دُمین متصل شونده به DNA ی عامل رونویسی GCN4 که قبلاً به آن اشاره شد یک زیپ لوسین است. بررسی کریستالوگرافی اشعه x از کمپلکس میان DNA و پروتئین مذکور نشان می‌دهد که پروتئین دیمر دارای دو مارپیچ آلفای طویل است که DNA را مانند قیچی از دو شیار بزرگ مجاور که حدوداً نیم دور در دورشته‌ای DNA از هم فاصله دارند را گیر انداخته‌اند (شکل ۲۶-۷). بخش‌هایی از مارپیچ‌های آلفا که با DNA در تماس هستند شامل اسیدهای آمینه با بار مثبت (بازی) هستند که با فسفات‌های ستون فقرات DNA در تماس‌اند و اسیدهای آمینه دیگری که با بازهای اختصاصی در شیار بزرگ میانکنش دارند.

GCN4 دیمرهایی را از طریق میانکنش‌های هیدروفوب میان انتهای کربوکسیل مارپیچ‌های آلفا تشکیل می‌دهد و ساختار کویل کویل[3] را می‌سازد. این ساختار در پروتئین‌هایی که حاوی مارپیچ‌های دوگانه‌دوست است رایج می‌باشد. در این مارپیچ‌ها اسیدهای آمینه هیدروفوب به طور منظم از هم در طول توالی، سه یا چهار جایگاه فاصله دارند و خطی را در امتدادی از یک طرف مارپیچ آلفا ایجاد

1- Leucine - zipper - proteeins
2- Coiled - coil
3- Coiled-coil

می‌کنند. این خطوط هیدروفوب ناحیه میانکنش کننده را بین دو مارپیچ آلفا در ساختار دیمری کویل کویل ایجاد می‌کنند (شکل ۹a-۳ را ملاحظه کنید).

هرچند که اولین عامل رونویسی زیپ لوسین که مورد بررسی قرار گرفت در هر هفتمین جایگاه دیمر شدن خود حاوی لوسین بود، پروتئین‌های متصل شونده به DNA دیگری شناسایی شدند که در همین جایگاه حاوی اسیدهای آمینه دیگری بودند. مانند پروتئین‌های زیپ لوسین، این پروتئین‌ها دیمرهایی دارای ناحیه دیمری شدن Coiled-coil در انتهای کربوکسیل و ناحیه متصل شونده به DNA در انتهای آمین تشکیل می‌دهند. اصطلاح زیپ بازی[1] (bZIP) امروزه به همهٔ پروتئین‌هایی که چنین ساختاری دارند اطلاق می‌شود. تعدادی از عوامل رونویسی زیپ لوسین بازی هترودیمری از دو توالی متفاوت‌اند که هر یک دُمین زیپ بازی دارند.

پروتئین‌های مارپیچ - حلقه - مارپیچ بازی[2] (bHLH)

دُمین متصل شونده به DNA دیگری که در نوعی از عوامل رونویسی دیمر دیده می‌شود دارای موتیف ساختاری است که خیلی شبیه موتیف زیپ لوسین است بجز آنکه یک حلقه غیرمارپیچی از هر زنجیره پلی‌پپتیدی، دو ناحیه مارپیچ آلفایی در هر مونومر را از هم جدا می‌کند (شکل ۲۶-۷). اصطلاح مارپیچ ـ حلقه - مارپیچ بازی از آنجایی می‌آید که این موتیف را می‌توان از روی توالی اسید آمینه‌ای پروتئینی که حاوی یک مارپیچ آلفای انتهای N با اسید آمینه‌های بازی است و با DNA میانکنش می‌کنند و ناحیه حلقه میانی و یک انتهای کربوکسیل حاوی اسیدهای آمینه هیدروفوب فاصله‌دار که از خصوصیات مارپیچ آلفای دوگانه‌دوست است، شناسایی کرد. همانند پروتئین‌های زیپ بازی، bHLH مختلف نیز می‌توانند هترودیمرهای متفاوت بسازند.

دُمین‌های فعال‌سازی و مهاری که از نظر ساختاری متنوع هستند رونویسی را تنظیم می‌کنند

آزمایشات صورت گرفته با پروتئین‌های امتزاجی حاصل از دُمین اتصالی به DNA از GAL4 و قطعات تصادفی از پروتئین‌های *E.coli* ثابت کرد که توالی‌های متنوعی از اسیدهای آمینه می‌توانند به عنوان دُمین‌های فعال‌سازی عمل کنند (تقریباً یک درصد از تمام توالی‌های *E.coli*)، حتی اگر آنها برای انجام نقش‌های دیگری بوجود آمده باشند. بسیاری از عوامل رونویسی دارای توالی‌های فعال‌سازی می‌باشند که بطور غیرمعمول دارای درصد زیادی از اسیدهای آمینه خاص می‌باشند. بعنوان مثال می‌توان به GAL4، GCN4 و بسیاری از عوامل رونویسی دیگر مخمر اشاره کرد که دارای دُمین‌های فعال‌سازی غنی از اسیدهای آمینه اسیدی (آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید) می‌باشند. این **دُمین‌های فعال‌سازی اسیدی** عموماً توانایی تحریک رونویسی را تقریباً در تمام انواع سلول‌های یوکاریوتی، قارچی، جانوری و گیاهی دارا می‌باشند. دُمین‌های فعال‌سازی بعضی از عوامل رونویسی دروزوفیلا و پستانداران غنی از گلوتامین و در برخی مواقع غنی از پرولین می‌باشند؛ بعضی از عوامل رونویسی نیز هنوز غنی از اسیدهای آمینه سرین و ترئونین، که هر دو دارای گروه هیدروکسیل می‌باشند، هستند. علیرغم این، بسیاری از دُمین‌های فعال‌سازی قوی مخصوصاً غنی از هر اسید امینه خاص نمی‌باشند.

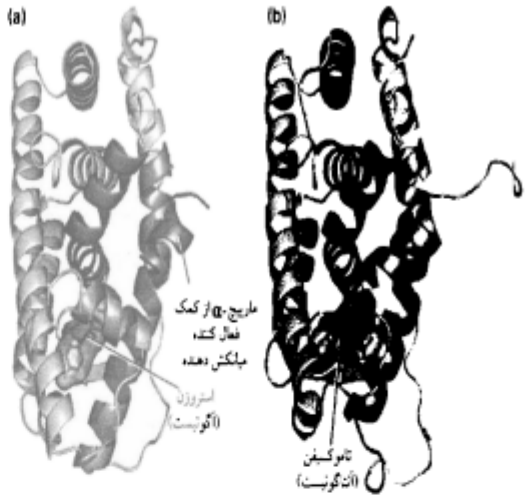
مطالعات بیوفیزیکی نشان داد که دُمین‌های فعالسازی اسیدی دارای یک ساختمان فضایی بدون ساختار و راندم کویل می‌باشند. این دُمین‌ها وقتی که به یک پروتئین کمک فعال‌کننده[3] متصل شوند، باعث تحریک رونویسی می‌گردند. میان کنش با کمک فعال‌کننده، باعث می‌شود که دُمین فعال‌سازی در کمپلکس در کمپلکس دُمین فعال‌سازی - کمک فعال‌کننده، ساختمان فضایی مارپیچ آلفا را به خود بگیرد. یک مثالی از عامل رونویسی دارای دُمین فعال‌سازی اسیدی که بیشتر مطالعه شده است پروتئین CREB پستانداران می‌باشد که در پاسخ به افزایش سطح cAMP فسفریله می‌گردد. این فسفریلاسیون تنظیم شده برای اتصال CREB به کمک فعال‌کننده خودش یعنی CBP (پروتئین اتصالی به CREB) ضروری است و منجر به رونویسی ژن‌هایی که در نواحی کنترلی خود دارای مکان اتصالی CREB می‌باشند، می‌گردد (شکل ۳۱-۱۶ را ملاحظه کنید). وقتی که دُمین فعال‌سازی راندم کویل فسفریله شده CREB با CBP وارد میانکنش می‌گردد، متحمل تغییر کنفورماسیونی می‌گردد و دو مارپیچ آلفا را تشکیل می‌دهد که توسط یک حلقه کوتاهی که به دور دُمین میانکنش دهنده CBP پیچیده شده است، به یکدیگر متصل می‌گردد.

بعضی از دُمین‌های فعال‌سازی بزرگتر هستند و نسبت به دُمین‌های فعال‌سازی اسیدی از ساختارهای منظم‌تری تشکیل شده‌اند. برای مثال، دُمین‌های اتصال به لیگاند گیرنده‌های هسته‌ای

1- Basic zipper (bZIP)

2- Basic Helix - loop - Helix (bHLH)

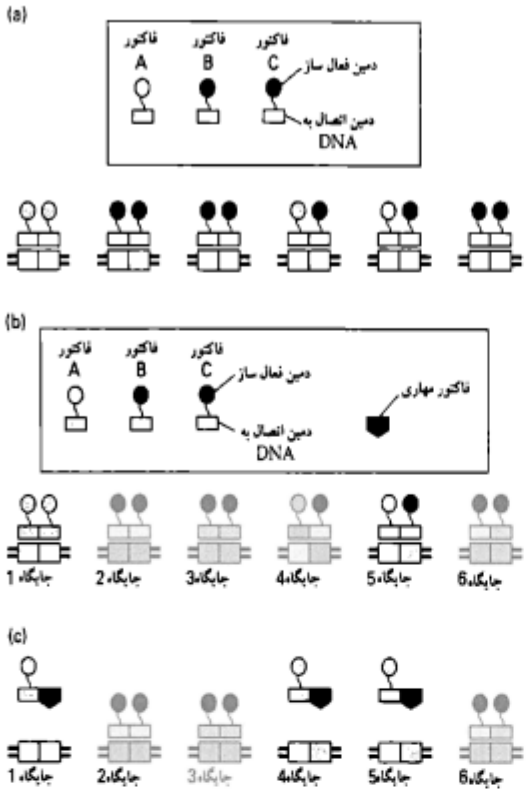
3- Co - activator



▲ **شکل ۲۷-۷ (شکل رنگی) تأثیر اتصال لیگاند بر روی ساختمان فضایی گیرنده استروژنی.** تنها دُمین متصل شونده به لیگاند گیرنده نشان داده شده است. (a) وقتی که استروژن به دُمین متصل می‌شود، مارپیچ آلفای سبز رنگ، با لیگاند میانکنش می‌دهد، باعث ایجاد یک شیار هیدروفوب در دُمین متصل شونده به لیگاند (هلیکس‌های دارای رنگ قهوه‌ای تیره) می‌گردد که به یک مارپیچ آلفای آمفی پاتیک در زیرواحد کمک فعال‌کننده (آبی رنگ) متصل می‌شود. (b) تصور می‌شود ساختمان فضایی گیرنده استروژنی در عدم حضور هورمون، که توسط آنتاگونیست استروژنی تاموکسیفن پایدار می‌گردد. در این ساختمان فضایی، مارپیچ سبز رنگ گیرنده طوری آرایش می‌یابد که با شیار متصل شونده به کمک فعال‌کننده گیرنده فعال میانکنش دهد و به طور فضایی اتصال کمک فعال کننده را مهار کند.

زمانی که لیگاندهایشان به آنها متصل می‌گردد، به عنوان دُمین فعال سازی عمل می‌کنند (شکل ۲۷-۷). اتصال لیگاند باعث القاء تغییر ساختمان فضایی بزرگی می‌گردد که به دُمین اتصالی به لیگاند و هورمون متصل به آن اجازه می‌دهد که با یک مارپیچ آلفای موجود در کمک فعال‌کننده در گیرنده هسته‌ای میانکنش دهد؛ سپس کمپلکس حاصله میتواند رونویسی ژن‌هایی که دارای نواحی کنترلی متصل شونده به گیرنده هسته‌ای هستند را فعال کند.

بنابراین دُمین فعال سازی اسیدی موجود در CREB و دُمین فعال سازی اتصالی به لیگاند موجود در گیرنده‌های هسته‌ای در دو جهت ساختار جداگانه را نشان می‌دهند. دُمین فعال سازی اسیدی CREB راندم کویل است و زمانی که به سطح دُمین گلوبولار موجود در کمک فعال‌کننده متصل می‌گردد به دو مارپیچ آلفا تا می‌خورد. با



▲ **شکل ۲۸-۷ (شکل رنگی) حالت‌های احتمالی مرکب از تشکیل عوامل رونویسی هترودیمر.** (a) در بعضی از عوامل رونویسی، هر مونومر توالی یکسانی از DNA را شناسایی می‌کند. در مثال فرضی که نشان داده شده است عوامل رونویسی A، B، و C با یکدیگر میانکنش می‌دهند و ایجاد دُمین‌های فعال‌سازی با شش حالت مختلف ترکیبی می‌نمایند که تمامی آنها می‌توانند به مکان مشابهی متصل شوند. هر مکان اتصال ترکیب حاصله به دو نیمه تقسیم می‌شود و هر عامل هترودیمری دارای دُمین‌های فعال‌سازی از هر دو مونومر تشکیل‌دهنده خودشان می‌باشند. (b) موقعی که مونومرهای عامل رونویسی توالی‌های متفاوتی از DNA را شناسایی می‌کنند، حالت مختلف ترکیبی سه عامل، هر کدام با ترکیب مشخصی از دُمین‌های فعال‌سازی، به شش توالی متفاوت DNA (مکان‌های ۶-۱) متصل می‌شوند. (c) بیان یک عامل مهاری (قرمز رنگ) که تنها با عامل A میانکنش می‌دهد، مانع اتصال می‌گردد و درنتیجه فعالیت رونویسی در مکان ۱، ۴ و ۵ مهار می‌گردد ولی فعالیت رونویسی در مکان‌های ۲، ۳ و ۶ تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد.

وجود این، دُمین فعال‌سازی اتصال شونده به لیگاند گیرنده هسته‌ای یک دُمین گلوبولار دارای ساختاری می‌باشد که با یک مارپیچ آلفای کوتاه در کمک فعال‌کننده میانکنش می‌دهد. این مارپیچ آلفا ممکن است که قبل از میانکنش بصورت راندم کویل بوده است. در هر دو مورد میانکنش‌های ویژه پروتئین - پروتئین بین کمک فعال‌کننده و دُمین‌های فعال‌سازی، به عوامل رونویسی اجازه می‌دهند که بیان ژن را تحریک کنند.

در حال حاضر درباره ساختار دُمین‌های مهاری اطلاعات کمتری در دسترس است. دُمین‌های گلوبولار متصل شونده به لیگاند بعضی از گیرنده‌های هسته‌ای در غیاب لیگاندهای هورمونی‌شان به عنوان مهارکننده عمل می‌کنند. همانند دُمین‌های فعال سازی، دُمین‌های مهارگر ممکن است کوتاه باشند و از تعداد ۱۵۷ اسید امینه یا کمتر تشکیل شده باشند. مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان می‌دهد که دُمین‌های مهاری نیز باعث میانکنش‌های پروتئین - پروتئین می‌گردند و به پروتئین‌های **کمک مهارگر**[1] متصل می‌گردند و تشکیل کمپلکسی می‌دهند که آغاز رونویسی را طی مکانیسم‌هایی که در ادامه این فصل بحث خواهد شد مهار می‌کنند.

میانکنش‌های عوامل رونویسی گزینه‌های کنترل ژن را افزایش می‌دهد

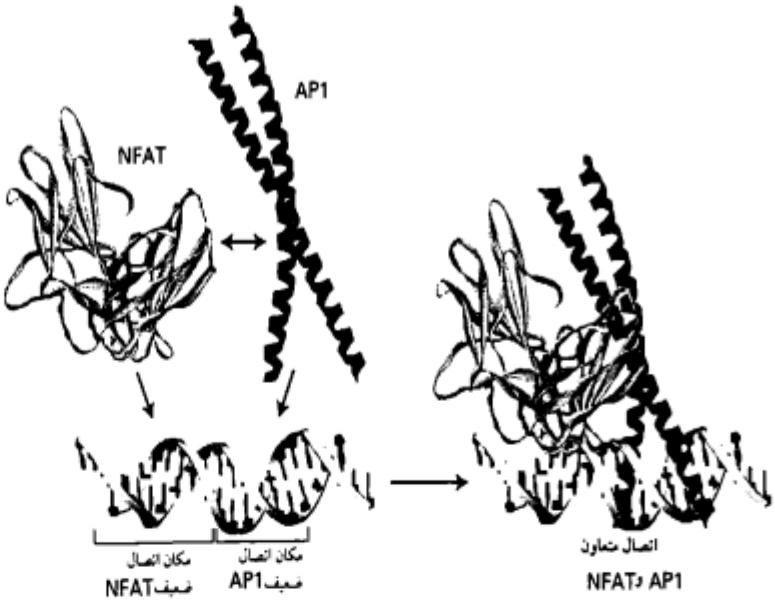
دو نوع پروتئین اتصالی به DNA، که قبلاً بحث گردید (پروتئین‌های زیپ - بازی و bHLH) اغلب به صورت هترودیمر با حالت‌های ترکیبی متفاوتی یافت می‌شوند. دسته‌های دیگر عوامل رونویسی که در اینجا بحث نشده است نیز پروتئین‌های هترودیمر را تشکیل می‌دهند. در برخی از عوامل رونویسی هترودیمر، هر مونومر، توالی‌های مشابهی را شناسایی می‌کند. در این گونه پروتئین‌ها، تشکیل هترودیمرهای متفاوت، تعداد مکان‌های اتصال متفاوت را که مونومرها با آنها عمل می‌کنند را افزایش نمی‌دهد بلکه باعث می‌شود دُمین‌های فعال سازی که با هر مونومری ترکیب می‌گردد در حالت‌های متفاوت در کنار هم قرار بگیرند و به مکان مشابهی متصل شوند (شکل ۲۸a-۷). همانگونه که بعداً مشاهده خواهیم کرد، فعالیت عوامل رونویسی منفرد توسط مکانیسم‌های متعددی تنظیم می‌گردد. درنتیجه یک عنصر تنظیمی DNA، bZIP یا bHLH در ناحیه کنترلی یک ژن ممکن است برحسب اینکه مونومرهای bZIP یا bHLH که به آن مکان متصل می‌شوند در سلول خاصی و در زمان خاصی و اینکه چگونه فعالیت آنها تنظیم می‌گردد، پاسخ‌های رونویسی متفاوتی را باعث شود.

با وجود این در بعضی از عوامل رونویسی هترودیمر، هر مونومر دارای ویژگی اتصال به DNAی متفاوتی می‌باشد. احتمالات ترکیبی حاصله، تعداد توالی‌های احتمالی DNA را که یک خانواده از عامل رونویسی بتواند به آن متصل شود را افزایش می‌دهد. همانطور که در شکل ۲۸b-۷ نشان داده شده است از نظر تئوری سه مونومر متفاوت عامل رونویسی می‌توانند بطور ترکیبی شش عامل همو یا هترودیمر بوجود بیاورد. چهار عامل مونومری متفاوت می‌توانند بطور کلی ۱۰ عامل دیمر؛ ۵ مونومر، ۱۶ عامل دیمر و الی آخر را بوجود آورند. بعلاوه مشخص شده است که عوامل مهاری به بعضی از مونومرهای زیپ بازی و bHLH متصل می‌شوند و اتصال آنها را به DNA مهار می‌کنند. زمانی که این عوامل مهاری بیان می‌شوند، آنها با اتصال به عوامل فعال‌کننده رونویسی، رونویسی را مهار می‌کنند (شکل ۲۸c-۷). قوانینی که بین میانکنش‌های اعضای گروه عوامل رونویسی هترودیمر حاکم است، پیچیده می‌باشند. این پیچیدگی ترکیبی هم تعداد مکان‌های DNA که این عامل‌ها به واسطه آن رونویسی را فعال می‌کنند و هم نحوه تنظیم آنها را وسیع‌تر می‌کند.

تنظیم رونویسی ترکیبی مشابهی نیز بواسطه میانکنش عوامل رونویسی غیرمرتبط متصل به مکان‌های اتصالی نزدیک به هم در DNA صورت می‌پذیرد. مثالی از این مورد، میانکنش دو عامل رونویسی NFAT و AP1 می‌باشد که به مجاورت عنصر نزدیک پروموتر مرکب[2] تنظیم‌کننده ژنی که اینترلوکین 2 (IL-2) را رمز می‌کند، متصل می‌شود. بیان ژن IL-2 برای پاسخ ایمنی حیاتی می‌باشد، اما بیان غیرطبیعی IL2 منجر به بیماری‌های خودایمنی مانند آرتریت روماتوئید می‌گردد. NFAT و AP1 هیچکدام به مکان خودشان در ناحیه کنترلی IL-2 در عدم حضور یکدیگر متصل نمی‌شوند. تمایل این عامل‌ها به توالی‌های ویژه‌شان در DNA برای هر کدام از این عامل‌ها بطور منفرد بسیار پایین است و نمی‌توانند کمپلکس پایداری با DNA بوجود بیاورند. با وجود این وقتی که هر دو NFAT و AP1 موجود هستند، میانکنش‌های پروتئین - پروتئین بین آن‌ها، کمپلکس سه تایی DNA شامل NFAT، AP1 و DNA را پایدار می‌کند (شکل ۲۹-۷). چنین **اتصال تعاونی** DNA از عوامل رونویسی متفاوت منجر به پیچیدگی ترکیبی کنترل رونویسی می‌گردد. درنتیجه، حدود ۲۰۰۰ عامل رونویسی رمز شده توسط ژنوم انسانی می‌تواند بواسطه میانکنش‌های تعاونی بسیار زیادی به DNA متصل شوند و درنتیجه باعث کنترل رونویسی واحدی برای هر کدام از چندین ده هزار ژن انسانی گردد. در مورد IL-2 (رونویسی تنها زمانی رخ می‌دهد که هر دو NFAT فعال گردد، (فعال شدن آن منجر به انتقال آن از سیتوپلاسم به هسته می‌گردد) و هر دو زیرواحد AP1 سنتز شده باشند. این رخدادها توسط مسیرهای انتقال پیام مجزایی

1- Co-repressor

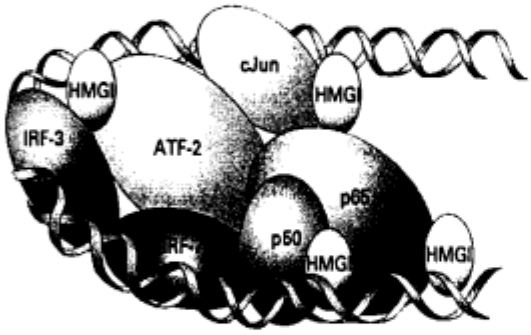
2- Composite promoter - proximal element



◀ شکل ۲۹-۷. اتصال تعاونی دو عامل رونویسی غیرمرتبط به مکان‌های مجاور در یک عنصر کنترلی مرکب. هم NFAT مونومر و هم عامل رونویسی AP1 هترودیمری به تنهایی تمایل کمتری به مکان‌های خودشان در ناحیه نزدیک به پروموتر IL-2 دارند. میانکنش پروتئین - پروتئین بین NFAT و AP1 باعث پایداری کمپلکس DNA- AP1 - NFAT می‌گردد بطوری که دو پروتئین می‌توانند بطور تصادفی به مکان مرکب متصل گردند.

(فصول ۱۵ و ۱۶) کنترل می‌گردند و باعث کنترل دقیق بیان IL-2 می‌گردد.

اتصال تعاونی NFAT و AP1 تنها زمانی اتفاق می‌افتد که مکان‌های اتصال ضعیف آنها در DNA کاملاً در نزدیک هم قرار گرفته باشند. به منظور اتصال مؤثر آن‌ها، بایستی مکان‌های اتصال آنها در فاصله مشخصی از یکدیگر واقع شده باشند. مطالعات اخیر نشان داده است که لازمه اتصال تعاونی در مورد سایر عوامل رونویسی و نواحی کنترلی خیلی دقیق نیست. بعنوان مثال، ناحیه کنترلی EGR-1 دارای مکان اتصالی مرکبی می‌باشد که عوامل رونویسی SRF و TCF بصورت تعاونی متصل می‌شود (شکل ۲۳-۷ را ملاحظه کنید). به دلیل اینکه TCF دارای دُمین طویل و انعطاف‌پذیری است که با SRF میانکنش می‌دهد، دو پروتئین می‌توانند وقتی که مکان‌های اتصالی آنها بر روی DNA حتی تا ۱۰ جفت باز از یکدیگر دور باشند یا حتی نسبت به هم معکوس باشند، به صورت تعاونی متصل گردند.



▲ شکل ۳۰-۷. مدلی از جسم افزایش دهنده که در افزاینده اینترفرون β تشکیل می‌گردد. دو عامل رونویسی مونومر IRF-3 و IRF-7 دو عامل رونویسی هترودیمر Jun/ATF2 و (NF-$\kappa\beta$) p50/p65 ، به چهار عنصر کنترلی بین افزاینده متصل می‌شوند. اتصال تعاونی این عوامل رونویسی توسط HMGI که به شیار کوچک DNA متصل شده است و نیز با دو عامل دیمر مستقیماً میانکنش می‌دهد، تسریع می‌گردد. خمیدگی توالی افزاینده حاصل از اتصال HMGI در تشکیل جسم افزایش دهنده حیاتی می‌باشد. در سایر جسم‌های افزایش دهنده، پروتئین‌های خم‌کننده DNA متفاوتی، عمل مشابه را انجام می‌دهند.

بر روی افزاینده‌ها کمپلکس‌های چندپروتئینی تشکیل می‌شود

همانگونه که قبلاً اشاره گردید، افزاینده‌ها بطور کلی از نظر اندازه تقریباً از ۵۰ تا ۲۰۰ جفت باز متغیر هستند و شامل مکان‌های اتصال برای چندین عامل رونویسی می‌باشند. به نظر می‌رسد که عوامل رونویسی متعددی که به یک افزاینده متصل می‌شوند با یکدیگر میانکنش می‌دهند. بررسی افزاینده حدود ۷۰ جفت بازی که بیان اینترفرون β را تنظیم می‌کند مثال خوبی برای مطالعه میانکنش‌های عوامل رونویسی می‌باشد. اینترفرون β پروتئین دفاعی در برابر عفونت‌های ویروسی در انسان می‌باشد. افزاینده اینترفرون β دارای چهار عنصر کنترلی می‌باشد که به آن بطور خودبخودی چهار عامل رونویسی مختلف متصل می‌گردد. در حضور یک پروتئین کوچک و فراوان بنام *HMGI* که به کروماتین متصل می‌گردد، اتصال عوامل رونویسی مانند اتصال NFAT و AP1 به مکان نزدیک پروموتر

مرکب موجود در ناحیه کنترلی IL-2، شدیداً تعاونی می‌باشد (شکل ۲۹-۷). این اتصال تعاونی باعث می‌شود که کمپلکس چندپروتئینی بر روی DNA افزاینده اینترفرون تشکیل گردد (شکل ۳۰-۷). وقتی که عوامل رونویسی بطور تعاونی به مکان‌های متعدد خودشان در افزاینده‌ها متصل می‌شوند، به منظور توصیف این کمپلکس نوکلئوپروتئینی بزرگ تشکیل شده از واژه **جسم افزایش‌دهنده**[1] استفاده می‌شود.

HMGI صرفنظر از توالی DNA به شیار کوچک متصل می‌گردد و درنتیجه باعث خم شدن مولکول DNA می‌گردد، خم شدن DNAی افزاینده باعث می‌گردد که عوامل رونویسی بطور صحیح میانکنش دهند. میانکنش‌های ذاتی ضعیف و غیرکووالان پروتئین - پروتئین بین عوامل رونویسی با اتصال آنها به مکان‌های مجاور در DNA قوی می‌گردد که باعث می‌شود پروتئین‌ها در غلظت نسبی بسیار بالایی حفظ شوند.

به دلیل وجود نواحی انعطاف‌پذیر بین دُمین‌های اتصالی به DNA و دُمین‌های فعال‌سازی و مهاری در عوامل رونویسی (شکل ۲۲-۷ را ملاحظه کنید) و توانایی پروتئین‌های متصل به DNA در خم کردن آن، در فضای بین عناصر تنظیمی در نواحی کنترل رونویسی انحراف قابل توجهی بوجود می‌آید. این ویژگی احتمال دارد در تکامل سریع کنترل ژنی در یوکاریوت نقش داشته است. جابجایی توالی‌های DNA و نوترکیبی بین توالی‌های تکراری در طی تکامل احتمالاً باعث بوجود آمدن نوترکیبی‌های جدید در عناصر کنترلی گردیده است و متحمل انتخاب طبیعی گردیده و چون مفید بوده است، حفظ شده است. وسعت توانایی موجود بین عناصر تنظیمی نسبت به حالتی که محدودیت شدید فضایی بین عناصر تنظیمی وجود دارد، مانند بسیاری از ژن‌های باکتریایی، باعث گردیده است که اختلاط عملکردی بیشتری در طی تکامل بوجود بیاید.

نکات کلیدی بخش ۴-۷

فعالسازها و مهارگرهای رونویسی

■ عوامل رونویسی که رونویسی را تحریک یا مهار می‌کنند به عناصر تنظیمی نزدیک پروموتری و افزاینده‌ها در DNAی یوکاریوتی متصل می‌شوند.

■ فعالسازها و یا مهارگرهای رونویسی عموماً پروتئین‌های تنظیمی هستند که دارای یک دُمین اتصال یابنده به DNA و یک و یا تعدادی دُمین فعالسازی (برای فعال‌کننده‌ها) می‌باشند. دُمین‌های متفاوت با حد زیادی از طریق نواحی پلی‌پپتیدی انعطاف‌پذیر به هم متصل شده‌اند (شکل ۲۲-۷ را ملاحظه کنید).

■ در بین بیشترین موتیف‌های ساختاری مشترک یافت شده در دُمین‌های اتصال یابنده به DNA از عوامل رونویسی یوکاریوتی انگشت روی C_2H_2 هومئودُمین، مارپیچ - حلقه - مارپیچ بازی (bH2H) و زیپ لوسین هستند. همه آنها و بسیاری از موتیف‌های اتصال یابنده به DNA دارای یک یا بیشتر مارپیچ آلفا هستند که با شیارهای اصلی و در جایگاه مرتبط در DNA میانکنش می‌دهند.

■ دُمین‌های فعالسازی و مهارگری در عوامل رونویسی تعداد متنوعی از توالی‌های آمینواسیدی و ساختارهای سه‌بعدی را دارند. در کل این دُمین‌های عملکردی با کمک فعالسازها و کمک مهارگرها میانکنش می‌دهند که برای توانایی عوامل رونویسی به منظور تنظیم بیان ژن ضروری هستند.

■ نواحی کنترلی رونویسی اغلب ژن‌ها، دارای جایگاه‌های اتصالی برای عوامل رونویسی چندگانه هستند. رونویسی چنین ژن‌هایی بسته به سریهای خاص از عوامل رونویسی که در یک سلول خاص و در زمان معینی فعال می‌شوند تفاوت دارد.

■ پیچیدگی ترکیبی در کنترل رونویسی، نتیجه ترکیبات متناوب مونومرهایی است که عوامل رونویسی هترودیمر را تشکیل می‌دهند (شکل ۸-۷ را ملاحظه کنید) و همچنین نتیجه اتصال تعاونی عوامل رونویسی به جایگاه‌های کنترلی مرکب است.

■ اتصال تعاونی فعالسازهای چندگانه در نزدیکی جایگاههای یک افزاینده، کمپلکس چند پروتئین با نام جسم افزایش‌دهنده را ایجاد می‌کند (شکل ۳۰-۷ را ملاحظه کنید). تجمع اجسام افزایش‌دهنده اغلب نیاز به پروتئین‌های کوچکی دارد و به شیار کوچک DNA متصل می‌شوند و DNA را به طور بارزی خم می‌کند و اجازه می‌دهد پروتئین‌های اتصال یافته در دو طرف از خمش ایجاد شده با سرعت زیادی میانکنش دهند.

۵-۷ آغاز رونویسی توسط RNA پلی‌مراز II

در بخش‌های قبلی، بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی و توالی‌های DNA که در رونویسی و کنترل آن مشارکت دارند بحث و معرفی گردید. در این بخش، ما بر روی آرایش **کمپلکس‌های پیش**

1- Enhancesome

آغازی رونویسی[1] تمرکز خواهیم کرد. کمپلکس پیش آغازی از اتصال RNA پلیمراز II و چندین عامل پروتئینی آغازی حاصل می‌شود که در مکان آغاز رونویسی تجمع می‌یابند و شروع به باز کردن DNA کرده و ژن را برای رونویسی آماده می‌کنند. به یاد بیاورید که این RNA پلیمراز II یوکاریوتی سنتز mRNA ها و تعداد کمتری از RNA های کوچک هسته‌ای (SnRNA ها) را کاتالیز می‌کند. پروتئین‌های فعال کننده و مهارکننده ویژه‌ای، مکانیسم‌هایی که تجمع کمپلکس‌های پیش آغازی رونویسی PolIII را کنترل می‌کند تنظیم می‌کنند و بنابراین سرعت رونویسی ژن‌های رمزکننده پروتئینی را تنظیم می‌کنند که در بخش بعدی بحث خواهد شد.

عوامل رونویسی عمومی RNA پلیمراز II را در مکان‌های آغاز قرار داده و به آغاز رونویسی کمک می‌کنند

رونویسی در لولهٔ آزمایش (*In Vitro*) توسط RNA پلیمراز II تخلیص شده، نیاز به چندین عامل رونویسی دارد که در هنگام تخلیص از پلیمراز جدا شده‌اند. این عوامل آغازی که باعث قرارگیری مولکول‌های پلیمراز در مکان‌های آغاز رونویسی و ذوب شدن رشته‌های DNA می‌گردد تا رشته الگو در مکان فعال آنزیم قرار گیرد، **عوامل رونویسی عمومی** نامیده می‌شوند. برخلاف عوامل رونویسی که در بخش قبل بحث گردید (که به مکان‌های ویژه‌ای در تعداد محدودی از ژن‌ها متصل می‌گردد) عوامل رونویسی عمومی برای سنتز RNA از بسیاری از ژن‌ها لازم می‌باشند.

عوامل رونویسی عمومی که به PolIII در آغاز رونویسی از پروموترهای جعبه TATA در *In Vitro* کمک می‌کنند جداسازی و بررسی شده‌اند. این پروتئین‌ها به صورت TFIIA، TFIIB و غیره نمایش داده می‌شوند و بسیاری از آنها پروتئین‌های چندتایی می‌باشند. بزرگ‌ترین آنها TFIIB می‌باشد که از **یک پروتئین اتصال شونده به جعبه TATA**[2] (TBP) ۳۸ کیلودالتونی و ۱۳ عامل اتصال شونده به TBP (TAFs) تشکیل شده است. عوامل رونویسی عمومی با فعالیت مشابهی از سلول‌های انسانی کشت داده شده، کبد موش رت، جنین، دروزوفیلا و مخمر جداسازی شده است. ژن‌هایی که در مخمر این پروتئین‌ها را رمز می‌کنند به عنوان بخشی از توالی ژنومی کامل مخمر تعیین توالی شده‌اند، و بسیاری از cDNA هایی که عوامل رونویسی عمومی PolIII انسانی و دروزوفیلا را رمز می‌کنند کلون و تعیین توالی شده است. در همه موارد عوامل رونویسی عمومی یوکاریوت‌های متفاوت، شدیداً حفاظت شده‌اند.

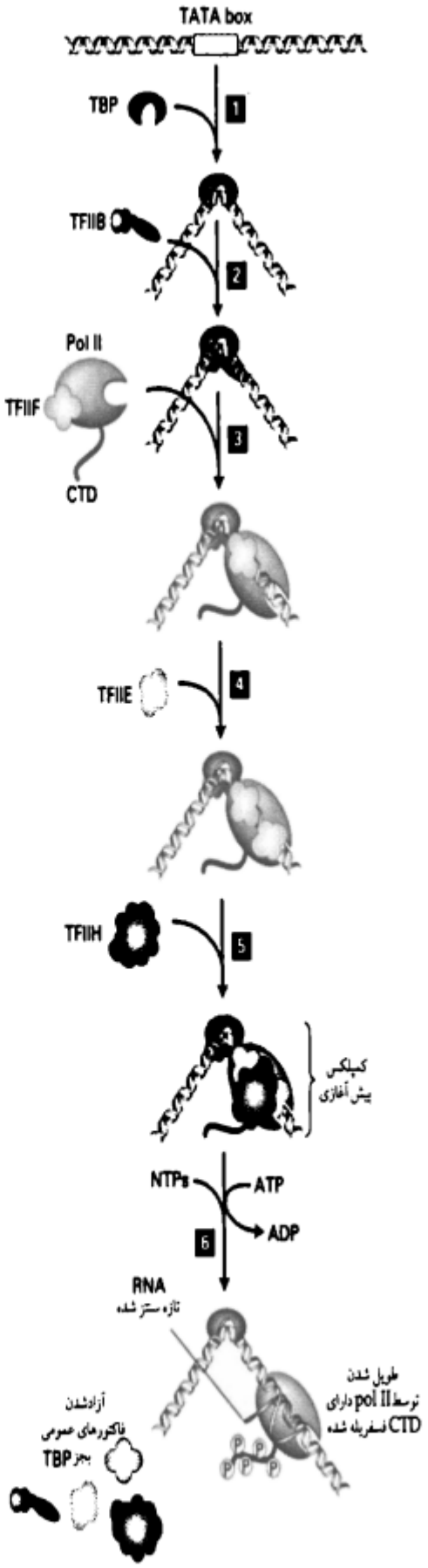
تجمع متوالی پروتئین‌ها باعث تشکیل کمپلکس پیش آغاز رونویسی Pol II در *In Vitro* می‌گردد

کمپلکس RNA پلیمراز II و عوامل رونویسی عمومی متصل به پروموتر آن و کمپلکس آماده برای آغاز رونویسی، **کمپلکس پیش آغازی** نامیده می‌شود. درک چگونگی تجمع کمپلکس پیش آغازی بر روی پروموتر مهم است زیرا اساساً هر مرحله از فرایند را می‌توان کنترل کرد و فرایند آغاز رونویسی را تنظیم کرد. به منظور تعیین نظم موجود در اتصال Pol II و عوامل رونویسی عمومی به پروموترهای جعبه TATA از آزمایشات رد پایایی DNAse I و تغییر تحرک الکتروفورتیکی استفاده می‌شود. به دلیل اینکه تخلیص کامل TFIID چند زیرواحدی مشکل است، محققان در این آزمایشات تنها از اجزای جدا شده عامل رونویسی عمومی TBF استفاده کردند. Pol II می‌تواند رونویسی را در *In Vitro* بدون حضور سایر زیرواحدهای TFIID آغاز کند.

شکل ۳۱-۷ درک امروزی ما را از تجمع مرحله به مرحله کمپلکس پیش آغازی رونویسی Pol II در *In Vitro* به طور خلاصه نشان می‌دهد. TBP اولین پروتئینی است که به جعبه TATA در پروموتر متصل می‌شود. همه TBP هایی که تا به حال آنالیز شده‌اند دارای ۱۸۰ ریشه بسیار مشابه در دُمین انتهای -C خود می‌باشند. توالی این ناحیه در پروتئین‌های مخمری و انسانی ۸۰ درصد مشابه است و اغلب اختلافات نیز جایگزین‌های حفاظت شده می‌باشند. این دُمین انتهای -C حفاظت شده بعلاوه پروتئین کامل در رونویسی *In Vitro* نقش دارند. (دُمین انتهای TBP - N، که شدیداً از نظر توالی و طول در میان یوکاریوت‌های مختلف متغیر می‌باشد، در رونویسی کاتالیز شده توسط Pol II از ژن‌هایی که SnRNA ها را رمز می‌کنند نقش دارد). TBP مونومری است که به صورت ساختاری به شکل زین تا می‌خورد؛ دو نیمه مولکول تقارن دوتایی را نشان می‌دهند ولی مشابه نمی‌باشند. همانند HMGI و سایر پروتئین‌های خم‌کننده DNA که در تشکیل اجسام افزایش‌دهنده نقش دارند، TBP با شیار کوچک DNA میانکنش می‌دهد و مارپیچ DNA را بطور قابل ملاحظه‌ای خم می‌کند (شکل ۵-۴ را ملاحظه کنید). سطح اتصالی DNA در TBP در تمام یوکاریوت‌ها حفاظت شده است که حفاظت شدید پروموتر جعبه

1- Transcripition prenitiation complexes

2- TATA box-Binding Protein (TBP)



شکل ۳۱-۷ تجمع کمپلکس پیش آغازی RNA پلیمراز II در *In Vitro* عوامل رونویسی عمومی نشان داده شده و RNA پلیمراز II (PolII) تخلیص شده بطور پی در پی به DNA جعبه TATA متصل می‌گردند و کمپلکس پیش آغازی را تشکیل می‌دهند. سپس هیدرولیز ATP توسط زیرواحد TFIIA انرژی لازم برای باز کردن DNA را تأمین می‌کند. وقتی که PolII رونویسی را از کمپلکس باز حاصله آغاز می‌کند، پلیمراز از پروموتر دور می‌شود و CTD آن فسفریله می‌گردد. در *In Vitro*، عوامل رونویسی عمومی (به استثنای TBP) از کمپلکس پروموتر - TBP تفکیک می‌گردد، ولی هنوز مشخص نشده است که کدام عامل‌ها بعد از هر دو آغاز رونویسی در *In Vivo* به نواحی پروموتر متصل باقی می‌مانند.

TATA را توضیح می‌دهد (شکل ۱۲-۷ را ملاحظه کنید).

وقتی که TBP به جعبه TATA متصل شد، TFIIB می‌تواند متصل شود. TFIIB پروتئین مونومری می‌باشد که نسبتاً از TBP کوچک‌تر است. دُمین انتهای -C TFIIB در یک سمت جعبه TATA با TBP و DNA وارد میانکنش می‌شود، در حالی که دُمین انتهای - N آن به سمت مکان آغاز رونویسی کشیده شده است. بعد از اتصال TFIIB، کمپلکس تترامر TFIIF به Pol II متصل می‌شود و پلیمراز در مکان آغاز قرار می‌گیرد. در بسیاری از پروموترها، قبل از اینکه DNA دورشته‌ای بتواند جدا شود و رشته الگو آشکار شود بایستی دو عامل رونویسی عمومی دیگر متصل گردد. اولین عامل TFIIE تترامر می‌باشد که بعد از اتصال، یک مکان لنگرگاه برای TFIIH ایجاد می‌کند. TFIIH عامل چندتایی دیگری است که دارای ۱۰ زیرواحد است. اتصال TFIIH تجمع کمپلکس پیش آغازی را در *In Vitro* تکمیل می‌کند (شکل ۳۱-۷). شکل ۳۲-۷ مدل رایج ساختار کمپلکس پیش آغازی را نشان می‌دهد.

فعالیت **هلیکازی** یکی از زیرواحدهای TFIIH با کمک هیدرولیز ATP باعث باز کردن زنجیره دوتایی DNA در مکان آغاز می‌گردد، این فعالیت باعث می‌گردد که DNAی دو رشته‌ای در مکان آغازی ذوب گردد و رشته الگو به جایگاه فعال پلیمراز متصل شود. هرگاه ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌ها موجود باشند، Pol II شروع به نسخه‌برداری از رشته الگو می‌کند. وقتی که پلیمراز شروع به دور شدن از ناحیه پروموتر می‌کند، زیرواحد دیگری از TFIIH ، CTDی Pol II را در چند جایگاه فسفریله می‌کند (شکل ۳۱-۷ را ملاحظه کنید). در آزمایش رونویسی در *In Vitro* که تنها شامل عوامل رونویسی عمومی و RNA پلیمراز II می‌باشد، وقتی که پلیمراز از ناحیه پروموتر دور می‌شود TBP به جعبه TATA به

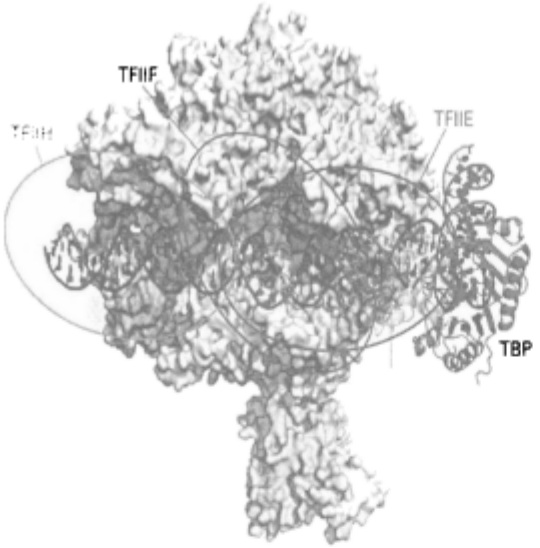
صورت متصل باقی می‌ماند، اما سایر عوامل رونویسی عمومی جدا می‌شوند.

اولین زیرواحد TFIIH که قرار بود از انسان کلون شود، به دلیل اینکه جهش‌های موجود در ژن رمزکننده آنها موجب بروز نارسایی‌هایی در ترمیم DNA آسیب دیده می‌گردید، شناسایی شد. در اشخاص سالم، وقتی که RNA پلیمراز در حال رونویسی، در ناحیه DNAی الگوی آسیب دیده متوقف شد، به نظر می‌رسد که یک زیرکمپلکسی از TFIIH پلیمراز متوقف شده را شناسایی می‌کند و سپس سایر پروتئین‌های درگیر در تعمیر ناحیه آسیب دیده DNA را فرا می‌خواند. در بیمارانی که دارای زیرواحدهای جهش یافته TFIIH می‌باشد، چنین تعمیرهایی در ژن‌های فعال از نظر رونویسی صورت نمی‌گیرد. در نتیجه افراد مبتلا حساسیت شدیدی به نور خورشید دارند (علت اصلی آسیب DNA) و وقوع سرطان در آنها بالاست. برحسب شدت نقص در عملکرد TFIIH، این افراد از بیماری‌هایی مانند گزرودرما پیگمنتوزوم[1] و سندرم کوکائین[2] رنج می‌برند (فصل ۲۵).

آغاز رونویسی در in vivo توسط Pol II به پروتئین‌های دیگری نیاز دارد

اگرچه عوامل رونویسی عمومی مورد بحث در فوق به Pol II اجازه می‌دهند در *In Vitro* رونویسی را آغاز کند، یک عامل رونویسی دیگری (TFIIA) برای آغاز رونویسی توسط Pol II در *invivo* ضروری است. TFIIA تخلیص شده با TBP و DNAی جعبه TATA کمپلکس تشکیل می‌دهد. کریستالوگرافی اشعه x از این کمپلکس نشان می‌دهد که TFIIA با سمتی از TBP که در بالادست مسیر رونویسی است، وارد میانکنش می‌گردد. آزمایشات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که در سلول‌های یوکاریوت‌های عالی، TFIIA و TFIID، با تمام زیرواحدهای TAF خودش، ابتدا به DNAی جعبه TATA متصل می‌شود و سپس سایر عوامل رونویسی عمومی مطابق با شکل ۳۱-۷ متصل می‌گردد.

به نظر می‌رسد که زیرواحدهای TAF از TFIID نقش مهمی را در آغاز رونویسی از پروموترهای بدون جعبه TATA بازی می‌کند. برای مثال، بعضی از زیرواحدهای TAF با عنصر آغازی موجود در پروموترهایی که آن در آنجا یافت می‌شود تماس برقرار می‌کنند که احتمالاً می‌تواند چگونگی جایگزینی چنین



▲ **شکل ۳۲-۷ (شکل رنگی) مدلی از ساختار یک کمپلکس پیش آغازی RNA پلیمراز II.** RNA پلیمراز II مخمر بصورت مدل فضاپرکن مشخص شده است و جهت رونویسی به سمت چپ می‌باشد. رشته الگوی DNA به رنگ آبی تیره و رشته غیرالگو، به رنگ قرمز نشان داده شده است. مکان آغاز رونویسی به صورت جفت بازهای قرمز و آبی تیره و مدل فضاپرکن نشان داده شده است. TBP و TFIIB به صورت ردپای کرمی شکل سبز و زرد رنگ اسکلت پلی پپتیدی نشان داده شده است. ساختارهای F و TFIIE و H هنوز با تفکیک بالایی تعیین نشده است. جایگاه تقریبی آنها در DNAی کمپلکس پیش آغازی توسط بیضی‌هایی برای TFIIE (آبی روشن)، TFIIF (قرمز) و TFIIH (نارنجی) مشخص گردیده است.

توالی‌هایی را جعبه TATA توضیح دهد. زیرواحدهای TAF دیگر TFIID می‌توانند به یک توالی مورد توافق A/G-G-A/T-C-G-T-G که در ۳۰ جفت باز بالادست مکان آغاز رونویسی بسیاری از ژن‌های فاقد پروموتر جعبه TATA واقع شده است متصل شوند. این توالی تنظیمی به دلیل موقعیتش **عنصر پروموتری پایین دست**[3] (DPE) نامیده می‌شود. DPE رونویسی ژن‌هایی که دارای TATA کمتری هستند را با افزایش اتصال TFIID تسهیل می‌کند.

علاوه بر عوامل رونویسی عمومی، فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌های ویژه‌ای رونویسی ژن‌ها توسط Pol II را تنظیم می‌کنند. در بخش بعد ما بررسی می‌کنیم که چگونه این پروتئین‌های تنظیمی، آغاز رونویسی Pol II را تنظیم می‌کنند.

1- Xeroderma Pigmentosum
2- Cockayne's syndrome
3- Down stream promoter elements (DPE)

نکات کلیدی بخش ۵-۷

آغاز رونویسی توسط RNA پلیمراز II

■ رونویسی ژن‌های رمزکننده پروتئین توسط RNA پلیمراز II می‌تواند در In vitro توسط اتصال ترتیبی به صورت زیر آغاز شود: TBP، که به DNAی جعبه TATA متصل می‌شود، TFIIB؛ کمپلکسی از TFIIF و پلیمراز II و TFIIE و در نهایت TFIIH متصل می‌شود.

■ فعالیت هلیکازی زیرواحد TFIIH رشته‌های الگو را در جایگاه شروع اغلب پروموترها جدا می‌کند که این فرآیند نیازمند هیدرولیز ATP است. همچنانکه پلیمراز II رونویسی را دور از جایگاه شروع آغاز می‌کند، CTD آن توسط زیرواحد TFIIH دیگر فسفریله می‌شود.

■ شروع رونویسی در *In Vivo* توسط پلیمراز II (در اغلب متازوئن‌ها) نیاز به TFIIA دارد. یک پروتئین TFIID کامل شامل زیرواحد TAF چندگانه و همچنین زیرواحد TBP است.

۶-۷ مکانیسم‌های مولکولی مهار و فعالیت رونویسی

مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌هایی که به مکان ویژه در سطح DNA متصل می‌شوند و بیان ژن‌های رمزکننده را تنظیم می‌کنند طی دو مکانیسم عمومی عمل می‌کنند. ابتدا، این پروتئین‌های تنظیمی با همکاری سایر پروتئین‌ها، ساختار کروماتین را تنظیم می‌کنند و اتصال عوامل رونویسی به پروموترها را مهار یا تحریک می‌کنند. در فصل ۶ گفته شد که DNAی سلول‌های یوکاریوتی آزاد نیست و شدیداً با پروتئین‌هایی پوشیده شده است و تشکیل کروماتین را می‌دهد. واحدهای ساختمانی پایه کروماتین **نوکلئوزوم** می‌باشد که از ۱۴۷ جفت باز DNA تشکیل شده است که به صورت محکم به دور هسته دیسکی شکل پروتئین‌های **هیستونی** پیچیده شده است. ریشه‌های اسید آمینه‌ای ناحیه انتهای N هر هیستون، و نواحی انتهای C هیستون‌های H2A و H2B **دم‌های هیستونی** نامیده می‌شوند و از سطح نوکلئوزوم‌ها بیرون کشیده شده‌اند و می‌توانند بطور برگشت‌پذیری تغییر یابند (شکل ۶-۳۱b را ملاحظه کنید). چنین تغییراتی (مخصوصاً استیلاسیون دم‌های هیستون H3 و H4) فشردگی نسبی کروماتین را تغییر می‌دهد و درنتیجه دسترسی آن را به پروتئین‌های دیگر، در آغاز رونویسی ممکن می‌سازد. علاوه بر نقش فعال‌کننده‌ها و مهارگرها در کنترل رونویسی با واسطه کروماتین، با این پروتئین‌ها کمپلکس بزرگ پروتئینی بنام **واسطه‌گر کمپلکس رونویسی**[1] یا بطور ساده **واسطه‌گر** نیز میانکنش می‌دهد. این کمپلکس نیز به نوبه خود به Pol II متصل می‌شود و مستقیماً تجمع کمپلکس‌های پیش آغازی رونویسی را تنظیم می‌نماید.

در این بخش ما یافته‌های موجود درباره اینکه چگونه مهارگرها و فعال‌کننده‌ها ساختار کروماتین و تجمع کمپلکس پیش آغازی را کنترل می‌کنند مرور می‌کنیم. در بخش بعدی این فصل ما بحث می‌کنیم که چگونه غلظت و فعالیت فعال‌کننده‌ها و مهارگرها تنظیم می‌گردد تا بیان ژن دقیقاً برحسب نیاز سلول و موجود زنده صورت بگیرد.

تشکیل هتروکروماتین بیان ژن را در تلومرها، نزدیک سانترومرها و سایر نواحی خاموش می‌کند

سالیان درازی است که مشخص شده ژن‌های غیرفعال سلول‌های یوکاریوتی اغلب در **هتروکروماتین**، (نواحی از کروماتین که دارای فشردگی خیلی زیاد است و در رنگ‌آمیزی DNA نسبت به **یوکروماتین** بصورت تیره‌تر رنگ می‌گردد) قرار دارند؛ در یوکروماتین بسیاری از ژن‌هایی که رونویسی می‌شوند قرار گرفته‌اند (شکل ۶-۳۳a را ملاحظه کنید). نواحی کروموزومی نزدیک سانترومرها و تلومرها و نواحی ویژهٔ دیگری که برحسب انواع سلولی متفاوت است هتروکروماتین می‌باشند. DNAی هتروکروماتین نسبت به DNAی یوکروماتین دسترسی کمتری به پروتئین‌هایی که از خارج اضافه می‌شوند، دارند و در نتیجه اغلب به عنوان کروماتین «بسته» در نظر گرفته می‌شود. به عنوان مثال، در آزمایشی که در فصل ۶ توضیح داده شد، مشخص شد که DNAی ژن‌های غیرفعال نسبت به DNAی ژن‌های رونویسی شده نسبت به هم مقاومت بیشتری دارند (شکل ۶-۳۲ را ملاحظه کنید).

مهار با واسطه کروماتین در مخمر. مطالعه نواحی از DNAی ساکارومایسس سرویزیه که همانند هتروکروماتین یوکاریوت‌های عالی می‌باشد درک اولیه‌ای از **مهار با واسطه کروماتین** را فراهم کرد. این مخمر می‌تواند هم به صورت سلول‌های هاپلوئید و هم به صورت سلول‌های دیپلوئید رشد کند. سلول‌های هاپلوئید یکی از دو گونه جفت‌گیرنده ممکن بنام a و α را نشان می‌دهد. سلول‌های گونه جفت گیرنده متفاوت می‌توانند «جفت‌گیری» کنند یا الحاق شوند و سلول دیپلوئیدی را بوجود آورند (شکل ۶-۱ را ملاحظه کنید). زمانی که

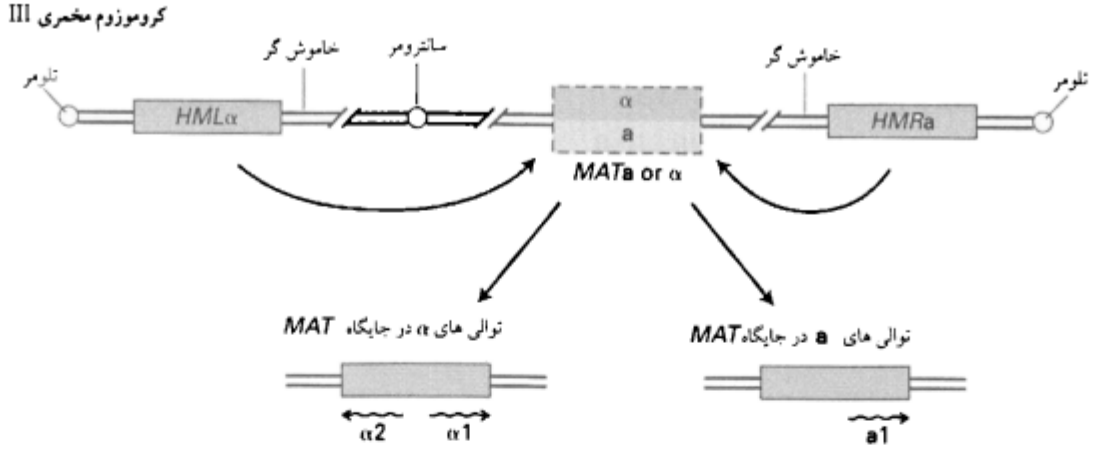
1- Mediator of transcription factor

سلول هاپلوئید به طریقه جوانه‌زنی تقسیم می‌شود، سلول بزرگ «**مادری**» گونه جفت گیرنده خود را تغییر می‌دهد (شکل ۱۷-۲۱ را ملاحظه کنید). بررسی‌های ژنتیکی و مولکولی نشان داد که سه لوکوس ژنتیکی موجود در کروموزوم III مخمری گونه جفت گیرنده سلول‌های مخمری را کنترل می‌کند (شکل ۳۳-۷). تنها لوکوس گونه جفت گیرنده اصلی، بنام MAT، فعالانه رونویسی می‌گردد. اینکه چگونه پروتئین‌ها در لوکوس MAT رمز می‌گردند تعیین‌کننده فنوتیپ a یا α می‌باشد که در فصل ۲۱ توضیح داده شده است. دو لوکوس اضافی دیگر، بنام‌های HML و HMR که به ترتیب در نزدیک تلومر چپ و راست قرار گرفته است، دارای نسخه‌های «خاموش» (غیررونویسی‌شده) از ژن‌های a یا α می‌باشد. در هنگام تقسیم سلولی این توالی‌ها توسط نوعی نوترکیبی غیرمتقابل بین کروماتیدهای خواهری از HMLα یا HMRa به لوکوس MAT انتقال می‌یابد. زمانی که لوکوس MAT دارای توالی DNAی HMLα باشد، سلول‌ها مانند سلول‌های α رفتار می‌کنند. وقتی که لوکوس MAT دارای توالی DNAی HMRa باشند سلول‌ها همانند سلول‌های a رفتار می‌کنند.

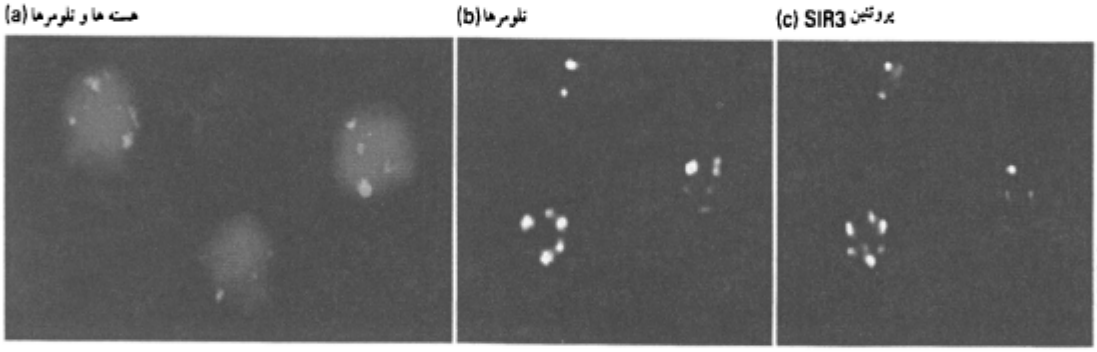
چیزی که قابل توجه است این می‌باشد که رونویسی لوکوس‌های خاموش گونه جفت گیرنده در HML و HMR مهار می‌گردد. هرگاه ژن‌های موجود در این لوکوس‌ها بیان گردند، مثلاً در مخمرهای جهش یافته که در مکانیسم مهاری خودشان دارای نقص هستند، هم پروتئین‌های α و هم a بیان می‌گردند و باعث می‌شوند که سلول‌ها همانند سلول‌های دیپلوئید رفتار کنند که توانایی جفت شدن ندارند. پروموترها و UAS هایی که رونویسی ژن‌های a و α را کنترل می‌کنند در نزدیکی مرکز توالی‌هایی از DNA که انتقال یافته است قرار گرفته‌اند و صرف نظر از اینکه توالی‌ها در لوکوس MAT یا در یکی از لوکوس‌های خاموش قرار گرفته باشند، مشابه می‌باشند. این امر نشان می‌دهد فعالیت عوامل رونویسی که با این توالی‌ها میانکنش می‌کنند باید تا حدودی در HML و HMR و نه در لوکوس MAT مهار گردد. این مهار لوکوس‌های خاموش بستگی به **توالی‌های خاموش‌کننده** دارد که در نزدیک ناحیه DNAی انتقال یافته در HML و HMR قرار گرفته است (شکل ۳۳-۷). هرگاه خاموش‌کننده حذف گردد، لوکوس خاموش مجاور رونویسی می‌گردد. بطور قابل ملاحظه‌ای هر ژنی که به کمک تکنیک‌های DNA نوترکیب در نزدیکی توالی خاموش کننده گونه جفت گیرنده مخمر قرار بگیرد مهار یا «خاموش» می‌گردد، این ژن حتی اگر ژن tRNA باشد که توسط RNA پلیمراز III که از عوامل رونویسی عمومی متفاوتی نسبت به RNA پلیمراز II استفاده می‌کند، رونویسی می‌شود.

مدارک زیادی وجود دارند که نشان می‌دهد مهار لوکوس‌های HML و HMR ناشی از ساختار فشرده کروماتین می‌باشد که از نظر فضایی مانع میانکنش عوامل رونویسی با DNA می‌گردد. در یک آزمایش، ژنی که باعث رمز کردن آنزیم متیله کننده ریشه‌های آدنین در توالی GATC از *E.coli* می‌گردید تحت کنترل پروموتر مخمری وارد سلول‌های مخمر گردید و بیان شد. محققان دریافتند که توالی‌های GATC در لوکوس MAT و بیشتر نواحی دیگر ژنوم این سلول‌ها متیله گردید، اما در لوکوس‌های HML و HMR متیله نگردید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که DNAی لوکوس‌های خاموش غیرقابل دسترسی به متیلاز *E.coli* و بطور کلی به پروتئین‌هایی مانند عوامل رونویسی و RNA پلیمراز می‌باشد. آزمایشات مشابه انجام گرفته با مخمرهای جهش یافته در هیستون‌های مختلف نشان داد که به منظور تشکیل ساختار کروماتینی کاملاً مهار شده، میانکنش‌های ویژه‌ای نیاز است که در آنها دم‌های H3 و H4 درگیر می‌باشند. مطالعات دیگری نشان داد که تلومرهای هر کروموزوم مخمری نیز همانند توالی‌های خاموش‌کننده رفتار می‌کنند. به عنوان مثال، هرگاه ژنی در تلومر مخمری قرار داده شود، بیان آن مهار می‌گردد. بعلاوه این مهار با جهش‌های انجام شده در دم‌های هیستون H3 و H4 که با مهار در لوکوس‌های خاموش گونه جفت‌گیرنده تداخل می‌کند، کاهش می‌یابد.

مطالعات ژنتیکی منجر به شناسایی چندین پروتئین، RAP1 و سه پروتئین SIR گردید که در مخمر به منظور مهار لوکوس‌های خاموش گونه جفت گیرنده و تلومرها ضروری می‌باشد. مشخص شده است که RAP1 به توالی‌های خاموش کننده DNA یی موجود در HML و HMR و به یک توالی که چندین بار در هر تلومر کروموزومی مخمری تکرار شده است متصل می‌گردد. مطالعات بیشتر بیوشیمیایی نشان داد که پروتئین SIR2 یک **هیستون داستیلاز** است؛ این آنزیم باعث برداشت گروه‌های استیل موجود بر روی لیزین‌ها در دم‌های هیستونی می‌گردد. همچنین، RAP1 و پروتئین‌های SIR2، 3 و 4 به یکدیگر و SIR3 و SIR4 به دم‌های انتهای N هیستونی‌های H3 و H4 متصل می‌گردند که شدیداً توسط فعالیت داستیلازی SIR2 در حالت استیله نشده باقی می‌مانند. آزمایشات متعدد انجام گرفته توسط میکروسکوپ فلورسانس کونفوکال برروی سلول‌های مخمر، چه با سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی نشاندار با فلورسانت ضدپروتئین‌های



▲ **شکل ۳۳-۷ آرایش لوکوس‌های گونه جفت گیرنده برروی کروموزم III مخمر ساکارومایسس، سرویزیه.** ژن‌های خاموش گونه جفت گیرنده (بیان شده) (a یا α برحسب سوش) در لوکوس HML قرار گرفته است. ژن‌های گونه جفت گیرنده متقابل در لوکوس خاموش HMR قرار گرفته است. وقتی که توالی‌های α یا a در لوکوس MAT باشند، mRNA هایی رونویسی می‌شود که پروتئین‌هایی تعیین‌کننده فنوتیپ گونه جفت گیرنده سلول را رمز می‌کنند. توالی‌های خاموش‌کننده نزدیک HML و HMR به پروتئین‌هایی که برای مهار این لوکوس‌های خاموش ضروری هستند متصل می‌شوند. سلول‌های هاپلوئید می‌توانند طی فرایندی که در آن توالی DNA از HML یا HMR به لوکوس MAT فعال از نظر رونویسی منتقل می‌شوند گونه‌های جفت گیرنده را تغییر دهند.



▲ **شکل تجربی ۳۴-۷ (شکل رنگی) آنتی بادی و پروب‌های DNA، پروتئین SIR3 زایا را در هتروکروماتین تلومری در هسته‌های مخمری به طور همزمان نشان می‌دهد.** (a) میکروگراف کونفوکال سه سلول مخمری دیپلوئید که هر کدام دارای ۶۸ تلومر می‌باشند. تلومرها توسط هیبریداسیون یک پروب فلورسنت ویژه تلومری (زرد رنگ) نشاندار شدند. به منظور آشکار کردن هسته‌ها، DNA با قرمز رنگ‌آمیزی شد. ۶۸ تلومر به صورت یک سری نواحی کوچک در نزدیکی حاشیه هسته‌ای تجمع پیدا کرده‌اند. (c,b) میکروگراف‌های کونفوکال سلول‌های مخمر که با پروب هیبریداسیونی ویژه تلومری (b) و آنتی بادی نشاندار با فلورسنت ویژه SIR3 (c) نشاندار شده است. توجه گردد که SIR3 در هتروکروماتین مهار شده تلومری قرار گرفته است. آزمایشات مشابه انجام شده با RAP1 و SIR2 و SIR4 نشان داده است که این پروتئین‌ها نیز در هتروکروماتین مهار شده تلومری قرار دارد.

SIR یا RAP1 و چه با سلول‌هایی که توسط پروب نشاندار ویژه تروما هیبرید شدند، نشان داد که این پروتئین‌ها، ساختارهای نوکلئوپروتئینی تلومری بزرگ و فشرده‌ای را تشکیل می‌دهند که شبیه هتروکروماتین یوکاریوت‌های عالی می‌باشد (شکل ۳۴-۷). در شکل ۳۵-۷ براساس این مطالعات و مطالعات دیگر مدلی برای خاموشی با واسطه کروماتین[1] در تلومرهای مخمر ارائه شده است. تشکیل هتروکروماتین در تلومرها توسط چندین پروتئین RAP1 که به توالی‌های تکراری موجود در ناحیه بدون نوکلئوزوم انتهای تلومر متصل می‌شود آغاز می‌گردد. شبکه‌ای از میانکنش‌های پروتئین - پروتئین RAP1، سه پروتئین SIR (۲، ۳ و ۴) و هیستونهای هیپواستیله H3 و H4 باعث بوجود آمدن یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی پایدار و بسیار منظم می‌شود. این شبکه دارای چندین تلومر می‌باشد و در آنها DNA شدیداً به پروتئین‌های خارجی غیرقابل دسترس است. یک پروتئین دیگر (SIR1) نیز به منظور

1- Chromatin-mediated silencing

خاموش کردن لوکوس‌ها گونه جفت گیرنده خاموش مورد نیاز است. آن بـه هـمراه RAP1 و پـروتئین‌های دیگـر بـه نـواحـی خاموش‌کننده‌ای[۱] که با HML و HMR همراه است متصل شده و باعث آغاز تشکیل کمپلکس چند پروتئینی خاموش‌کننده مشابهی می‌شود بطوریکه این کمپلکس HML و HMR را دربر می‌گیرد.

ویژگی مهم این مدل وابستگی خاموشی به هیپواستیلاسیون دم‌های هیستونی می‌باشد. این ویژگی‌ها توسط آزمایشاتی اثبات شد که طی آن جهش یافته‌های مخمری هیستونهایی را بیان می‌کردند که در آنها لیزین‌های N ـ ترمینال هیستون‌ها با آرژنین و گلیسین جایگزین شده بود. آرژینین همانند لیزین بار مثبت دارد ولی استیله نمی‌شود. گلیسین، بعبارت دیگر خنثی می‌باشد و عدم حضور لیزین را شبیه‌سازی می‌کند. فصل ۶ را بیاد بیاورید که استیلاسیون لیزین‌ها بار مثبت آنها را خنثی می‌کند و میانکنش آن را با گروه‌های فسفات DNA از بین برده و باعث کاهش فشردگی کروماتین می‌شود. مهار در نواحی تلومرها و لوکوس‌های گونه جفت گیرنده خاموش در جهش یافته‌های دارای گلیسین صورت نمی‌گرفت اما در جهش یافته‌های دارای آرژینین، عمل مهاری صورت می‌گرفت. مضافاً اینکه استیلاسیون لیزین‌های H3 و H4 با اتصال SIR3 و SIR4 تداخل ایجاد می‌کند و در نتیجه باعث ممانعت از مهار لوکوس‌های خاموش و تلومرها می‌گردد.

فشـــرده شـدن کـروماتین در یـوکاریوت‌های عـالی. در یـوکاریوت‌های عـالی، فـرایـندهای مشـابهی مـنجر بـه تشکیل هتروکروماتین فشرده در نواحی سانترومری و تلومرها و در برخی از سلول‌ها مهار ژنهای خاصی در نواحی داخلی کروموزوم‌ها می‌گردد. اما در موجودات پرسلولی، علاوه بر داستیلاسیون لیزین‌های هیستون، متیلاسیون لیزین‌های خاص در H3 بـاعث فشـردگی کـروماتین می‌گردد. در فصل ۶ ما آموختیم که چگونه HP1 (هتروکروماتین پروتئین 1) با اتصال به نوکلئوزوم‌های متیله شده در لیزین ۹ هیستون H3 باعث فشردگی کروماتین می‌گردد. بدلیل اینکه HP1 همچنین بـه آنـزیم هـیستون مـتیل‌ترانسفرازی کـه لیـزین ۹ از H3 را در نوکلئوزوم‌های مجاور متیله می‌کند، متصل می‌گردد و HP1 های بیشتری به آن ناحیه فراخوانـده مـی‌شود. اتـصالات بـیشتر بـین مولکول‌های HP1 با خودشان موجب می‌شود کـه کـروماتین بـه ساختارهای فشرده‌تری تبدیل گردد (شکل ۳۴ـ۶ را ملاحظه کنید).

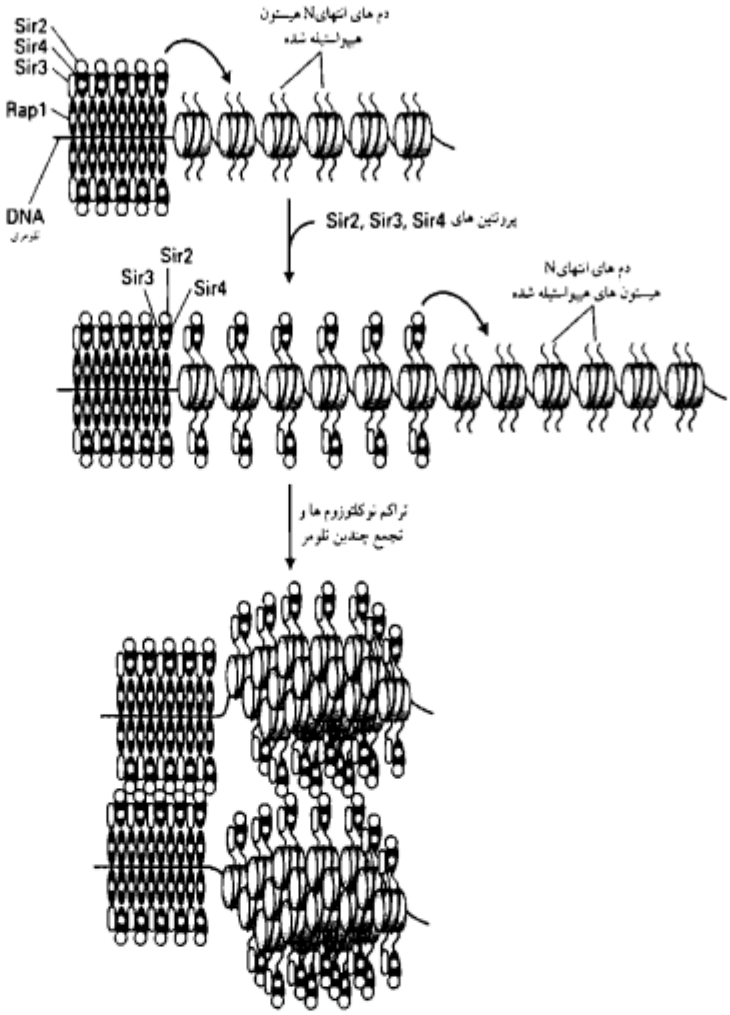
ساختار کـروماتینی دیگـری کـه در مـهار ژنـهای بـعضی از سلول‌های موجودات پرسلولی وجود دارد ساختاری است که در آن پروتئین‌هایی بنام پروتئین‌های چند شانه‌ای[۲] نقش دارند. این ساختار برای اولین بار در فنوتیپ دروزوفیلای جهش یافته مشاهده گردید. مکانیسم مهاری چندشانه‌ای در حفظ مهار ژنهای انواع خاص سلول‌ها و سلول‌های تکامل یافته از آن سلول‌ها ضروری است. از ژنهای مهمی که توسط پروتئین‌های چندشانه‌ای تنظیم مـی‌گردد می‌توان به ژنهای Hox اشاره کرد که عوامل رونویسی تـنظیمی مهمی را رمز می‌کنند. همانگونه که در فصل ۲۲ بحث گردید، ترکیب متفاوت عوامل رونویسی Hox باعث هدایت تکـوینی بـافتها یـا اندام‌های ویژه جنین در حال رشد می‌گردد. در اوایل جنین‌زایی بیان ژنهای Hox توسط پروتئین‌های فعال کننده و مهارکننده ویژه‌ای کنترل می‌گردد. با وجود این بیان این فعال‌کننده و مهارکننده‌ها در اولین نقطه جنین‌زایی متوقف می‌گردد. بنابراین بیان صحیح ژنهای Hox در مراحل بعدی جنین‌زایی و در موقع بلوغ توسط پروتئین‌های چندشانه‌ای تنظیم می‌گردد.

مهار ژنهای Hox در سلول‌ها و زاده‌های آنها که از ابتدا مهار شده‌اند توسط کمپلکسی از پروتئین‌های چندشانه‌ای حفظ می‌شود. پروتئین‌های تریتوراکس[۳] نقش متضادی نسبت به پروتئین‌های چندشانه‌ای دارند و بیان ژنهای Hox را که در اوایل جنین‌زایی در بعضی از سلوها و سپس زاده‌های آنها بیان می‌گردد حفظ می‌کنند.

بطور قابل ملاحظه‌ای تمامی سلول‌های جنینی و موجود بالغ مقدار برابری از پروتئین‌های چـندشانه‌ای و تـریپتوراکس را بـیان می‌کنند و تمامی سلول‌ها دارای مقدار مشـابهی از ژنـهای Hox مـی‌باشند. بـا وجـود ایـن بـعضی از ژنـهای Hox کـه در حـضور پروتئین‌های چندشانه‌ای در بعضی از سلول‌ها فعال مـانده‌انـد در سلول‌هایی که از اوایل جنین‌زایی مهار شده‌اند بصورت غیرفعال باقی می‌ماند. متعاقباً، مانند لوکوس‌های گونه جفت گیرنده خاموش[۴] مخمر، بیان ژنهای Hox توسط فرایندی فراتر از میانکنش ساده توالی‌های ویـژه DNA بـا پـروتئین‌های نـوکلئوپلاسمی تـنظیم می‌گردد. علت این است که مجموعه پروتئین‌های چـندشانه‌ای و تریتوراکس و توالی‌های Hox DNA منجر به بیان ژنهای خاص Hox در سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی بخش جلویی و مهار آنها در سلول‌های تشکیل‌دهنده بخش عقبی جنین می‌گردد.

مـدل مـوجود دربـاره چگـونگی عـمل مـهار پـروتئین‌های چندشانه‌ای در شکل ۳۹ـ۱۷ آورده شده است، بیشتر پروتئین‌های

1- Silencer
2- Polycomb Proteins
3- Trithorax Proteins
4- Silent - mating - type loci



◀ شکل ۷ـ۳۵ مدل رایج از مکانیسم خاموش کردن تلومرهای مخمری (بالا). چند کپی از RAP1 به یک توالی تکراری ناحیه تلومری فاقد نوکلئوزوم متصل شده است. SIR3 و SIR4 به RAP1 و SIR2 به SIR4 متصل می‌شود. SIR2 یک هیستون و داستیلاز است که گروه استیل را از دم هیستونهای نزدیک به مکان اتصالی تکراری RAP1 برمی‌دارد. (وسط) دم‌های هیپواستیله همچنین مکانهای اتصالی SIR3 و SIR4 می‌باشد که به نوبه خود به آنها نیز SIR2 متصل شده و گروه استیل را از هیستونهای مجاور برمی‌دارد. با تکرار این فرایند نواحی هیستونهای هیپواستیله متصل به SIR2، SIR3، و SIR4 گسترش می‌یابد. (پایین). همانطور که در شکل ۷ـ۳۴ نشان داده شده است میانکنش بین کمپلکس‌های SIR2، SIR3 و SIR4 باعث می‌شود که کروماتین فشرده گردد و چند تلومر به یکدیگر نزدیک شوند. ساختارهای کروماتینی در سطوح بالاتر از نظر فضایی باعث مهار میانکنش سایر پروتئین‌ها با DNA می‌گردد.

چندشانه‌ای یکی از زیرواحدهای کمپلکس‌های چندپروتئینی PRC2, PRC1 می‌باشند. عقیده بر این است که PRC2 از طریق اتصال به سرکوبگرهای ویژه که در مراحل اول جنین‌زایی به توالی DNA خاص خود متصل شده است، عمل می‌کند. کمپلکس PRC2 دارای زیرواحدی می‌باشد که دارای دُمین SET می‌باشد. این دُمین، دُمین فعال بسیاری از هیستون متیل‌ترانسفرازها می‌باشد. دُمین SET لیزین ۲۷ هیستون H3 را متیله می‌کند. سپس کمپلکس PRC1 از طریق زیرواحدهای Pc دایمر، که هر کدام دارای دُمین اتصالی ویژه لیزین ۲۷ هیستون H3 متیله (بنام کرومودُمین) می‌باشند، به نوکلئوزوم‌های متیله شده متصل می‌گردد. فرض بر این است که اتصال Pc دایمی به نوکلئوزوم‌های مجاور باعث فشرده شدن کروماتین و مهار رونویسی می‌گردد. ثابت شده است که PRC2 یا یک متیل‌ترانسفراز دیگر به PRC1 متصل شده و باعث حفظ متیلاسیون لیزین ۲۷ هیستون H3 نوکلئوزوم می‌گردد. این فرایند حتی بعد از اینکه بیان پروتئین‌های سرکوبگر اولیه نشان داده شده در شکل ۷ـ۳۶a متوقف شد موجب اتصال کمپلکس‌های PRC1 و PRC2 با کروماتین می‌گردد.

یکی از ویژگیهای سرکوب چندشانه‌ای، حفظ آن در سلول‌های دختر حاصل از تقسیم متوالی در کل عمر یک موجود زنده (تقریباً ۱۰۰ سال در مهره‌داران، ۲۰۰۰ سال برای یک نوع خاص کاج می‌باشد). این بیان پایدار ژن Hox به نظر می‌رسد که ناشی از توزیع نوکلئوزوم‌های متیله شده در لیزین ۲۷ هیستون H3 درست بعد از همانندسازی به مولکولهای دختری DNA می‌باشد. اتصال کمپلکس‌های PRC1 به این نوکلئوزوم‌هایی که در لیزین ۲۷ هیستون H3 متیله شده‌اند و متیلاسیون لیزین ۲۷ هیستون H3 نوکلئوزوم‌های موجود در DNA همانندسازی شده، باعث می‌شود که

کمپلکس PRC1 مجدداً در همان ناحیه در کروماتین کروموزوم هر دو سلول دختری تشکیل گردد. اگر در سرکوب چندشانه‌ای نیز ممکن است مکانیسم‌های دیگری درگیر باشد، اما با این مدل می‌توان توضیح داد که چگونه سرکوب ژنهای ویژه در سلول‌های دختری، مشتق شده از سلول اولیه که در آن ژنها با سرکوب‌گرهای موقتی سرکوب می‌شدند، حفظ می‌گردد.

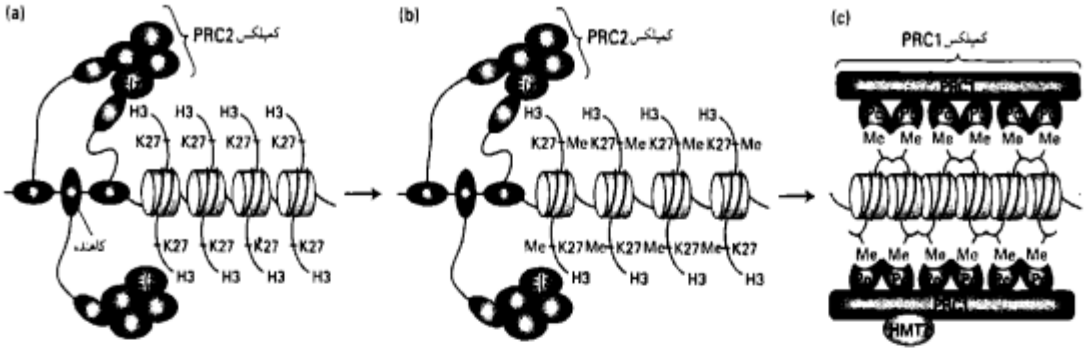
بطور جایگزینی، یکی از کمپلکس‌های پروتئین تریتوراکس شامل یک آنزیم هیستون متیل‌ترانسفراز می‌باشد که لیزین ۴ هیستون H3 را متیله می‌کند که در پروموترهای ژنهای فعال آنزیم قرار دارد. این نوع تغییرات هیستونی به نظر می‌رسد یک مکان اتصالی برای هیستون استیلازها و کمپلکس‌های تغییر شکل‌دهنده کروماتین[1] احیاء می‌کند که باعث آغاز رونویسی و ممانعت از متیلاسیون هیستون H3 لیزین ۹ و لیزین ۲۷ می‌گردد. ممانعت از متیلاسیون لیزین ۹ باعث ممانعت از اتصال HP1 و ممانعت از متیلاسیون لیزین ۲۷ باعث ممانعت از کمپلکس مهاری PRC1 می‌گردد. اعتقاد بر این است که نوکلئوزوم‌های دارای عامل متیل در لیزین ۴ هیستون H3 نیز در هنگام همانندسازی DNA به مولکولهای DNA دختری می‌رسد. اتصال کمپلکس‌های تریتوراکس به نوکلئوزوم‌های دارای نشانه متیل در لیزین ۴ هیستون H3 ممکن است باعث شود متیلاسیون مشابهی در هیستون‌های تغییرنیافته کروماتین دختری گردد و نشانه کروماتین در این ناحیه بطور پایدار باقی بماند. به این طریق، حفظ و توارث الگوی بیان ژنهای Hox و سایر ژنهای تنظیم شونده با سیستم چندشانه‌ای / تریتوراکس، از طریق همانندسازی کروماتین بواسطه تغییرات بعد از ترجمه هیستون‌های آن صورت می‌گیرد نه توالی DNA. این نوع توارث از طریق تغییرات ساختار کروماتین بجای تغییرات توالی DNA به توارث اپی‌ژنتیکی[2] معروف است.

سرکوبگرها باعث هدایت داستیلاسیون و متیلاسیون هیستونی به ژنهای خاص می‌شوند. اهمیت داستیلاسیون و متیلاسیون هیستونی در سرکوب ژنی با واسطه کروماتین توسط مطالعه بر روی سرکوبگرهای یوکاریوتی که ژنهای خاصی را در نواحی درونی کروموزوم تنظیم می‌کنند تا حد زیادی تقویت شده است. امروزه مشخص شده است که این پروتئین‌ها با داستیلاسیون دم‌های هیستونی در نوکلئوزوم‌هایی که به جعبه TATA و ناحیه نزدیک پروموتری ژنها متصل شده‌اند باعث سرکوب آنها می‌شوند. مطالعات *In Vitro* نشان داده است که در زمانیکه DNAی پروموتری با نوکلئوزوم‌های استیله نشده ارتباط برقرار می‌کند، عوامل عمومی رونویسی نمی‌توانند به جعبه TATA و ناحیه آغاز رونویسی متصل شوند. در هیستونهای استیله نشده، N ـ ترمینال اسیدهای آمینه لیزین دارای بار مثبت هستند و با فسفات‌های DNA شدیداً میانکنش می‌دهند. همچنین دم‌های هیستونهای غیراستیله با اکتامرهای هیستونهای مجاور میانکنش می‌دهند و باعث می‌شود که کروماتین ساختار فشرده به خود بگیرد. هنوز ساختمان فضایی دقیق این ساختارها بخوبی مشخص نشده است. اثر نهایی این میانکنش‌ها این است که عوامل رونویسی نتوانند در محل پروموتر کمپلکس پیش آغازین تشکیل دهند. در مقابل، اتصال عوامل رونویسی عمومی، کمتر توسط هیستونهای هیپراستیله سرکوب می‌گردد که در آن بارهای مثبت لیزین خنثی شده و میانکنش‌های الکترواستاتیک با فسفات‌های DNA از بین می‌رود.

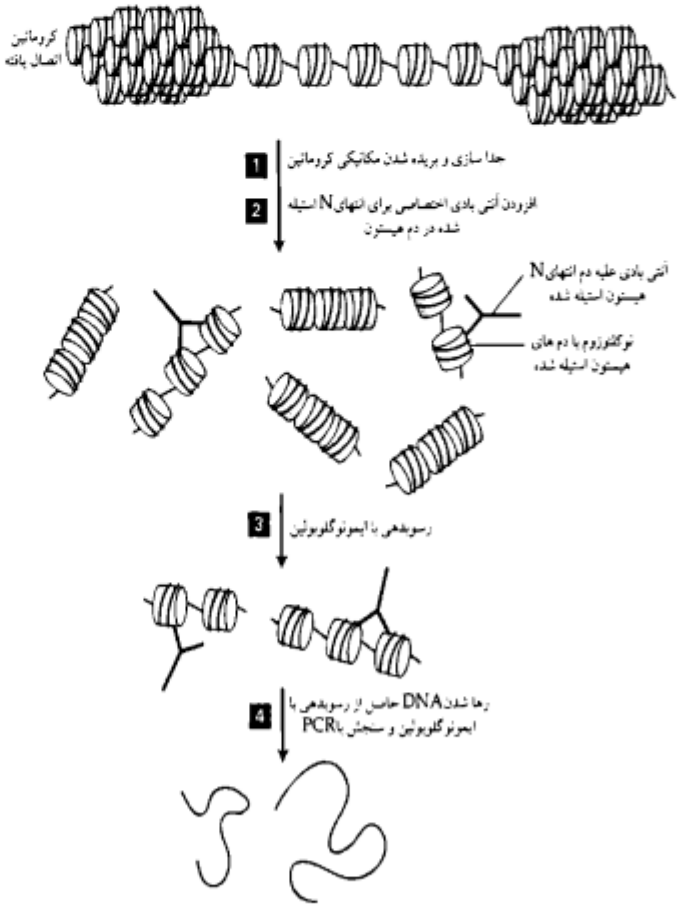
زمانیکه مشخص شد cDNA رمزکننده هیستون داستیلاز انسانی همولوژی بالایی با ژن RPD3 مخمری دارد، مشخص شده است که RPD3 در سرکوب معمولی بسیاری از ژنها دخالت می‌کند. ارتباط بین داستیلاسیون هیستونی و سرکوب رونویسی در پروموترهای ویژه مخمری بیشتر کشف شد. تحقیقات بیشتر نشان داد که پروتئین RPD3 دارای فعالیت هیستون داستیلازی است. توانایی RPD3 در داستیله کردن هیستون‌های نواحی پروموتری بستگی به دو پروتئین دیگر دارد: UME6، سرکوبگری که به توالی‌های تنظیمی بالادست ویژه (URS1) متصل می‌شود و SIN3، که بخشی از یک کمپلکس چند پروتئینی بزرگ می‌باشد که همچنین دارای RPD3 است. همچنین SIN3 به دُمین مهاری UME6 متصل می‌شود، بنابراین باعث قرارگیری RPD3 هیستون داستیلاز در کمپلکس می‌گردد بطوریکه بتواند با نوکلئوزوم‌های نزدیک میانکنش داده و گروه‌های استیل را از اسیدهای آمینه لیزین دم‌های هیستونی بردارد. آزمایشات دیگر که با استفاده از تکنیک رسوبدهی ایمونولوژیکی کروماتین انجام گردید و بطور مفصل در شکل ۷ـ۳۷ توضیح داده شد، ثابت کرد که در مخمر گونه وحشی یکی یا دو تا از نوکلئوزوم‌های موجود در نزدیک مکان اتصالی UME6 هیپواستیله هستند. این نواحی از DNA شامل پروموتر ژنهای سرکوب شده توسط UME6 می‌باشد. در جهش یافته‌هایی که Sin3 و rpd3 در آنها حذف شده است، نه تنها این پروموترها سرکوب گردیدند، بلکه نوکلئوزوم‌های نزدیک مکان‌های اتصالی UME6 هیپراستیله بودند.

1- Chromatin remodeling

2- Epigenetic inheritance



▲ **شکل ۳۶ـ۷ مدلی برای سرکوب توسط کمپلکس‌های چندشانه‌ای.** (a) در هنگام جنین‌زایی اولیه مهارگرها به کمپلکس PRC2 متصل می‌شوند. (b) این عمل منجر به متیلاسیون (Me) لیزین ۲۷ (K27) هیستون H3 نوکلئوزوم مجاور توسط زیرواحد دارای دُمین SET، E(2)، می‌گردد. (c) کمپلکس‌های PRC1 از طریق زیرواحد دایمی Pc دارای کرومودُمین به لیزین ۲۷ متیله شده هیستون H3 نوکلئوزوم متصل می‌شوند. کمپلکس PRC1 کروماتین را فشرده و از نظر ساختاری غیرفعال می‌کند. کمپلکس‌های PRC2 یا یک هیستون متیل ترانسفراز دیگر با اتصال به کمپلکس‌های PRC1، باعث حفظ وضعیت متیلاسیون لیزین ۲۷ هیستون H3 نوکلئوزوم‌های مجاور می‌گردند (در شکل نشان داده نشده است). در نتیجه وقتی که بیان پروتئین‌های مهارگر در (a) متوقف شود اتصال PRC1 حفظ می‌گردد.



▶ **شکل ۳۷ـ۷ با روش رسوبدهی ایمونولوژیکی کروماتین می‌توان وضعیت استیلاسیون هیستونهای کروماتین را بررسی کرد.** هیستونها به کمک مواد شیمیایی برقرار کننده ارتباط عرضی تفوذپذیر به سلول بطور برگشت‌پذیر در *invivo* با DNA ارتباط عرضی برقرار می‌کنند. نوکلئوزوم‌هایی که در آنها دم هیستونها استیله شده است به رنگ سبز نشان داده شده است. (مرحله ❶): کروماتین حاصله جدا گردیده و سپس به طور متوسط دو یا سه نوکلئوزوم بریده شده (مرحله ❷): و آنتی‌بادی بر علیه توالی دوم استیله هیستونی افزوده شد (مرحله ❸): نوکلئوزوم‌ها رسوبدهی ایمونولوژیکی شدند. (مرحله ❹): DNAی موجود در قطعات کروماتین ترکیب شده و با از بین بردن ارتباط عرضی آزاد شده و سپس توسط یک روش PCR حساس کمی‌سازی شد. به کمک این روش می‌توان اتصال هر پروتئینی به توالی ویژه در DNA با استفاده از آنتی‌بادی ضدپروتئین مورد نظر آن را در مرحله ❷ آنالیز کرد.

تمامی این یافته‌ها مدل داستیلاسیون هدایت شده توسط مهارگر[1]، که در شکل ۳۸a ـ۷ نشان داده شده است، را تقویت می‌کنند. در این مدل، کمپلکس SIN3-RPD3 بعنوان کمک

1- Repressor - directed deacetylation

مهارگر[1] عمل می‌کند. مشخص شده است که کمپلکس کمک مهارگر دارای هیستون داستیلاز نیز با بسیاری از مهارگرهای سلول‌های پستانداری میانکنش برقرار می‌کند. بعضی از این کمپلکس‌ها دارای هومولوگ پستانداری SIN3 (mSin3) می‌باشند، که با دُمین مهاری مهارگر، همانند آنچه در مخمر رخ می‌دهد، میانکنش می‌دهد. به نظر می‌رسد که سایر کمپلکس‌های هیستون داستیلازی که در سلول‌های پستانداران یافت شده‌اند دارای پروتئین‌های اتصالی به مهارگر اضافی یا دیگری باشند. عقیده بر این است که ترکیب مهارگرها و کمک مهارگرهای متفاوت توسط مکانیسم‌هایی مشابه مکانیسم‌های موجود در مخمر، داستیلاسیون هیستون را در پروموترهای ویژه‌ای وساطت می‌کند (شکل ۳۸a-۷).

در یوکاریوتهای عالی‌تر، بعضی از کمپلکس‌های کمک ـ مهارگر همچنین زیرواحدهای هیستون متیل‌ترانسفرازی دارند که هیستون H3 را در موقعیت لیزین ۹ متیله می‌کند. همانطور که قبلاً بحث گردید این عمل موجب ایجاد جایگاه اتصالی برای پروتئین HP1 می‌گردد. برای مثال، کمپلکس کمک ـ مهارگر KAP1 به کمک بیشتر از ۲۰۰ عامل رونویسی انگشت روی فعالیت می‌کند. این کمپلکس کمک ـ مهارگر دارای یک متیل‌ترانسفرازی است که لیزین ۹ هیستون H3 موجود در ناحیه پروموتر ژنهای سرکوب شده را متیله می‌کند و باعث اتصال HP1 و سرکوب رونویسی می‌گردد. در فیبروبلاست موشی کشت داده شده زمانیکه یک ترانس ژن وارد شد و از طریق عمل کمک ـ مهارگر مهار شد، مشخص شد که در بیشتر سلول‌ها آن به هتروکروماتین منتقل می‌شود در حالیکه شکل فعال همان ترانس ژن به یوکروماتین متصل می‌شود. (شکل ۳۹-۷).

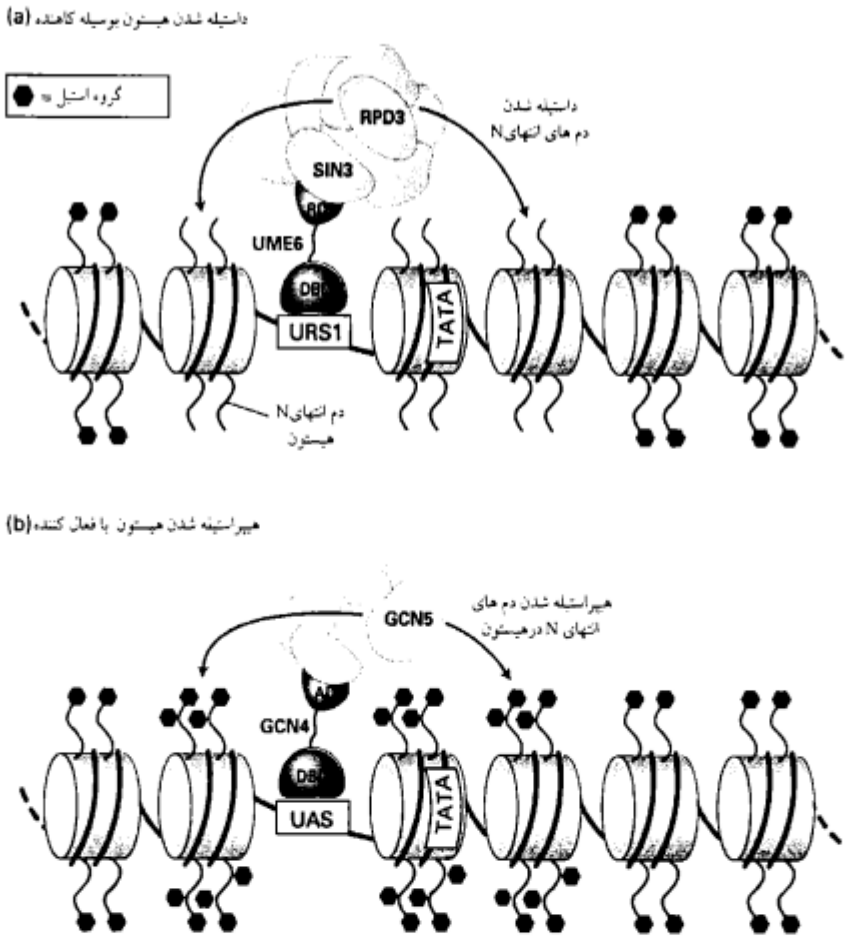
آزمایشات رسوبدهی ایمونولوژیکی کروماتین (شکل ۳۷-۷ را ملاحظه کنید). نشان داد که در ژن مهار شده، هیستون H3 در موقعیت لیزین ۹ و HP1 مهار شده است در حالیکه در ژن فعال چنین متیلاسیونی مشاهده نگردید.

بطور خیلی جالب، علاوه بر متیلاسیون پروتئین‌های هیستونی، متیلاسیون توالی DNA نیز می‌تواند باعث آغاز فشردگی کروماتین گردد. با کشف کمپلکس‌های داستیلاز هیستونی دارای mSin3، مشاهدات اولیه مبنی بر اینکه در مهره‌داران، نواحی غیرفعال از نظر رونویسی اغلب دارای ۵ـ متیل‌سیتیدین (mc) و بعد از آن G می‌باشد، در حالیکه نواحی فعال از نظر رونویسی دارای تعداد کمتری mC می‌باشند، را می‌توان به آسانی توضیح داد. تحقیقات نشان داده است که DNAی دارای ۵ـ متیل‌سیتیدین به پروتئین ویژه‌ای متصل می‌گردد که آن هم به نوبه خود به طور ویژه با mSin3 وارد میانکنش می‌گردد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اتصال کمک ـ مهارکننده‌های دارای mSin3 با نواحی متیله شده DNA منجر به داستیلاسیون هیستونهای نوکلئوزوم‌های مجاور می‌گردد و باعث می‌شود که این نواحی به عوامل رونویسی عمومی و Pol II غیرقابل دسترس شود و در نتیجه از نظر رونویسی غیرفعال گردند.

فعال‌کننده‌ها می‌توانند متیلاسیون و استیلاسیون هیستونی را در ژن‌های خاص هدایت کنند

فقط مهارگرهایی از طریق **کمک مهارگرها** عمل می‌کنند که به دُمین‌های مهارکننده آنها متصل شوند، دُمین‌های فعالسازی فعال کننده‌های اتصال یابنده به DNA توسط اتصال کمپلکس‌های کمک فعال کننده چندین زیرواحدی عمل می‌کنند. یکی از اولین کمپلکس‌های کمک فعال کننده که شناخته شد کمپلکس SAGAی مخمر بود که با پروتئین فعال کننده GCN4 شرح داده شده در قسمت ۴-۷ عمل می‌کرد. مطالعات ژنتیکی اولیه حاکی از آن بود که فعالیت کامل فعال کننده GCN4 پروتئینی را نیاز دارد ک GCN5 نامیده می‌شود. راهنمایی برای عملکرد GCN5 از مطالعات بیوشیمیایی **هیستون استیلاز** خالص سازی شده از پروتوزوآی تتراهیمنا حاصل شد که اولین هیستون استیلاز خالص سازی شده بود. تجزیه و تحلیل توالی پروتئینی شباهتی را بین پروتئین تتراهیمنا و پروتئین مخمری GCN5 آشکار ساخت و بعداً نشان داده شد که آن نیز فعالیت هیستون استیلازی دارد. مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی بیشتر، آشکار ساخت که GCN5 زیرواحدی از یک کمپلکس کمک فعال‌کننده چندین پروتئینی است که بعد از اینکه ژن‌ها برخی از آن زیرواحدها را رمز کردند، کمپلکس SAGA نامیده می‌شود. یک زیرواحد دیگر از این کمپلکس هیستون داستیلازی به دُمین‌های فعال‌سازی در پروتئین‌های فعال‌کننده چندگانه مخمری شامل GCN4 متصل می‌شود. مدل نشان داده شده در شکل ۲۸-۷ سازگار با مشاهداتی است که در آن نوکلئوزوم‌های نزدیک به ناحیه پروموتری یک ژن تنظیم شده توسط فعال کننده GCN4 به طور اختصاصی در مقایسه با اغلب هیستون‌ها در سلول هیپراستیله شده‌اند. این هیپراستیله شدن ایجاد شده توسط فعال‌کننده، نوکلئوزوم‌های نزدیک به یک ناحیه پروموتر، ساختار کروماتینی را چنان باز می‌کند که اتصال سایر پروتئین‌های مورد نیاز برای شروع رونویسی را تسهیل می‌کند. این ساختار

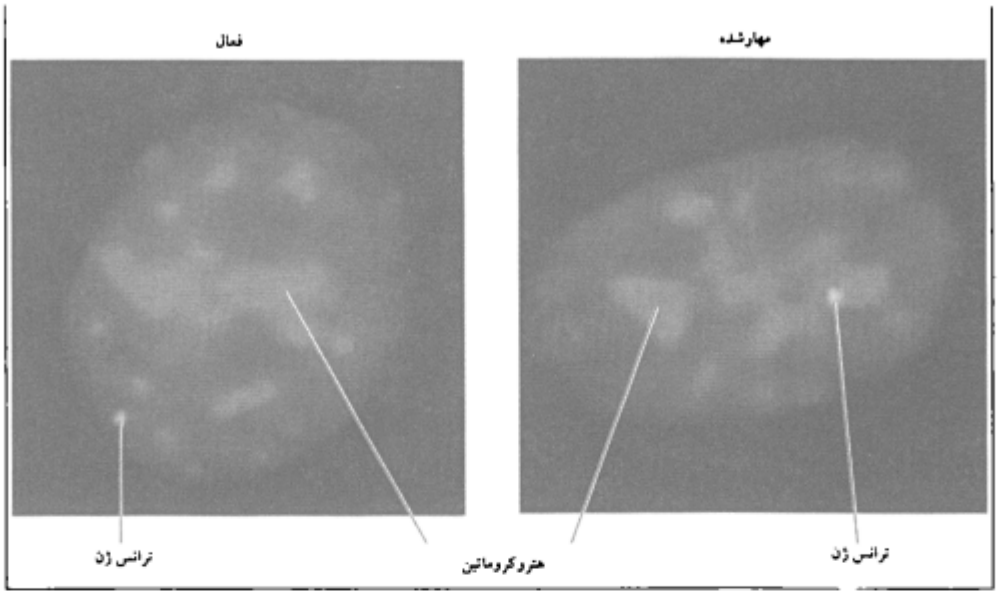
1- Corepressor



▲ **شکل ۳۸ـ۷ مکانیسم پیشنهادی برای داستیلاسیون و هیپراستیلاسیون هیستونی در کنترل رونویسی مخمر.** a) داستیلاسیون هدایت شده توسط سرکوبگر دم‌های N ـ ترمینال هیستونی. دُمین اتصالی به DNA (DBD) مهارگر UME6 با عناصر کنترلی ویژه فرادست (URS1) ژنها وارد میانکنش می‌شود. دُمین مهاری (RD) UME6 به SIN3، زیرواحدی از کمپلکس چند پروتئین که دارای RPD3 می‌باشد، متصل می‌شود. RPD3 یک هیستون داستیلاز می‌باشد. داستیلاسیون دم‌های N ـ ترمینال هیستونهای موجود در نوکلئوزوم‌های ناحیه اتصالی UME6 اتصال عوامل رونویسی عمومی را به جعبه TATA مهار کرده و بنابراین بیان ژن را مهار می‌کند. (a) هیپراستیلاسیون هدایت شده توسط فعال‌کننده دم‌های N ـ ترمینال هیستون. دُمین اتصالی به DNA ی فعال کننده GCN4 با توالی‌های فعال‌کننده ویژه فرادست (UAS) ژنهای تحت تنظیم میانکنش می‌دهد. سپس دُمین فعال‌سازی (AD) GCN4 با کمپلکس چند پروتئین هیستون استیلاز میانکنش می‌دهد. این کمپلکس دارای زیرواحد کاتالیتیکی GCN5 می‌باشد. هیپراستیلاسیون دم‌های N ـ ترمینال هیستون‌های موجود در نوکلئوزوم‌های مکان اتصالی GCN4 موجب تسهیل دسترسی عوامل رونویسی عمومی به ناحیه رونویسی می‌گردند. مهار و فعال‌سازی بسیاری از ژنهای یوکاریوتهای عالی مشابه می‌باشد.

کروماتینی در مقایسه با بقیه کروماتین کمتر متراکم است چنان که توسط حساسیتش به هضم با نوکلئازها در هسته‌های جداسازی شده شناخته می‌شود. استیلاسیون اسیدهای آمینه لیزین خاص هیستونی جایگاه‌های اتصالی برای پروتیئن‌های **برومودُمین** ایجاد می‌کند که به آنها متصل می‌شوند. برای مثال، یک زیرواحد از عامل رونویسی عمومی TFIID حاوی دو برومودُمین هست که به نوکلئوزومهای استیله شده با تمایل بالا متصل می‌شود. به یاد آورید که اتصال TFIID به یک پروموتر، تجمع یک کپلکس پیش آغازگر RNA پلی‌مراز II را شروع می‌کند (شکل ۲۱-۷ را ملاحظه کنید). نوکلئوزوم‌ها در نواحی پروموتری همه ژن‌های فعال هیپراستیله شده‌اند.

یک فعال‌سازی مشابه در یوکاریوت‌های عالی‌تر انجام می‌شود. سلول‌های پستانداران دارای کمپلکس‌های کمک فعال‌کننده هیستون استیلازی چندین زیرواحدی هستند که مشابه کمپلکس SAGA مخمری است. آن‌ها همچنین دو پروتئین چندین دُمینی مرتبط ۴۰۰ کیلودالتونی را که CBP و P300 نامیده می‌شوند، را بیان می‌کنند ولی گمان می‌شود این پروتئین‌ها عملکرد مشابهی دارند. چنانچه قبلاً مورد توجه قرار گرفت یک دُمین از CBP به دُمین



▲ **شکل ۳۹ـ۷ (شکل رنگی) ارتباط ترانس‌ژن مهارشده با هتروکروماتین.** به فیبروبلاست‌های موشی، ژن دارای مکان اتصالی به مهارکننده مهندسی شده وارد گردید. مهارکننده بین دُمین اتصالی به DNA، دُمین مهاری که با کمپلکس کمک مهارکننده KAP1 میانکنش می‌دهد، و دُمین اتصالی به لیگاند گیرنده هسته‌ای قرار گرفت تا وارد هسته شود (شکل ۴۹ـ۷ را ملاحظه کنید). DNA با رنگ‌آمیزی DAPI بصورت آبی دیده می‌شود. نواحی رنگی که روشنتر هستند نواحی هتروکروماتین هستند که در آن غلظت DNA نسبت به یوکروماتین بیشتر است. ژن وارد شده توسط روش هیبریدیزاسیون پروب نشاندار با فلورسنت سبز شناسایی می‌شود. وقتی که مهارکننده نوترکیب در سیتوپلاسم بماند، ژن وارد شده رونویسی می‌شود (چپ) و در بسیاری از سلول‌ها به یوکروماتین متصل است. وقتی که به محیط هورمون اضافه می‌شود تا مهارکننده‌های نوترکیب وارد هسته شوند، ژن وارد شده مهار می‌شود (راست) و به هتروکروماتین متصل می‌شود. آزمایشات رسوبدهی ایمونولوژیکی (شکل ۳۷ـ۷ را ملاحظه کنید) نشان داد که ژن مهارشده به هیستون H3 متیله شده در ناحیه لیزین ۹ و HP1 متصل می‌شود در حالیکه ژن فعال هیچگونه میانکنشی ندارد.

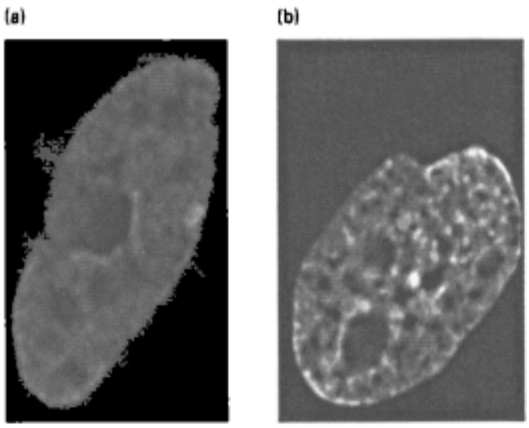
فعالسازی اسیدی فسفریله شده در عامل رونویسی CREB متصل می‌شود. دُمین دیگر از CBP با دُمین‌های فعالسازی مختلف در فعال کننده‌های دیگر میانکنش می‌دهند. دُمین دیگر CBP که فعالیت هیستونی استیلازی دارد و دُمین دیگری به کمپلکس‌های هیستون استیلازی با چندین زیرواحد اضافی متصل می‌شود. گمان می‌شود CREB و بیشتر فعال کننده‌ها در پستانداران با هدایت CBP و کمپلکس هیستون استیلازی مرتبط با نوکلئوزوم‌های خاصی عمل می‌کنند به این صورت که آنها دم‌های هیستونی را استیله می‌کنند و میانکنش بین عوامل رونویسی عمومی را با پروموتر DNA تسهیل می‌کنند. بعلاوه بزرگترین زیرواحد TFIID فعالیت هیستون استیلازی دارد و ممکن است به منظور حفظ هیپراستیلاسیون دنباله هیستونی در نواحی پروموتری عمل کند.

نتیجه متیله شدن لیزین‌های ۹ و ۲۷ از هیستون H3 مهار رونویسی است که با اتصال پروتئین‌های به ترتیب رده HPI یا چندشانه‌ای واسطه‌گری می‌شود که در بالا توضیح داده شده است. بر خلاف آن، متیله شدن لیزین شمارهٔ ۴ هیستون H3 در نواحی پروموتری ژن‌های فعال، از طریق هدف‌گیری متیل ترانسفرازهای خاص برای لیزین شمارهٔ ۴ از هیستون H3 مشاهده شده است. مثالی از این مورد شامل پروتئین‌های کمپلکس تری‌توراکس است. همانطور که قبلاً توضیح داده شد پروتئین‌های کمپلکس تری‌توراکس بیان ژن‌های خاص را در سلول‌ها حفظ می‌کنند. فقط پروتئین‌های چندشانه‌ای مهار این ژن‌های Hox را در سایر سلول‌ها حفظ می‌کنند. پروتئین‌های تری‌توراکس شامل پروتئینی با یک دُمین SET هستند که لیزین‌ها را متیله می‌کنند. یک کمپلکس چندپروتئینی که لیزین شماره ۴ هیستون H3 را سه بار متیله می‌کند، دنباله‌های هیستون H3 که در لیزین ۴ سه بار متیله شده‌اند به عنوان جایگاه اتصالی برای زیرواحد دیگر از کمپلکس تری‌توراکس عمل می‌کنند چنانکه زیرواحد متیل ترانسفرازی کمپلکس تری‌توراکس می‌تواند لیزین شماره ۴ هیستون H3 را در حالت متیله شده در کروماتین متصل با کمپلکس نگه دارد. این یک مکانیسم مشابهی به منظور نگهداری متیلاسیون لیزین ۲۷ هیستون H3 توسط کمپلکس‌های چندشانه‌ای است (شکل ۳۶-۷ را ملاحظه کنید). دنباله انتهای آمینی سه بار متیله شده بر روی لیزین ۴ همچنین به عنوان جایگاه اتصالی برای کمپلکس‌های کمک فعال‌کننده عمل

می‌کنند. به عنوان مثال، کمپلکس‌های هیستون استیلاز شبه SAGA نیز دارای دُمینی هستند که به طور اختصاصی به لیزین ۴ هیستون H3 سه بار متیله شده متصل می‌شود که نتیجه‌اش استیله شدن لیزین‌های دنباله هیستونی است و به این صورت ساختار کروماتینی به منظور رونویسی را ایجاد می‌کند. بسیاری از ژن‌ها در موجودات پرسلولی علاوه بر ژن‌های هاکس در برنامه‌های بیانی مختص رده‌ای تنظیم شده توسط پروتئین‌های تری‌توراکس و چندشانه‌ای بیان می‌شوند. این امر به طور زیادی توسط رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های پلی‌تن غده بزاقی مگس سرکه با آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های چندشانه‌ای و تری‌توراکس آشکار شده است. این آزمایش اتصال این پروتئین‌ها را به بیش از ۱۰۰ جایگاه بر روی کروموزوم‌های حشره در این سلول‌ها نشان می‌دهد.

عوامل تغییر شکل‌دهنده کروماتین به فعالسازی یا مهار رونویسی کمک می‌کنند

علاوه بر کمپلکس‌های هیستون استیلاز، کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین نیز برای فعالسازی در بسیاری از پروموترها لازم هستند. اولین پروتئینی که از این کمپلکس شناخته شد کمپلکس تغییر شکل دهنده کروماتین SWI/SNF مخمر است. یکی از زیرواحدهای SWI/SNF به DNA هلیکازها که آنزیم‌هایی هستند که از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP به منظور جداسازی میانکنش‌های بین اسیدهای نوکلئیک جفت بازی یا بین اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های استفاده می‌کند، شبیه است. در *In Vitro* گمان بر این است که کمپلکس SWI/SNF، DNA را به داخل نوکلئوزوم می‌کشاند چنانچه DNA متصل شده به سطح اکتامر هیستونی از سطح نوکلئوزومی جدا شده و تغییر مکان می‌دهد که این امر باعث می‌شود نوکلئوزوم در طول DNA بلغزد. نتیجه خالص چنین تغییر شکل کروماتینی تسهیل اتصال عوامل رونویسی به توالی DNAیی خاص در کروماتین است. بسیاری از دُمین‌های فعالسازی به کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین متصل می‌شوند و این اتصال، رونویسی در *In Vitro* الگوهای کروماتینی (DNA متصل به نوکلئوزوم‌ها) را تحریک می‌کند. بنابراین کمپلکس SWI/SNF نوع دیگری از کمپلکس کمک فعال‌کننده است. آزمایش نشان داده شده در شکل ۴-۷ توضیح می‌دهد که چگونه یک دُمین فعال‌کننده می‌تواند باعث تراکم‌زدایی از یک ناحیه کروماتینی شود. گمان می‌شود که این امر در نتیجه میانکنش دُمین فعالسازی با کمپلکس‌های هیستون استیلاز و تغییر شکل دهنده کروماتین باشد.



▲ **شکل تجربی ۴۰-۷ (شکل رنگی) بیان پروتئین‌های ادغامی، تراکم‌زدایی از کروماتین را در پاسخ به یک دُمین فعالسازی ثابت می‌کند.** یک رده سلول هامستر کشت داده شده (به منظور داشتن چندین نسخه از آرایش تاندم از توالی اپراتور E.coli Lac در داخل کروموزوم در ناحیه‌ای از هتروکروماتین قرار گرفته است) مورد مهندسی قرار گرفت. (a) وقتی یک حامل بیانی برای رپرسور Lac به داخل این سلول‌ها انتقال داده شد، رپرسورهای Lac متصل به جایگاه‌های اپراتور کروماتین می‌توانستند در ناحیه‌ای از کروماتین با استفاده از آنتی بادی بر علیه رپرسور Lac دیده شوند. DNA (قرمز) با رنگ‌آمیزی DAPI (آبی) دیده می‌شود که نشاندهنده هسته است. (b) وقتی یک حامل بیانی برای رپرسور Lac، ادغام شده با دُمین فعالسازی به داخل این سلول‌ها منتقل شد، همانطور که رنگ‌آمیزی در (a) شده‌اند نشان‌دهنده این است که این دُمین فعالسازی باعث می‌شود که این ناحیه از کروماتین به منظور ایجاد رشته کروماتینی نازک‌تر تراکم‌زدایی شود که قسمت بسیار زیادی از حجم هسته را پر می‌کند.

کمپلکس تغییر شکل دهنده کروماتین برای بسیاری از فرایندهای DNAیی در سلول‌های یوکاریوتی شامل کنترل رونویسی، همانندسازی DNA، نوترکیبی و تعمیر لازم است. چندین نوع از کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین در سلول‌های یوکاریوتی شناسایی شده‌اند و اکثراً دُمین‌های مشابه با DNA هلیکاز دارند. کمپلکس‌های SWI/SNF و کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین وابسته در موجودات پرسلولی دارای زیرواحدهایی با برومودُمین‌هایی هستند که به دم‌های استیله شده هیستون متصل می‌شود. درنتیجه، کمپلکس‌های SWI/SNF به صورت متصل با نواحی فعال شده و استیله شده کروماتین می‌باشد که احتمالاً آنها را در ساختمان فضایی تراکم‌زدایی شده (شل) نگه می‌دارد. برخی از کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین دارای زیرواحدهایی هستند که به هیستون H3 متیله شده بر روی لیزین شماره ۴ متصل می‌شوند و در فعالسازی رونویسی توسط پروتئین‌های تری‌توراکس نقش دارند. کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین می‌توانند در مهار رونویسی نیز شرکت بکنند. این

کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین به دُمین‌های مهار رونویسی مهارگرها متصل شده و در مهار شرکت می‌کنند که این عمل را احتمالاً توسط تبدیل کروماتین به ساختارهای فشرده انجام می‌دهند. نکات زیادی در مورد اینکه چگونه این دسته مهم از پروتئین‌ها، ساختارهای کروماتینی را به منظور تحت تأثیر قرار دادن بیان ژن و سایر فرایندها تغییر می‌دهند، باقی مانده است.

تغییرات هیستونی، پایداری آنها را تا حد زیادی تغییر می‌دهد

آزمایشات نشاندار کردن ضربه و تعقیب[1] نشان داده است که گروه‌های متیل به سرعت از روی لیزین‌های هیستونی برداشته شده و گذاشته می‌شوند، در صورتی که گروه‌های متیل بسیار پایدارتر هستند. حالت استیله شدن در یک لیزین از هیستون اختصاصی بر روی یک نوکلئوزوم خاص در نتیجه تعادل مکانیکی بین استیلاسیون و داستیلاسیون توسط هیستون استیلازها و هیستون داستیلازها است. وقتی که فعال‌کننده‌های متصل به DNA به طور موقت به کمپلکس هیستون استیلاز متصل می‌شوند، استیلاسیون هیستون‌ها در آن ناحیه از کروماتین غالب است. وقتی مهارگرها به طور موقت به کمپلکس‌های هیستون داستیلاز متصل می‌شوند، داستیله شدن غالب است. این هیستون استیلازها و داستیلازها در قسمت‌هایی با طول کوتاه از کروماتین که دارای پروموترها و سایر نواحی کنترل رونویسی است فعالیت می‌کنند. در کل در یوکروماتین عمل می‌کنند و گروه‌های استیل را بر روی لیزین هیستون‌ها برداشته و جابجا می‌کنند.

برخلاف گروه‌های استیل، گروههای متیل بر روی لیزین‌های هیستونی بسیار پایدارتر هستند و بسیار با سرعت کمتر از گروه‌های استیل جابجا می‌شوند. گروه‌های متیل لیزین هیستون می‌توانند توسط دمتیلازهای لیزین هیستونی که اخیراً کشف شده‌اند، برداشته شوند. اما جابجایی گروه‌های متیلی لیزین هیستون بسیار آهسته‌تر از جابجایی گروه‌های استیل لیزین هیستون‌ها انجام می‌شود.

چندین تغییر پس از ترجمه بر روی هیستون شناسایی شده است که بسیاری از آنها در شکل ۳۱-۶ خلاصه شده‌اند. همه این تغییرات توانایی دارند که به طور مثبت یا منفی اتصال پروتئین‌هایی را تنظیم کنند که با فیبرکروماتینی به منظور تنظیم کردن رونویسی و سایر فرایندها میانکنش می‌دهند. تصویری از کروماتین به دست آمده است که در آن دنباله‌های هیستونی به صورت پیچش‌های تصادفی از فیبرکروماتینی امتداد یافته‌اند و پس از ترجمه به منظور ایجاد یکی از ترکیبات ممکن که رونویسی و سایر فرایندها را توسط تنظیم اتصال تعداد زیادی از کمپلکس‌های پروتئینی مختلف تنظیم می‌کنند، تغییر یافته‌اند. برخی از این تغییرات مانند استیلاسیون لیزین هیستون به طور سریع برگشت‌پذیر است. در صورتی که سایرین مانند متیلاسیون لیزین هیستونی می‌تواند در همانندسازی کروماتین به صورت الگو واقع شده و علاوه بر وراثت توالی DNA وراثت اپی‌ژنتیک ایجاد کند.

کمپلکس واسطه‌گر یک پل مولکولی را بین دُمین‌های فعالسازی و آنزیم پلیمراز ایجاد می‌کند

حالا اجازه بدهید که توجه خود را از اینکه چگونه فعالسازها و مهارگرها ساختار کروماتین را کنترل می‌کنند به مکانیسم دیگری از تنظیم ژنی که در مقدمه این قسمت آورده شده است (تنظیم تجمع کمپلکس‌های پیش آغازی رونویسی) معطوف کنیم.

میانکنش فعالسازها با کمپلکس واسطه‌گر چندپروتئینی (شکل ۴۱-۷) به طور مستقیم به تجمع کمپلکس‌های پیش آغازی پلیمراز II کمک می‌کند. تعدادی در حدود ۳۰ زیرواحد واسطه‌گر به RNA پلیمراز II متصل می‌شوند و زیرواحدهای واسطه‌گر دیگر به دُمین‌های فعالسازی در چندین پروتئین فعالساز متصل می‌شوند. بنابراین واسطه‌گر می‌تواند یک پل مولکولی را بین یک فعالساز متصل به جایگاهی در RNA پلیمراز II در یک پروموتر را تشکیل دهد. بعلاوه یکی از زیرواحدهای واسطه‌گر فعالیت هیستون استیلازی دارد و ممکن است به منظور حفظ یک ناحیه پروموتر در حالت هیپراستیله عمل نماید.

آزمایشات با جهش یافته‌های مخمری حساس به دما نشان می‌دهد که برخی از زیرواحدهای واسطه‌گر برای رونویسی از همه ژن‌های مخمری لازم هستند. این زیرواحدها اغلب به نظر می‌رسد که به حفظ ساختار کلی کمپلکس واسطه‌گر کمک می‌کنند و یا به آنزیم پلیمراز II متصل می‌شوند و بنابراین برای فعالسازی توسط کلیه فعال‌کننده‌ها مورد نیاز هستند. برخلاف آن، سایر زیرواحدهای واسطه‌گر برای فعالسازی یا مهار طبیعی یک عده خاص از ژن‌ها لازم هستند. تجزیه تحلیل با استفاده از زیرآرایه DNA از بیان ژن مخمری در جهش یافته‌های دارای نقص در این زیرواحدهای واسطه‌گر مشخص می‌سازد که هر زیرواحد رونویسی ۱۰ الی ۱۳ درصد از کل ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد به طوری که حذف آن، بیان mRNA را دوبار یا بیشتر افزایش و یا کاهش می‌دهد (شکل

1- Pulse - chase

۲۹-۵ را برای تکنیک زیرآرایه DNA ملاحظه کنید). این زیرواحدهای واسطه‌گر گمان می‌شود که با دُمین‌های فعالسازی ویژه میانکنش می‌دهند. بنابراین وقتی زیرواحدی ناقص است، رونویسی ژن‌های تنظیم شده با فعال‌کننده‌هایی که به آن زیرواحد متصل می‌شوند به شدت کاهش می‌یابد، ولی رونویسی ژن‌های دیگر دست نخورده باقی می‌ماند. تأییدکننده این امر مطالعات اتصالی است که نشان می‌دهند که برخی از دُمین‌های فعالسازی با زیرواحدهای واسطه‌گر خاص میانکنش می‌دهند. به هر حال، مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که اغلب دُمین‌های فعالسازی ممکن است با بیش از یک زیرواحد واسطه‌گر میانکنش بدهند.

کمپلکس‌های واسطه‌گر بزرگ‌تر، از مخمر و از سلول‌های پستاندار کشت داده شده جداسازی شده‌اند که برای فعالسازهای پستانداری به منظور تحریک رونویسی با آنزیم پلیمراز II در *In Vitro* مورد نیاز هستند. از اینرو ژن‌های رمزکننده همتاهایی از زیرواحدهای واسطه‌گر در ژنوم کرم حلقوی الگانس و دروزوفیلا و گیاهان یافت شده‌اند. این امر آشکار است که اغلب موجودات زنده پرسلولی کمپلکس‌های واسطه‌گر مشابهی را دارند. حدود نیمی از زیرواحدهای واسطه‌گر متازوآن (حیوانات چندسلولی) به وضوح مشابه زیرواحدهای مخمری هستند. (شکل b و c ۴۱-۷). ولی مشخص شده است بقیه زیرواحدها از پروتئین‌های مخمری متفاوت هستند و ممکن است با دُمین‌های فعالسازی میانکنش بدهند که در مخمر یافت نشده است.

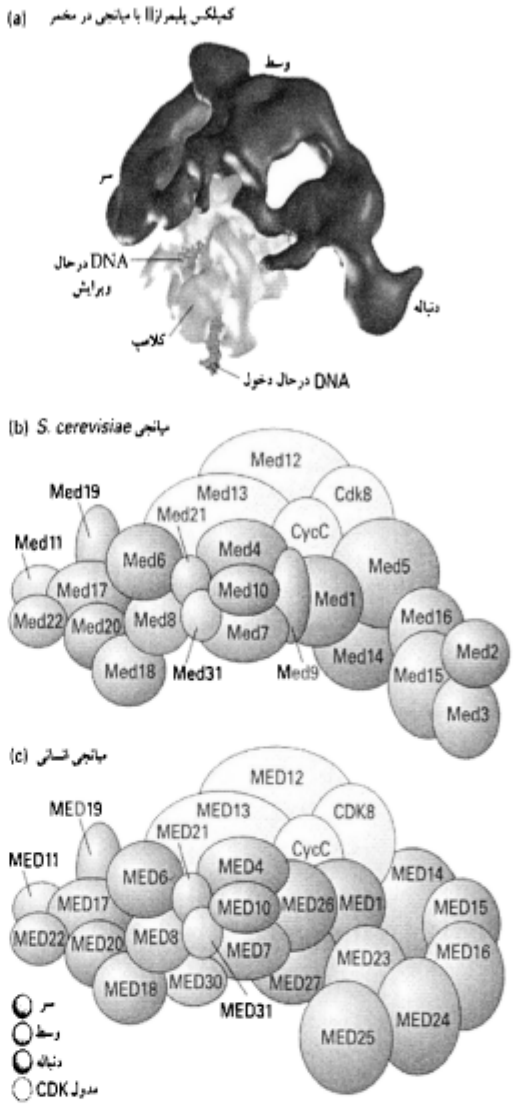
چندین نتایج آزمایشگاهی نشان‌دهنده این امر است که زیرواحدهای واسطه‌گر مجزا به دُمین‌های فعالسازی خاص متصل می‌شوند که پیشنهاد می‌کند فعال‌کننده‌های چندگانه رونویسی را از یک پروموتر منفرد توسط میانکنش همزمان با یک کمپلکس واسطه‌گر تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۴۲-۷). فعالسازهای متصل شده به افزاینده‌ها یا عناصر پروموتری، می‌توانند با واسطه‌گر متصل با یک پروموتر میانکنش بدهند. زیرا کروماتین، مانند DNA، انعطاف‌پذیر است و می‌تواند یک حلقه را تشکیل بدهد که پلی را بین نواحی تنظیمی و پروموتر که به هم نزدیک هستند، به وجود آورد و در فعالساز NtrC از *E.coli* و RNA پلیمراز σ^{54} مشاهده شده است (شکل ۴۱-۷ را ملاحظه کنید). کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی چند پروتئینی که بر روی پروموترهای یوکاریوتی تشکیل می‌شوند ممکن است شامل بیش از ۱۰۰ پلی پپتید با جرم کلی ۳ مگادالتون به بزرگی ریبوزوم باشند.

رونویسی از چندین ژن نیاز به عملکرد منظم فعال‌کننده‌ها و کمک فعال‌کننده‌ها دارد

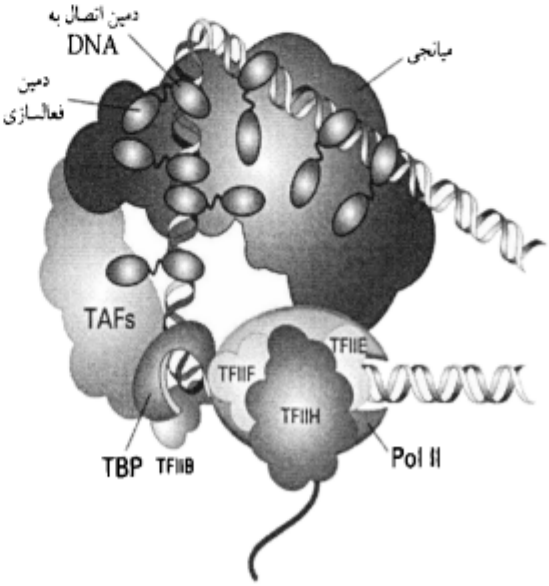
ما اکنون می‌توانیم مدل شروع رونویسی آنزیم پلیمراز II را در شکل ۳۹-۷ به منظور برآورد نقش فعال‌کننده‌ها و کمک فعال‌کننده‌ها بسط دهیم. این پروتئین‌های کمکی نه فقط به دسترس‌پذیر شدن ژن‌های داخل DNA نوکلئوزومی کمک می‌کنند، بلکه مستقیماً آنزیم پلیمراز II را به نواحی پروموتر فرامی خوانند.

مطالعات اخیر برآورد کرده‌اند که با چه ترتیبی کدام یک از فعال‌کننده‌ها به ناحیه کنترل رونویسی متصل می‌شوند و با کمک فعال‌کننده‌ها میانکنش می‌دهند تا اینکه یک ژن فعال شود. چنین مطالعاتی نشان داد که تجمع کمپلکس‌های پیش آغازین به چندین میانکنش پروتئین با پروتئین و DNA با پروتئین بستگی دارد، همچنان که در شکل ۴۳-۷ به تصویر کشیده شده است، فعالسازی ژن HO ترسیم شده است. این ژن یک نوکلئاز مختص توالی را رمز می‌کند که باعث ایجاد گونه جفت گیرنده در سلول‌های مخمری هاپلوئید می‌شود (شکل ۳۳-۷ را ملاحظه کنید). فعالسازی ژن HO با اتصال فعالساز SW15 به یک افزاینده بالادست، شروع می‌شود. سپس SW15 متصل شده با کمپلکس تغییر شکل دهنده کروماتین SWI/SNF میانکنش می‌دهد. زمانی که کروماتین در ناحیه کنترلی HO تراکم‌زدایی و هیپر استیله شد، فعالساز دوم (SBF) می‌تواند به چندین جایگاه در ناحیه نزدیک به پروموتر متصل شود. اتصال بعدی کمپلکس واسطه‌گر توسط SBF منجر به تجمع کمپلکس پیش شروع‌کننده رونویسی پلیمراز می‌شود. عوامل رونویسی عمومی در شکل ۳۱-۷ نشان داده شده است.

ما اکنون می‌توانیم ببینیم که تجمع کمپلکس پیش آغازین و تحریک رونویسی در یک پروموتر نتیجه‌ای از میانکنش چندین فعال‌کننده با چندین کمپلکس کمک فعال‌کننده چندپروتئینی است. اینها شامل کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین، کمپلکس‌های هیستون استیلاز و یک کمپلکس واسطه‌گر است. گرچه مطالب خیلی زیادی باقی مانده است که درباره این فرایندها درک شود، ولی این امر آشکار است که نتیجه خالص این وقایع مولکولی چندگانه، فعالسازی رونویسی در پروموتر است که به میانکنش‌های تعاونی زیادی وابسته است که توسط چندین فعالساز شروع می‌شود. این امر اجازه می‌دهد که ژن‌ها در یک مسیر مختص نوع سلولی توسط ترکیبات ویژه‌ای از عوامل رونویسی تنظیم شوند. ژن TTR که ترانس تیریتین را در پستانداران رمز می‌کند مثال

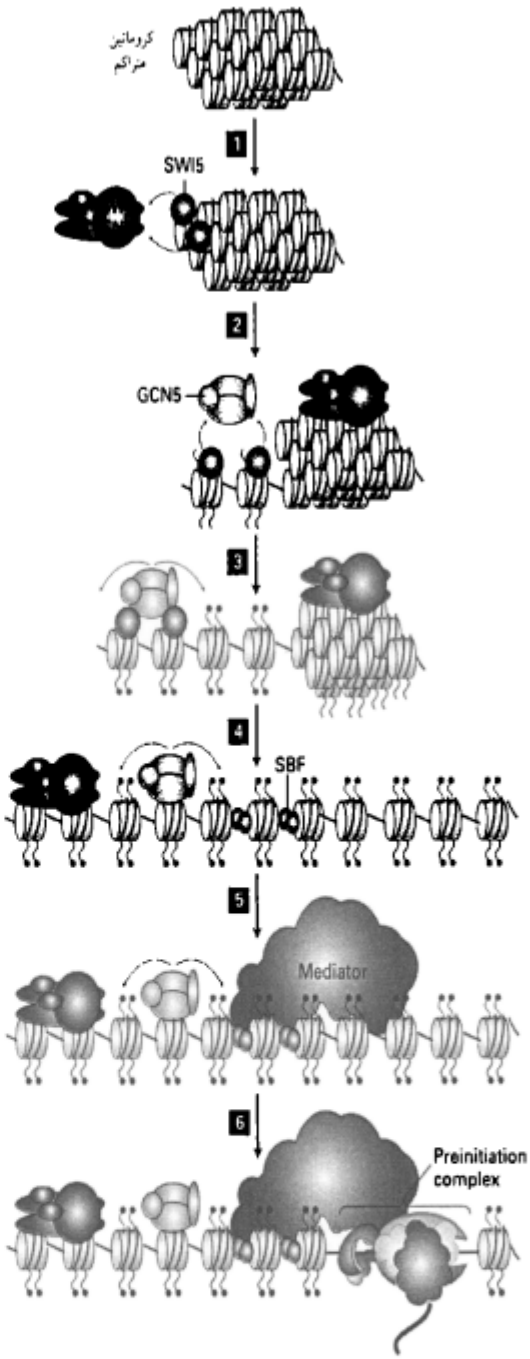


▶ شکل ۴۱-۷ (شکل رنگی) ساختار کمپلکس‌های واسطه‌گر انسانی و مخمر. (a) تصویری ابداعی از واسطه‌گر در ساکارومایسس سرویزیه که به آنزیم RNA پلیمراز II متصل شده است. چندین تصویر میکروسکوپ الکترونی که دسته‌بندی شده و با کامپیوتر پردازش شده‌اند تا تصویری میانگین را ایجاد کنند و در آن ساختار سه بُعدی آنزیم پلیمراز II (نارنجی کم رنگ) نشان داده شده است که با کمپلکس واسط مخمری مرتبط است (آبی تیره). (b) طرحی از زیرواحدهای واسطه‌گر ساکارومایسس سرویزیه. زیرواحدهایی که در یک رنگ نشان داده شده‌اند، گمان می‌شود یک مُدول[1] را تشکیل می‌دهند. جهش در یک زیرواحد از یک مُدول ممکن است ارتباط آن را با سایر زیرواحدها از همان مُدول با بقیه کمپلکس مهار کند. (c) طرحی از زیرواحدهای واسطه‌گر انسانی. موقعیت نسبی هر زیرواحد واسطه‌گر تصادفی است مگر برای زیرواحدهایی که مشابه زیرواحدهای واسطه‌گر ساکارومایسس رویزیه هستند.



▶ شکل ۴۲-۷ مدلی از چندین فعالساز متصل شونده به DNA که با یک کمپلکس واسطه‌گر منفرد میانکنش می‌دهد. توانایی زیرواحدهای مختلف واسطه‌گر برای میانکنش با دُمین‌های فعالسازی خاص، در هماهنگ کردن پیام‌ها از چندین فعال‌کننده در یک پروموتر منفرد شرکت می‌کند. برای توضیح متن را ملاحظه کنید.

1- Module



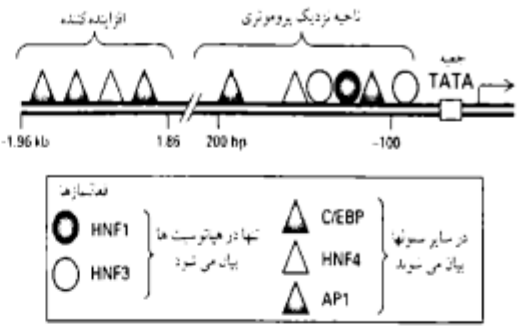
◀ شکل ۴۳-۷ اتصال ترتیبی و میانکنش فعال‌کننده‌ها و کمک فعال‌کننده‌ها منجر به رونویسی از ژن HO در مخمر می‌شود. (مرحله ❶): در ابتدا ژن HO داخل کروماتین متراکم بسته‌بندی می‌شود. فعالسازی وقتی که فعال‌کننده SW15 به جایگاه‌های افزاینده که حدود ۱۲۰۰-۱۴۰۰ جفت باز در بالادست جایگاه شروع رونویسی است، متصل می‌شود و با کمپلکس تغییر شکل‌دهنده کروماتین SWI/SNF میانکنش می‌دهد، شروع می‌شود. (مرحله ❷): کمپلکس SWI/SNF به منظور تراکم‌زدایی از کروماتین عمل می‌کند و بدین جهت دنباله‌های هیستونی را در معرض قرار می‌دهد. (مرحله ❸): یک GCN5 دارای کمپلکس هیستون استیلازی به SW15 اتصال یافته با آن، ارتباط برقرار می‌کند و دنباله‌های هیستونی را در لوکوس HO همچنان که SWI/SNF کروماتین اطراف را تراکم‌زدایی می‌کند، استیله می‌کند. (مرحله ❹): SW15 از DNA رها می‌شود. ولی کمپلکس‌های SWI/SNF و GCN5 به صورت اتصال یافته با ناحیه کنترلی HO باقی می‌مانند، زیرا زیرواحدهای هر دو کمپلکس از طریق بروموذُمین‌شان به دنباله‌های هیستونی استیله شده متصل شده‌اند. فعالیت آن‌ها به فعال‌کننده‌ها و SBF اجازه می‌دهد تا به چندین جایگاه در ناحیه نزدیک پروموتری متصل شوند. (مرحله ❺): سپس SBF به کمپلکس واسطه‌گر متصل می‌شود. (مرحله ❻): نتیجه اتصال بعدی پلیمراز II و عوامل رونویسی عمومی تجمع کمپلکس پیش آغازی است که اجزای تشکیل دهنده آن در شکل ۴۲-۷ آورده شده‌اند.

خوبی از این مورد هست. همچنان که قبلاً اشاره شد، ترانس تیریتین در هپاتوسیت‌ها و سلول‌های عنکبوتیه بیان می‌شود. رونویسی ژن TTR در هپاتوسیت‌ها حداقل توسط پنج فعال‌کننده رونویسی مختلف کنترل می‌شود (شکل ۴۴-۷). با وجود این که سه عدد از این فعال‌کننده‌ها (یعنی HNF4، C/EBF و AP1) در سلول‌های روده و کلیه بیان می‌شوند. رونویسی TTR در این سایر سلول‌ها اتفاق نمی‌افتد، به خاطر اینکه پنج فعالساز مورد نیاز هستند و HNF1 و HNF3 در سلول‌های روده‌ای و کلیوی وجود ندارند. سایر افزاینده‌های مختص هپاتوسیتی و نواحی نزدیک پروموتری که ژن‌هایی دیگری را فقط در هپاتوسیت‌ها تنظیم می‌کنند دارای جایگاه اتصالی برای سایر ترکیبات ویژه از عوامل یافت شده است که با هم به طور عمومی بیان می‌شوند.

سیستم دورگه مخمری از انعطاف‌پذیری فعال‌کننده‌ها برای شناسایی cDNA هایی که پروتئین‌های میانکنش‌دهنده را رمزدار میکنند، استفاده می‌کند

یک روش ژنتیک مولکولی قدرتمند که **سیستم دورگه مخمری** نامیده می‌شود از انعطاف‌پذیری در ساختارهای فعال‌کننده به منظور شناسایی ژن‌هایی که فرآورده‌هایشان به یک پروتئین خاص مورد نظر متصل می‌شوند، استفاده می‌کند. به خاطر اهمیت میانکنش‌های پروتئین با پروتئین در هر فرایند زیست شناختی، سیستم دورگه مخمری به طور گسترده‌ای در تحقیقات زیست شناختی استفاده می‌شود.

این روش از حامل مخمری برای بیان کردن دُمین اتصال یابنده به DNA و ناحیه رابط انعطاف‌پذیر بدون دُمین فعال‌کننده مرتبط مانند GAL4 که تنها دارای اسیدهای آمینه ۶۹۲-۱ است، بهره می‌گیرد (شکل ۲۱-۷ را ملاحظه کنید). یک توالی cDNA ی



▲ **شکل ۴۴-۷ ناحیه کنترل رونویسی ژن ترانس تیریتین TTR.** جایگاه‌های اتصالی برای پنج فعال‌کننده‌ها برای رونویسی از ژن TTR در هپاتوسیت‌ها لازم است که نشان داده شده است. تعداد کاملی از فعال‌کننده‌ها در غلظت‌های مورد نیاز به منظور تحریک رونویسی فقط در هپاتوسیت‌ها بیان می‌شوند. یک عده متفاوت از فعال‌کننده‌ها رونویسی را در سلول‌های عنکبوتیه تحریک می‌کند.

رمزکننده یک پروتئین یا دُمین پروتئین مورد نظر که **دُمین طعمه**[1] نامیده می‌شود به داخل ناحیه رابط انعطاف‌پذیر وارد می‌شود چنانکه حامل یک پروتئین دورگه متشکل از دُمین اتصال یابنده به DNA، ناحیه رابط دُمین طعمه را بیان خواهد کرد (سمت چپ شکل ۴۵-۷). یک کتابخانه DNA، در داخل چندین نسخه از حامل مخمری دوم کلون شد که یک دُمین فعالسازی قوی و رابط انعطاف‌پذیر را برای تولید یک کتابخانه حامل بیان‌کننده پروتئین‌های دورگه چندگانه (هر کدام دارای یک **دُمین fish**[2] متفاوت هستند) رمز می‌کند (سمت راست، از شکل ۴۵-۷).

سپس حامل طعمه و کتابخانه حامل‌های fish به داخل سلول‌های مخمری مهندسی شده وارد می‌شوند. در آنها تنها یک نسخه از ژن مورد نیاز برای سنتز هیستیدین (HIS) تحت کنترل یک UAS با جایگاه‌های اتصالی برای دُمین اتصال یابنده به DNA از پروتئین طعمه دورگه است. رونویسی ژن HIS به فعال‌سازی توسط پروتئین‌های متصل به UAS نیاز دارد. سلول‌های ترانسفرم شده یک دورگه طعمه و یک دورگه fish **میانکنش‌دهنده** را بیان می‌کنند که قادر خواهد بود رونویسی ژن HIS را فعال کند (شکل ۴۵-۷). این سیستم به خاطر انعطاف‌پذیری در فضای بین دُمین اتصال یابنده به DNA و دُمین فعالسازی، از فعالسازی یوکاریوتی کار می‌کند.

یک فرآیند انتخاب دومرحله‌ای استفاده می‌شود (شکل ۴۵-۷). حامل طعمه یک ژن TRP گونه وحشی را نیز بیان می‌کند و حامل دورگه یک ژن LEU گونه وحشی را بیان می‌کند. سلول‌هایی که ژن وارد آنها شده است، ابتدا در محیط فاقد تریپتوفان و لوسین ولی دارای هیستیدین رشد داده می‌شوند. فقط سلول‌هایی که حامل طعمه و یکی از پلاسمیدهای fish را دریافت کرده‌اند در این محیط کشت زنده خواهند ماند. سپس سلول‌هایی که زنده می‌مانند در محیطی قرار داده می‌شوند که فاقد هیستیدین است. سلول‌های بیان‌کننده یک دورگه fish که به دورگه طعمه متصل نمی‌شوند، نمی‌توانند ژن HIS را رونویسی کنند و در نتیجه این امر در محیط کشت فاقد هیستیدین تشکیل کلونی را نمی‌دهند. معدود سلول‌هایی که یک دورگه fish اتصال یابنده به طعمه را بیان می‌کنند رشد خواهند کرد و تشکیل کلونی‌هایی را در غیاب هیستیدین خواهند داد. بازیابی حامل‌های fish از این کلونی‌ها، cDNAهایی را حاصل می‌کند که دُمین‌های پروتئینی را رمز می‌کنند که با دُمین طعمه میانکنش می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۶-۷

مکانیسم‌های مولکولی مهار و فعالسازی رونویسی

■ فعالسازها و مهارگرهای رونویسی یوکاریوتی اثراتشان را اغلب با اتصال به کمک فعالسازها و کمک مهارگرهای چند زیرواحدی اعمال می‌کنند که تجمع کمپلکس‌های پیش‌آغازی رونویسی پلیمراز II را هم توسط تنظیم ساختار کروماتینی (تأثیر غیرمستقیم) و یا توسط میانکنش با پلیمراز II و عوامل رونویسی عمومی (تأثیر مستقیم) تحت تأثیر قرار می‌دهند.

■ DNA در نواحی متراکم کروماتین (هتروکروماتین) به عوامل رونویسی و سایر پروتئین نسبتاً دسترس‌ناپذیر است چنانکه بیان ژن مهار شده است.

■ میانکنش‌های چندین پروتئین با همدیگر و با دنباله‌های انتهای N هیپواستیله شده از هیستونهای H3 و H4 مسئول مهار واسطه شده کروماتینی رونویسی هستند که در تلومرها و جایگاههای خاموش گونه جفت گیرنده در ساکارومایسس سرویزیه موجود هستند (شکل ۳۵-۷ را ملاحظه کنید).

■ برخی از دُمین‌های مهاری توسط میانکنش با کمک مهارگرها عمل می‌کنند که کمپلکس‌های هیستون داستیلاز هستند و استیلاسیون دنباله‌های انتهای N هیستونی در نوکلئوزوم‌های نزدیک به جایگاه اتصالی مهارگر، میانکنش بین DNAی پروموتری و عوامل رونویسی عمومی را مهار می‌کند و بدان جهت آغاز رونویسی را مهار می‌کند (شکل ۳۸a-۷ را ملاحظه کنید).

1- Bait domain 2- Fish domain

■ برخی دُمین‌های فعالسازی توسط اتصال کمپلکس کمک فعالساز چند پروتئینی مانند کمپلکس‌های هیستون استیلاز عمل می‌کنند. هیپراستیلاسیون بعدی دنباله‌های انتهای N هیستون در نوکلئوزوم‌ها در نزدیکی جایگاه اتصال فعالساز، میانکنش‌های بین DNA پروموتری و عوامل رونویسی عمومی را تسهیل می‌کند. بدان جهت آغاز رونویسی را تحریک می‌کند (شکل ۳۸b-۷ را ملاحظه کنید).

■ عوامل تغییر شکل کروماتینی SWI/SNF نوع دیگری از کمک فعالسازها را ایجاد می‌کنند. این کمپلکس‌های چند زیرواحدی می‌توانند بصورت موقت DNA را از هسته‌های هیستونی در واکنش وابسته به ATP جدا کنند و ممکن است نواحی کروماتینی را تراکم‌زایی کنند و بدانجهت اتصال پروتئین‌های اتصال یابنده به DNA مورد نیاز برای اینکه آغازدر برخی پروموترها اتفاق بیفتد را شروع کنند.

■ واسطه‌گر (نوع دیگر از کمک فعالساز) یک کمپلکس در حدود ۳۰ زیرواحدی است که یک پل مولکولی بین دُمین‌های فعالسازی و RNA پلیمراز II را توسط اتصال مستقیم به دُمین‌های فعالسازی و پلیمراز تشکیل می‌دهد. واسطه‌گرها با اتصال همزمان به چندین فعالساز، احتمالاً اثرات فعالسازهای چندگانه را روی یک پروموتر منفرد یکپارچه می‌کنند (شکل ۴۲-۷ راملاحظه کنید).

■ فعالسازهای متصل شده به یک افزاینده فاصله دار می‌توانند با عوامل رونویسی متصل‌شده به پروموتر میانکنش دهند. زیرا DNA انعطاف‌پذیر است و DNA ی مورد نظر می‌تواند یک حلقه بزرگ را تشکیل بدهد.

■ تجمع با تعاونی زیاد کمپلکس پیش‌آغازی در *In Viro* عموماً به چندین کمک فعالساز نیاز دارد. یک سلول بایستی تولید عده‌ای خاص از فعالسازهای مورد نیاز برای رونویسی یک ژن خاص به منظور بیان آن ژن را بکند.

■ سیستم دورگه مخمری به طور گسترده‌ای به منظور شناسایی DNA های رمزکننده و دُمین‌های پروتئینی که به پروتئین مورد نظر متصل می‌شوند، به کار می‌رود.

۷-۷ تنظیم فعالیت عامل رونویسی

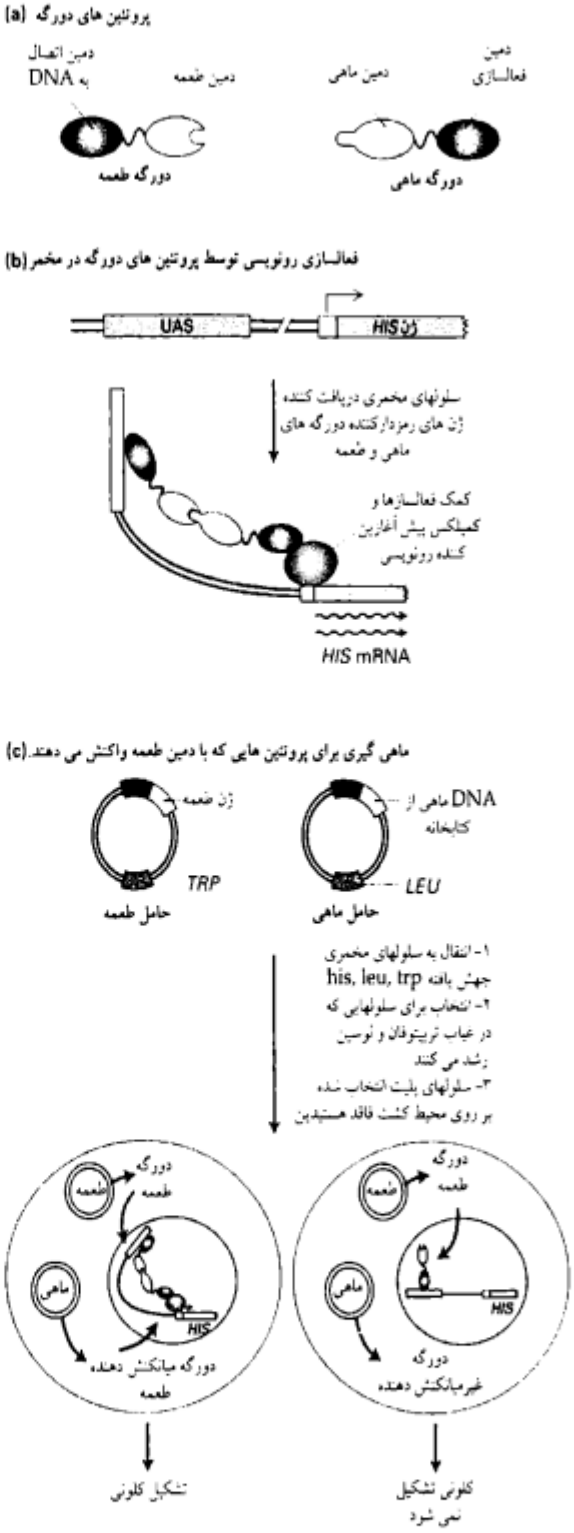
در مبحث قبلی دیدیم که چگونه ترکیباتی از فعال‌کننده‌ها و مهارگرها به توالی‌های تنظیمی خاص DNA متصل می‌شوند و رونویسی ژن‌های یوکاریوتی را کنترل می‌کنند. اینکه آیا یک ژن خاص در موجود زنده پرسلولی در یک سلول خاص در یک زمان معین بیان می‌شود یا نه، تا حد زیادی نتیجه غلظت‌های هسته‌ای و فعالیت‌های عوامل رونویسی است که با توالی‌های تنظیمی آن ژن میانکنش می‌دهند. اینکه کدام عوامل رونویسی در یک نوع سلول خاصی بیان می‌شود (مقادیر تولید شده آن) توسط چندین میانکنش تنظیمی بین ژن‌های عامل رونویسی تعیین می‌شود که در طی تکوین و تمایز یک نوع سلول خاص بوجود می‌آیند. در فصل‌های ۱۶ و ۲۲، مثال‌هایی از چندین عامل تنظیمی را در طی تکوین ارائه داده‌ایم و اساس تکوین و تمایز را که از آن نمونه‌ها حاصل می‌شود را توضیح داده‌ایم.

علاوه بر کنترل بیان صدها تا هزارها عامل رونویسی، سلول‌ها فعالیت چندین عامل رونویسی را که در نوع سلولی خاص بیان می‌شود را نیز تنظیم می‌کنند. به عنوان مثال، عوامل رونویسی اغلب اوقات در پاسخ به پیام‌های خارج سلولی تنظیم می‌شوند. میانکنش‌های بین دُمین‌های خارج سلولی پروتئین‌های گیرندهٔ گذرنده از غشاء بر روی سطح سلول با لیگاندهای پروتئینی خاص آن گیرنده‌ها، دُمین‌های مرتبط با دُمین‌های داخل سلولی این پروتئین‌های گذرنده از غشاء را فعال می‌کند که پیام رسیده از خارج سلول را به یک پیام داخل سلولی و سرانجام به عوامل رونویسی در هسته انتقال می‌دهد. فصل ۱۶، انواع اصلی از گیرنده‌های سطح سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی را که فعالیت عامل رونویسی را تنظیم می‌کنند، توضیح می‌دهد.

در این قسمت، ما دوّمین گروه اصلی از پیام‌های خارج سلولی را توضیح می‌دهیم. هورمون‌های کوچک و محلول در چربی، شامل بسیاری از هورمون‌های استروئیدی، رتینوئیدها و هورمون‌های تیروئیدی هستند که می‌توانند از طریق غشاءهای پلاسمایی و هسته‌ای عبور کرده و به طور مستقیم با عوامل رونویسی میانکنش بدهند و آنها را تنظیم کنند (شکل ۴۶-۷). همانطور که قبلاً اشاره شد، گیرنده‌های داخل سلولی برای اغلب هورمون‌های محلول در چربی **ابرخانواده** گیرنده‌های هسته‌ای را ایجاد می‌کنند که وقتی به لیگاندهایشان متصل می‌شوند به عنوان فعال‌کننده‌های رونویسی عمل می‌کنند.

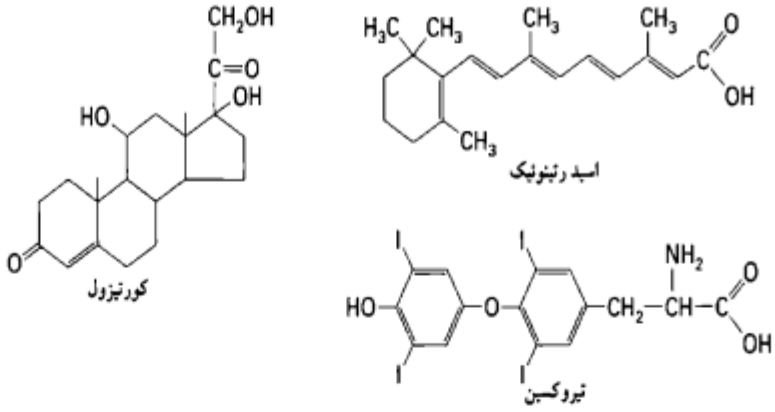
همه گیرنده‌های هسته‌ای یک ساختار دُمینی مشترک دارند

کلون کردن و تعیین توالی ژن‌های رمزکننده چندین گیرنده هسته‌ای حفاظت قابل توجهی را در توالی‌های اسید آمینه‌ای و سه ناحیه عملکردی آنها آشکار کرد (شکل ۴۷-۷). همه گیرنده‌های

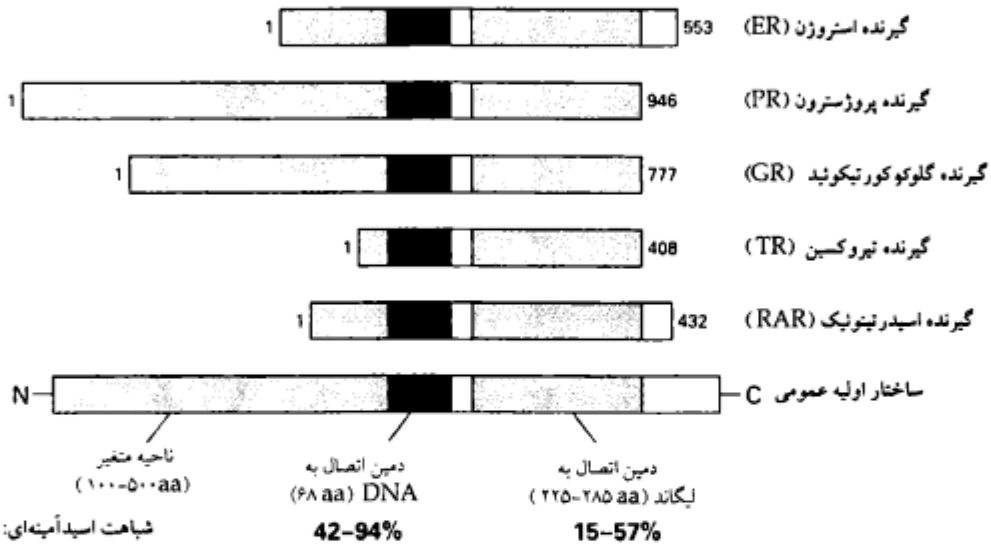


شکل تجربی ۴۵-۷ سیستم دورگه مخمری روشی از غربالگری یک کتابخانه cDNA برای کلون‌های رمزکننده پروتئین‌ها فراهم می‌کند که با پروتئین مورد نظر میانکنش می‌دهند. (a) دو حامل ساخته شده دارای ژن‌هایی هستند که پروتئین‌های کیمری را رمز می‌کند. در یک حامل (سمت چپ)، توالی رمزکننده دُمین اتصال یابنده به DNA از یک عامل رونویسی در داخل توالی‌های یک پروتئین شناخته شده که به آن دُمین طعمه اطلاق می‌شود، قرار می‌گیرد. حامل دوم یک دُمین فعالسازی ادغام شده با یک حامل Fish (ماهی) را بیان می‌کند که می‌تواند با دُمین طعمه میانکنش دهد. (b) اگر سلول‌های مخمری با حامل‌های بیان‌کننده هر دو رگه تغییر یابند قسمت‌های fish و طعمه از پروتئین‌های کیمری به منظور ایجاد یک فعال‌کننده رونویسی عملکردی، میانکنش می‌دهند. در این مثال، فعال‌کننده، رونویسی از ژن HIS را شروع می‌کند. یک انتهای این کمپلکس پروتئینی به توالی فعال‌کننده بالادست (UAS) ژن HIS3 متصل می‌شود، انتهای دیگر که شامل دُمین فعالسازی است، تجمع کمپلکس پیش آغاز رونویسی را در پروموتر تحریک می‌کند. (c) به منظور غربال کتابخانه DNA، برای کلون‌های رمزکننده پروتئین‌هایی که با یک پروتئین طعمه خاص مورد نظر میانکنش می‌دهند، کتابخانه، در داخل حامل رمزکننده دُمین فعالسازی طوری کلون می‌شود که پروتئین‌های دورگه بیان می‌شوند. حامل طعمه و حامل‌های fish (ماهی) دارای ژن‌های قابل انتخاب گونه وحشی است (مانند ژن TRP یا LEU). فقط سلول‌های ترانسفرم شده زنده می‌مانند. طرح انتخابی نشان داده شده آنهایی هستند که دورگه طعمه و ماهی را بیان می‌کنند که با آن میانکنش می‌دهند. برای توضیح متن را ملاحظه کنید.

هسته‌ای یک ناحیه انتهای N منحصر به فرد با طول متغییر دارند (۵۰۰-۱۰۰ اسیدآمینه). پروتئین‌های این ناحیه متغییر به عنوان دُمین‌های فعالسازی در برخی از گیرنده‌های هسته‌ای عمل می‌کنند. دُمین اتصال یابنده به DNA در نزدیکی مرکز در ساختار اولیه مکان‌یابی شده است و تکراری از موتیف انگشت روی C_4 را دارد. دُمین اتصال یابنده به هورمون در نزدیکی انتهای C واقع شده است و دارای یک دُمین فعالسازی وابسته به هورمون است. در برخی گیرنده‌های هسته‌ای، دُمین اتصال یابنده به هورمون به عنوان یک دُمین مهاری در غیاب لیگاند عمل می‌کند.



◀ شکل ۴۶-۷ مثال‌هایی از هورمون‌هایی که به گیرنده‌های هسته‌ای متصل می‌شوند. این هورمون‌ها و هورمون‌های محلول در چربی دیگر، به گیرنده‌های قرار گرفته در سیتوزول یا هسته متصل می‌شوند. کمپلکس لیگاند - گیرنده به عنوان فعال‌کننده رونویسی عمل می‌کند.



▲ شکل ۴۷-۷ طرح عمومی عوامل رونویسی در ابرخانواده گیرنده هسته‌ای. دُمین اتصال یابنده به DNA به طور مرکزی واقع شده است و شباهت ساختاری قابل توجهی را در بین گیرنده‌های مختلف نشان می‌دهد و دارای دو نسخه از موتیف انگشت روی C_4 است. دُمین اتصال یابنده به هورمون در انتهای کربوکسیلی تا حدی شباهت کمتری را نشان می‌دهد. نواحی انتهای N در انواع گیرنده‌ها در اندازه متغیر هستند و دارای توالی‌های منحصربه‌فرد هستند و ممکن است یک یا چند دُمین فعالسازی داشته باشند.

عناصر پاسخ گیرنده هسته‌ای دارای تکرارهای مستقیم و معکوس است

توالی‌های نوکلئوتیدی مشخصه از جایگاه‌های DNA که **عناصر پاسخ** نامیده می‌شود تعیین شده است و به چندین گیرنده هسته‌ای متصل می‌شوند. توالی‌های عناصر پاسخ مورد توافق برای گیرنده‌های استروژنی و گلوکوکورتیکوئیدی تکرارهای معکوس شش جفت بازی هستند که توسط سه جفت باز از هم جدا می‌شوند (شکل ۴۸-۷). این یافته پیشنهاد می‌کند که گیرنده‌های هورمون استروئیدی خویشاوند به صورت دیمرهای متقارن به DNA متصل می‌شوند، همچنان که بعداً در تجزیه تحلیل کریستالوگرافی با اشعه x از انگشت روی C_4 از دُمین اتصال یابنده به DNAی گیرنده گلوکوکورتیکوئید هومودیمری نشان داده شده است (شکل ۲۵-۷ را ملاحظه کنید).

برخی از عناصر پاسخ گیرنده هسته‌ای (مانند گیرنده‌هایی که متصل به ویتامین D_3، هورمون تیروئید و اسید رتینوئیک می‌شوند). تکراری مستقیم از توالی شناسایی شده توسط گیرنده استروژن هستند که توسط سه یا پنج جفت باز از هم جدا می‌شوند (شکل ۴۸-۷). ویژگی پاسخ به هورمون‌های مختلف با اتصال گیرنده‌های مجزا توسط فاصله بین این تکرارها تعیین می‌شود. گیرنده‌هایی که به چنین عناصر پاسخ با تکرار مستقیم متصل می‌شوند، هترودیمرهایی را با یک مونومر گیرنده هسته‌ای مشترک که RXR نامیده می‌شود، ایجاد می‌کنند. عنصر پاسخ ویتامین D_3 به صورت هترودیمر

(a) GRE
5′ AGAACA(N)$_3$TGTTCT 3′
3′ TCTTGT(N)$_3$ACAAGA 5′

(b) ERE
5′ AGGTCA(N)$_3$TGACCT 3′
3′ TCCAGT(N)$_3$ACTGGA 5′

(c) VDRE
5′ AGGTCA(N)$_3$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_3$TCCAGT 5′

(d) TRE
5′ AGGTCA(N)$_4$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_4$TCCAGT 5′

(e) RARE
5′ AGGTCA(N)$_5$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_5$TCCAGT 5′

▲ **شکل ۴۸-۷ توالی‌های مورد توافق از عناصر پاسخ DNA که به سه گیرنده هسته‌ای متصل می‌شوند.** عناصر پاسخ برای گیرنده هورمون گلوکوکورتیکوئید (GRE) و گیرنده استروژن (ERE) دارای تکرارهای معکوس است که به این پروتئین‌های هترودیمری متصل می‌شوند. عناصر پاسخ برای گیرنده‌های هترودیمری شامل تکرار مستقیم معمول است که توسط سه الی پنج جفت باز برای گیرنده ویتامین D (VDRE)، گیرنده هورمون تیروئیدی (TRE) و گیرنده اسید رتینوئیک (RARE) از هم جدا شده‌اند. توالی‌های تکراری توسط پیکان‌ها نمایش داده شده‌اند.

RXR-VDR و عنصر پاسخ اسید رتینوئیک به صورت RXR-RAR می‌باشد. مونومرهای تشکیل دهنده این هترودیمرها با همدیگر به طریقی میانکنش می‌دهند که دو دُمین اتصال یابنده به DNA نسبت به هم در جهت عکس قرار می‌گیرند که این امر اجازه می‌دهد هترودیمرهای RXR به تکرارهایی از جایگاه اتصالی برای هر مونومر متصل شوند. برخلاف آن، مونومرها در گیرنده‌های هسته‌ای هترودیمری (مانند GRE و ERE) جهت‌گیری معکوس دارند.

اتصال هورمون به گیرنده هسته‌ای فعالیت این هورمون را به عنوان عامل رونویسی تنظیم می‌کند

مکانیسمی که توسط آن اتصال هورمون، فعالیت گیرنده‌های هسته‌ای را کنترل می‌کند برای گیرنده‌های هترودیمری و هومودیمری متفاوت است. گیرنده‌های هسته‌ای هترودیمری (مانند RXR-VDR و RXR-TR و RXR-RAR) منحصراً در هسته قرار گرفته‌اند. در غیاب لیگاند هورمونی، آنها رونویسی را با اتصال یافتن به جایگاه‌های مرتبطشان در DNA، مهار می‌کنند. آنها توسط داستیله کردن مستقیم در نزدیکی نوکلئوزوم توسط مکانیسمی که قبلاً توضیح داده شده است، عمل می‌کنند (شکل ۳۸-۷). در ساختمان فضایی متصل شده به لیگاند، گیرنده‌های هسته‌ای هترودیمری دارای RXR هستند که می‌توانند بطور مستقیم هیستون‌های نزدیک نوکلئوزوم‌ها را هیپراستیله بکند، بدین صورت اثرات مهاری دُمین اتصال یابنده به لیگاند آزاد را معکوس می‌کنند. در حضور لیگاند، دُمین‌های اتصال یابنده به لیگاند در گیرنده‌های هسته‌ای به واسطه‌گر متصل می‌شوند و تجمع کمپلکس پیش آغازی را تحریک می‌کنند.

برخلاف گیرنده‌های هسته‌ای هترودیمری، گیرنده‌های هومودیمری در سیتوپلاسم در غیاب لیگاندهایشان یافت می‌شوند. اتصال هورمون به این گیرنده‌ها منجر به انتقال آنها به هسته می‌شود. انتقال وابسته به هورمون گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GR) هومودیمری در آزمایشات انتقال ژنی[1] که در شکل ۴۹-۷ نشان داده شده است، ثابت شد. دُمین اتصال یابنده به هورمون GR به تنهایی این انتقال را واسطه‌گری می‌کند. مطالعات بعدی نشان داد که در غیاب هورمون، GR در سیتوپلاسم به صورت تجمع پروتئینی بزرگ در کمپلکس با پروتئین‌های مهاری مانند Hsp90، پروتئین وابسته به Hsp70 (پروتئین شوک حرارتی اصلی در سلول‌های یوکاریوتی) وجود دارد. هر اندازه گیرنده در سیتوپلاسم بیشتر محدود شود، نمی‌تواند با ژن‌های هدف میانکنش دهد و از اینرو نمی‌تواند رونویسی را فعال کند. اتصال هورمون به گیرنده هسته‌ای هومودیمری، پروتئین‌های مهاری را آزاد می‌کند و اجازه می‌دهد گیرنده به داخل هسته برود و در آن جا به عناصر پاسخ مرتبط با ژن‌های هدف متصل شود (شکل ۵۰-۷). زمانی که گیرنده همراه با هورمون اتصال یافته به آن به عنصر پاسخ متصل می‌شود، رونویسی را توسط میانکنش با کمپلکس‌های تغییر شکل دهنده کروماتین و هیستون استیلاز و واسطه‌گر فعال می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۷-۷

تنظیم فعالیت عامل رونویسی

■ فعالیت‌های بسیاری از عوامل رونویسی به طور غیرمستقیم توسط اتصال پروتئین‌های خارج سلولی و پپتیدها به گیرنده‌های سطح سلولی تنظیم می‌شود. این گیرنده‌ها مسیرهای انتقال پیام

1- Transfection

درونی سلولی راکه عوامل رونویسی ویژه‌ای را از طریق یک عده از مکانیسم‌های شرح داده شده در فصل ۱۶ تنظیم می‌کنند.

■ گیرنده‌های هسته‌ای یک ابرخانواده از عوامل رونویسی انگشت روی C_4 را ایجاد می‌کنند که به هورمونهای محلول در چربی متصل می‌شوند و با عناصر پاسخ ویژه در DNA میانکنش می‌دهند (شکل ۴۷-۷ را ملاحظه کنید).

■ اتصال هورمون به گیرنده‌های هسته‌ای تغییرات ساختاری را القاء می‌کند که میانکنش آنها را با سایر پروتئین‌ها تغییر می‌دهد.

۸-۷ طویل شدن تنظیم شده و خاتمه رونویسی

در یوکاریوت‌ها، مکانیسم‌های خاتمه رونویسی برای هر سه RNA پلیمراز متفاوت است. رونویسی ژن‌های Pre-rRNA توسط RNA پلیمراز I توسط مکانیسمی که نیاز به عوامل خاتمه مختص پلیمراز دارد، به خاتمه می‌رسد. پروتئین اتصال یابنده به DNA به توالی پایین دست DNA یی خاص از واحد رونویسی متصل می‌شود. خاتمه مؤثر نیاز دارد که عامل رونویسی به DNAی الگو در جهت صحیح متصل شود. RNA پلیمراز III خالص‌سازی شده بعد از پلیمریزه کردن یک سری از ریشه‌های اوراسیل (U) به رونویسی خاتمه می‌دهد. دورگه دئوکسی (A) - ریبو (U) از DNA با RNA حاصل می‌شود. وقتی که تعدادی از اوراسیل‌ها سنتز شدند در مقایسه با سایر توالی‌های جفت بازی دیگر ناپایدار هستند. آسانی این دورگه برای ذوب شدن احتمالاً در مکانیسم خاتمه توسط RNA پلیمراز III شرکت می‌کند.

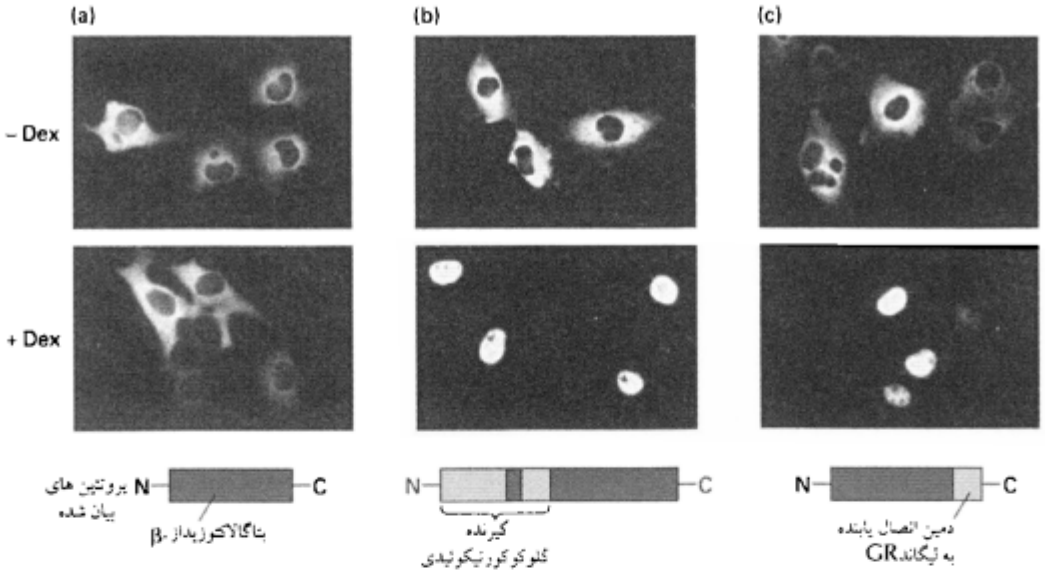
در اغلب ژن‌های رمزکننده پروتئین که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند، هنگامی که پلیمراز بیش از حدود ۵۰ باز را رونویسی کرد، طویل‌سازی به طور فعال پیش می‌رود و خاتمه نمی‌یابد تا بعد از اینکه توالی رونویسی شود که شکست و پلی آدنیله شدن RNA را در توالی که انتهای ′5 mRNA رمز شده را تشکیل می‌دهد، هدایت می‌کند. سپس RNA پلیمراز II می‌تواند در جایگاه‌های چندگانه که در فاصله ۲-۰/۵ کیلوبازی بعد جایگاه افزایش پلی (A) قرار گرفته‌اند رونویسی را خاتمه دهد. آزمایشات با ژن‌های جهش یافته نشان می‌دهد که خاتمه با فرایندهایی که انتهای ′۳ از رونوشت را برش و پلی آدنیله می‌کنند، جفت شده است که در فصل قبل توضیح داده شد. آزمایشات رسوب‌دهی ایمنی کروماتین و آزمایشات بیوشیمیایی پیشنهاد می‌کند که کمپلکس پروتئینی که رونوشت mRNA تازه تشکیل شده را در جایگاه‌های خاص می‌شکند و پلی آدنیله می‌کند مرتبط با دُمین انتهای کربوکسیلی (CTD) فسفریله شده از RNA پلیمراز II به تبع شروع رونویسی است (شکل ۳۱-۷ را ملاحظه کنید). این کمپلکس شکست پلی آدنیله کننده، ممکن است خاتمه رونویسی توسط RNA پلیمراز II را سرکوب کند. تا وقتی که توالی پیام شکسته شدن و پلی‌آدنیله شدن را بدهد توسط پلیمراز رونویسی می‌شود. اگرچه خاتمه رونویسی برای اغلب ژن‌ها تنظیم نشده است (برای برخی از ژن‌های خاص)، انتخاب بین طویل‌سازی، خاتمه یا ایست رونویسی در داخل چند ده باز از جایگاه شروع وجود دارد. این انتخاب بین طویل سازی و خاتمه یا سکون می‌تواند تنظیم شود، بنابراین رونویسی پروتئین رمز نشده نه تنها توسط آغاز رونویسی کنترل می‌شود بلکه توسط کنترل طویل سازی قبلاً در واحد رونویسی کنترل می‌شود، دو مثال از چنین تنظیمی را توضیح می‌دهیم.

رونویسی ژنوم HIV توسط یک مکانیسم ضدخاتمه تنظیم می‌شود

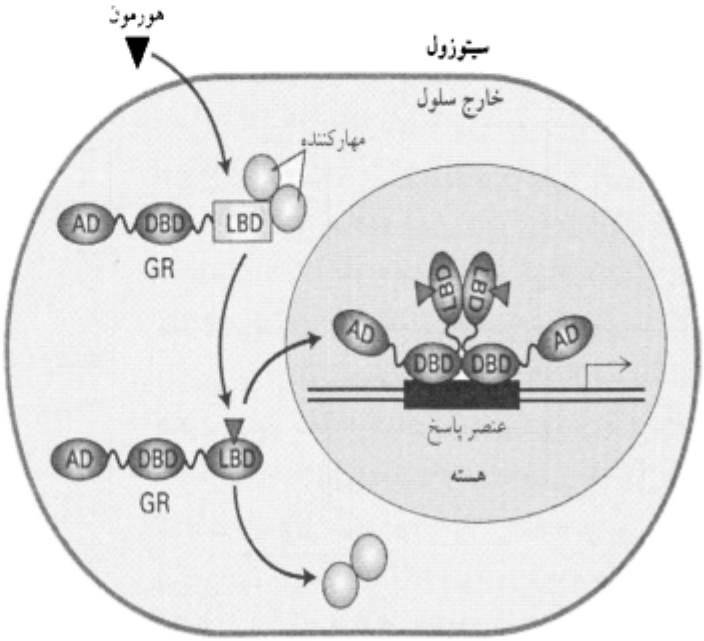
در حال حاضر، رونویسی از ژنوم ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) توسط RNA پلیمراز II مثال بهتر درک شده‌ای از خاتمه رونویسی تنظیم شده در یوکاریوت‌ها است. بیان مؤثر ژن‌های HIV به یک پروتئین ویروسی کوچکی که در لوکوس tat رمز می‌شود. نیاز دارد. سلول‌های عفونی شده با ویروس‌هایی جهش یافته tat^- رونوشت‌های ویروسی کوتاهی را ایجاد می‌کنند که با قطعات محدود حاوی نواحی نزدیک پروموتری از DNA ویروس HIV تشکیل دورگه (هیبرید) می‌دهد ولی با قطعات محدود بیشتر در پایین دست پروموتر دورگه تشکیل نمی‌دهد. برخلاف آن، سلول‌های عفونی شده با گونه وحشی HIV رونوشت‌های طویلی را سنتز می‌کنند که با قطعات محدود از طریق واحد رونویسی HIV منفرد، دورگه تشکیل می‌دهند. بنابراین پروتئین tat به عنوان **عامل ضدخاتمه**[1] عمل می‌کند و اجازه می‌دهد RNA پلیمراز II یک واحد رونویسی را بخواند. از این رو عمل ضد خاتمه توسط پروتئین tat برای همانندسازی HIV لازم است. درک بیشتر از مکانیسم کنترل ژنی ممکن است در طراحی درمان‌های مؤثر برای سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) مؤثر باشد.

tat یک پروتئین اتصال یابنده به RNA مختص توالی است. این پروتئین به یک نسخه RNA از یک توالی که TAR نامیده می‌شود، متصل می‌شود که در نزدیکی انتهای ′۵ رونوشت HIV

1- Antitermination factor



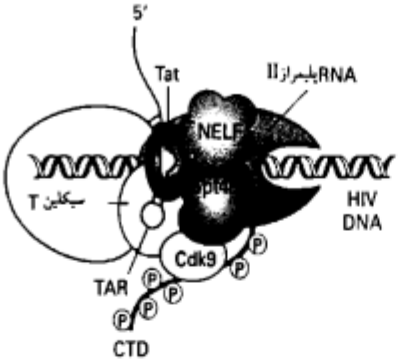
▲ شکل تجربی ۴۹-۷ پروتیئن‌های ادغامی از حامل‌های بیانی تأیید می‌کنند که دُمین اتصال یابنده گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی (GR) انتقال به هسته را در حضور هورمون واسطه‌گری می‌کند. سلول‌های جانوری کشت داده شده که حامل‌های بیانی را دریافت کرده بودند، پروتئین‌های آورده شده در پایین شکل را رمز می‌کنند. آزمایش ایمونوفلورسانس یک آنتی‌بادی نشاندار مختص بتاگالاکتوزیداز برای شناسایی پروتئین‌های بیان شده در سلول‌های دریافت‌کننده مورد استفاده قرار گرفت. (a) در سلول‌هایی که تنها بتاگالاکتوزیداز را بیان می‌کنند، این آنزیم داخل سیتوپلاسم و در حضور و غیاب هورمون گلوکوکورتیکوئیدی دگزامتازون (Dex) قرار گرفته بود. (b) در سلول‌هایی که پروتئین ادغامی شامل بتاگالاکتوزیداز و گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی کامل (GR) را بیان می‌کردند، این پروتئین ادغامی در سیتوپلاسم در غیاب هورمون وجود داشت ولی در حضور هورومون به هسته منتقل شد. (c) سلول‌هایی که یک پروتئین ادغامی متشکل از بتاگالاکتوزیداز و فقط دُمین اتصال یابنده به لیگاند گیرنده گلوکوکورتیکوئید را بیان می‌کردند، نیز انتقال وابسته به هورمون پروتئین ادغامی را به هسته نشان دادند.



◀ شکل ۵۰-۷ مدل فعالسازی ژنی وابسته به هورمون توسط گیرنده هسته‌ای هومودیمری. در غیاب هورمون، گیرنده توسط میانکنش بین دُمین اتصال یابنده به لیگاند (LBD) و پروتئین‌های مهارگر در سیتوپلاسم نگه داشته می‌شود. هنگامی که هورمون وجود دارد، از طریق غشاء پلاسمایی انتشار پیدا کرده و به دُمین اتصال یابنده به لیگاند متصل می‌شود و باعث تغییر ساختاری می‌شود که گیرنده را از پروتئین‌های مهارگر رها می‌کند. سپس گیرنده با لیگاند اتصال یافته به آن به داخل هسته منتقل می‌شود و در آنجا دُمین اتصال یابنده به DNA (DBD) به عناصر پاسخ متصل می‌شود و اجازه می‌دهد دُمین اتصال یابنده به لیگاند و دُمین فعالسازی دیگری (AD) در انتهای N رونویسی ژن‌های هدف را تحریک کند.

قرار دارد. توالی TAR به یک RNA سنجاق سری با یک برآمدگی در وسط ساقه (شکل ۵۱-۷) تا می‌خورد. TAR دارای دو جایگاه اتصالی است، یکی با tat میانکنش می‌دهد و دیگری با پروتئین سلولی به نام سیکلین T میانکنش می‌دهد. همانطور که در شکل ۵۱-۷ ترسیم شده است پروتئین Tat ویروس HIV و سیکلین T سلولی هر کدام به RNAی TAR متصل می‌شوند و همچنین به طور مستقیم با همدیگر میانکنش می‌دهند و به طور متقارن به هم متصل می‌شوند، که شبیه به اتصال تعاونی عوامل رونویسی اتصال یابنده به DNA است (شکل ۲۹-۷ را ملاحظه کنید). میانکنش سیکلین T با پروتئین کینازی به نام CDK9 پروتئین کینازی را فعال می‌کند که سوبسترای آن CTD آنزیم RNA پلیمراز II است. مطالعات رونویسی با استفاده از یک مهارگر ویژه و CDK پیشنهاد می‌کند که مولکول‌های RNA پلیمراز II که رونویسی را بر روی پروموتر HIV شروع می‌کنند، بعد از رونویسی از حدود ۵۰ باز رونویسی را خاتمه می‌دهند مگر اینکه CTD توسط CDK9 هیپرفسفریله شود. اتصال تعاونی سیکلین T و Tat به توالی TAR در انتهای ′۵ رونوشت HIV را در کنار CDK9 قرار می‌دهد چنانکه آن می‌تواند CTD را فسفریله بکند و بدان جهت جلوی خاتمه رونویسی را بگیرد و اجازه می‌دهد که پلیمراز به طویل‌سازی زنجیره ادامه دهد.

چندین پروتئین سلولی دیگر شامل SPT4 و SPT5 و کمپلکس NELF در فرایندی که توسط آن پروتئین Tat ویروس HIV طویل سازی را بر علیه خاتمه کنترل می‌کند، نقش دارند (شکل ۵۱-۷). آزمایشات با مهارگر ویژه CDK9 که در بالا شرح داده شده است و جهش یافته‌های مخمری SPT4 و SPT5، حاکی از آن است که این پروتئین‌های سلولی برای طویل سازی رونویسی بیش از حدود ۵۰ باز برای اغلب ژن‌ها مورد نیاز هستند. ولی برای اغلب ژن‌ها، این پروتئین‌ها به نظر می‌رسد به طور مداوم بدون آن که تنظیم شوند عمل می‌کنند. همچنان که در فصل ۸ توضیح داده شده است، ایست RNA پلیمراز II توسط SPT4/5 تحریک می‌شود و گمان می‌شود که NELF طویل سازی را تا اینکه عوامل پردازش mRNA با CTD فسفریله شده ارتباط برقرار کنند، به تأخیر می‌اندازد. فسفریلاسیون بیشتر CTD توسط سیکلین - CDK9 T (بعنوان PTEFb نیز شناخته می‌شود) به نظر می‌رسد این ایست را معکوس می‌کنند و اجازه می‌دهند که طویل سازی ادامه یابد. در حال حاضر واضح نیست که چرا این فرایند بطور مداوم برای پروموتر HIV، جایی که اتصال متعاون Tat و سیکلین T به توالی



▲ **شکل ۵۱-۷ مدلی از کمپلکس ضدخاتمه تشکیل یافته از پروتئین tat از HIV و چندین پروتئین سلولی.** عنصر TAR در رونوشت HIV دارای توالی‌ایی است که توسط Tat و پروتئین سلولی سیکلین T شناخته می‌شود و سیکلین T پروتئین‌کیناز و CDK را فعال می‌کند و به قرارگیری آن در نزدیکی CTD آنزیم RNA پلیمراز II کمک می‌کند. فسفریلاسیون CTD مانع از خاتمه رونویسی می‌شود و اجازه می‌دهد رونویسی ادامه یابد. پروتئین‌های سلولی SPT4 و SPT5 و کمپلکس NELF نیز در تنظیم خاتمه رونویسی HIV دخالت می‌کنند.

TAR در RNA برای فعالسازی CDK9 و طویل سازی مؤثر لازم است، وجود ندارد.

ایست نزدیک پروموتری RNA پلیمراز II در ژن‌های القا شده رخ می‌دهد

ژن‌های شوک حرارتی (مانند Hsp70) مکانیسم‌های دیگر برای تنظیم طویل سازی زنجیره RNA در یوکاریوت‌ها روشن می‌سازند. در طی رونویسی این ژن‌ها، RNA پلیمراز II بعد از رونویسی حدود ۲۵ نوکلئوتید ایست می‌کند ولی رونویسی را خاتمه نمی‌دهد (همانطور که در هنگام رونویسی از ژنوم HIV در غیاب پروتئین Tat اتفاق می‌افتد). پلیمراز ایست کرده با RNA تازه ساخته شده و DNA الگو به صورت مرتبط باقی می‌ماند و پس از چند دقیقه رونویسی ژن را ادامه می‌دهد. همچنان که اولین پلیمراز رونویسی می‌کند و از پروموتر فاصله می‌گیرد، RNA پلیمراز IIی دیگر به پروموتر متصل می‌شود و رونویسی را شروع می‌کند و بعد از رونویسی حدود ۲۵ نوکلئوتید ایست می‌کند که چندین دقیقه قبل این تکرار شده بود. وقتی شوک حرارتی رخ می‌دهد، عامل رونویسی پروتیئن شوک حرارتی (HTSF) فعال می‌شود. اتصال بعدی HTSF فعال شده به جایگاه‌های خاص در ناحیه نزدیک به پروموتری ژن‌های شوک حرارتی، پلیمراز متوقف شده را تحریک می‌کند که به طویل سازی زنجیره ادامه دهد و شروع مجدد و سریع

توسط مولکول‌های RNA پلیمراز دیگر را آغاز می‌کند، این امر منجر به آغازهای رونویسی متعدد در هر دقیقه می‌شود.

ایست در طی رونویسی ژن‌های شوک حرارتی در ابتدا در دروزوفیلا کشف شد ولی نشان داده شده است که مکانیسم مشابهی نیز در سلول‌های انسانی اتفاق می‌افتد. ژن‌های شوک حرارتی توسط شرایط داخل سلولی که پروتئین‌ها را دناتوره می‌کند (مثلاً، افزایش دما "شوک حرارتی") القاء می‌شوند. برخی از این ژن‌ها پروتئینهایی را رمز می‌کنند که نسبتاً به شرایط دناتوره کننده مقاوم هستند و سایر پروتئین‌ها را از دناتوره شدن حفاظت می‌کنند. پروتئین‌های دیگر چاپرون‌ها هستند که پروتئین‌های دناتوره شده را دوباره به حالت اولیه برمی‌گرداند (فصل ۳). مکانیسم کنترل رونویسی که برای تنظیم بیان این ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گرد اجازه پاسخ سریع را می‌دهد: این ژن‌ها همیشه و در حالتی که رونویسی به حال تعلیق درمی‌آید دچار ایست می‌شوند. و بنابراین، زمانی که حادثه‌ای رخ می‌دهد، زمانی برای تغییر شکل و استیله شدن کروماتین در پروموتر و تجمع یک کمپلکس پیش آغازین لازم نمی‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۸-۷

طویل‌سازی تنظیم شده و خاتمه رونویسی

- مکانیسم‌های مختلفی را خاتمه رونویسی توسط هر یک از RNA پلیمرازهای هسته‌ای یوکاریوتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. رونویسی اغلب ژن‌های رمزکننده پروتئین خاتمه نمی‌یابد تا اینکه یک توالی RNAیی سنتز شود که جایگاه شکست RNA و پلی‌آدنیلاسیون را تعیین کند.
- رونویسی ژنوم HIV توسط RNA پلیمراز II توسط مکانیسم ضد خاتمه تنظیم می‌شود که نیاز به اتصال تعاونی توسط پروتئین Tat رمزدار شده ویروسی و سیکلین T در توالی TAR نزدیک به انتهای ۵' RNAی HIV دارد.
- در طی رونویسی ژن‌های شوک حرارتی دروزوفیلا، RNA پلیمراز II در درون ناحیه نزدیک پروموتری پائین دست ایست می‌کند این انقطاع در رونویسی وقتی است که عامل رونویسی HSTF فعال می‌شود و نتیجه‌اش رونویسی خیلی سریع ژن‌های شوک حرارتی در پاسخ به تجمع پروتئین‌های دناتوره است.

۹-۷ سایر سیستم‌های رونویسی یوکاریوتی

ما این فصل را با خلاصه‌ای از مبحث شروع رونویسی توسط دو RNA پلیمراز هسته‌ای یوکاریوتی دیگر (پلیمراز I و II) پلیمرازهای دیگر که از DNAی میتوکندریایی و کلروپلاستی رونویسی می‌کنند به پایان می‌رسانیم. اگرچه این سیستم‌ها و مخصوصاً تنظیم آنها کمتر از رونویسی توسط RNA پلیمراز II شناخته شده است. ولی به طور یکسان برای زندگی سلول‌های یوکاریوتی ضروری هستند.

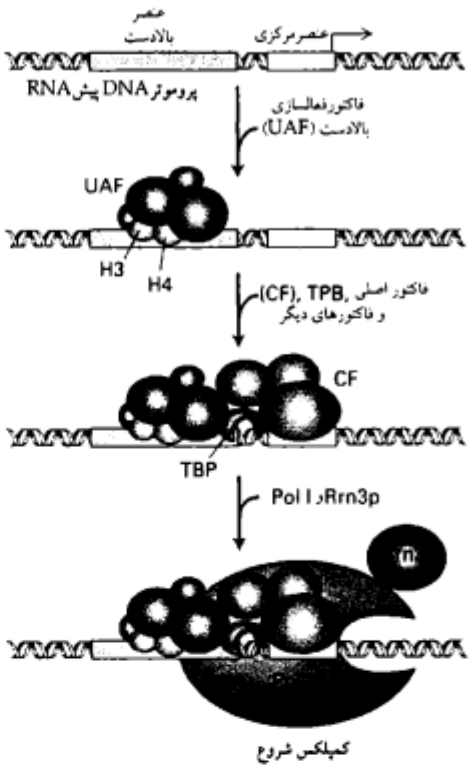
شروع رونویسی توسط پلیمراز I و پلیمراز III مشابه پلیمراز II است

تشکیل کمپلکس‌های آغاز رونویسی شامل پلیمراز I و پلیمراز III در برخی نکات با تجمع کمپلکس‌های پیش آغاز پلیمراز II مشابه هستند (شکل ۳۱-۷ را ملاحظه کنید). به هر حال، هر یک از سه پلیمراز هسته‌ای نیاز به عوامل رونویسی عمومی خاص خودشان دارند و عناصر کنترلی DNA متفاوت را می‌شناسند، با وجود این، نه پلیمراز I و نه پلیمراز III نیاز به هیدرولیز ATP به منظور شروع رونویسی ندارند در صورتیکه پلیمراز II نیاز دارد.

شروع رونویسی توسط پلیمراز I که پیش rRNA را سنتز می‌کند و پلیمراز III که tRNA و S RNA ۵ها و سایر RNA های کوچک و پایدار را سنتز می‌کند (جدول ۲-۷ را ملاحظه کنید) منحصراً در ساکارومایسس سرویزیه با استفاده از روش‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی شناخته شده است. این امر واضح است که سنتز tRNAها و rRNAها که به ریبوزوم ملحق می‌شوند به طور محکم با سرعت رشد و تکثیر سلول جفت شده است. به هر حال، اینکه چگونه شروع رونویسی توسط پلیمراز I و III تنظیم می‌شود به طوریکه سنتز پیش rRNA و 5S rRNA و tRNAها با رشد و همانندسازی سلول‌ها هماهنگ شود، هنوز درک نشده است.

آغاز رونویسی توسط پلیمراز I. عناصر تنظیمی آغاز رونویسی پلیمراز I در جایگاه شروع رونویسی قرار گرفته است که در پستانداران و مخمر مشابه هم است. یک عنصر اصلی در اطراف جایگاه شروع رونویسی از ۴۰ - تا ۹۵ برای رونویسی پلیمراز I ضروری است. یک عنصر بالادست دیگری از تقریباً ۱۵۵ - تا ۶۰ - در *In Vitro* رونویسی پلیمراز I را ده مرتبه تحریک می‌کند.

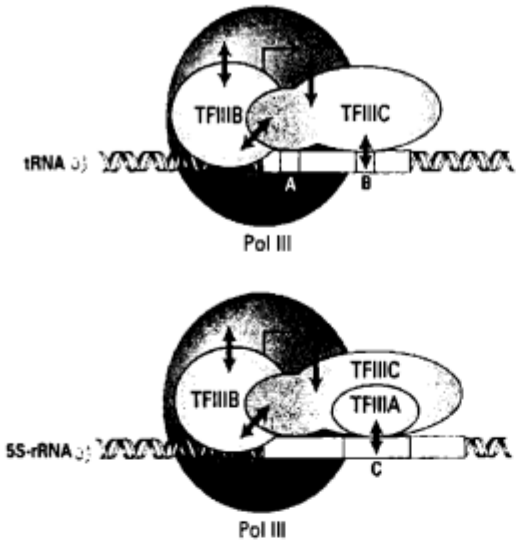
تجمع یک کمپلکس شروع پلیمراز I کاملاً فعال، با اتصال یک عامل فعال‌کننده بالادستی چندتایی (UAF) به عنصر بالادست شروع می‌شود (شکل ۵۲-۷). دو تا از شش زیرواحد سازنده UAF هیستون‌ها هستند که احتمالاً در اتصال به DNA شرکت می‌کنند. یک عامل اصلی سه تایی همراه با TBP به عنصر اصلی متصل می‌شود که هم با UAF اتصال یافته و هم با عامل اصلی تماس ایجاد می‌کند. سرانجام، یک کمپلکس تشکیل یافته از پلیمراز I و Rrn3p با پروتئین‌های اتصال یافته ارتباط برقرار می‌کند وپلیمراز I



▲ **شکل ۵۲-۷ تجمع در in vitro از کمپلکس شروع رونویسی پلیمراز I مخمری.** UAF و CF، هردو، عوامل رونویسی عمومی چندتایی هستند که به عنصر بالادست (UE) و عنصر اصلی (به ترتیب) در پروموتر DNA متصل می‌شوند. TBP و یک عامل چندتایی (Rrn3p) مرتبط با RNA پلیمراز I (Pol I) هستند و در تشکیل کمپلکس شروع نیز شرکت می‌کند.

را در نزدیک جایگاه شروع قرار می‌دهند. در سلول‌های انسانی، TBP به طور پایدار به سه پلی پپتید دیگر متصل شده و یک عامل رونویسی به نام SL1 را تشکیل می‌دهند که به عنصر پروموتر اصلی متصل می‌شود و از لحاظ عملکردی مشابه با عامل اصلی مخمری به اضافه TBP است.

آغاز توسط پلیمراز III (Pol III). برخلاف ژن‌های رمزکننده پروتئین و ژن‌های پیش rRNA، نواحی پروموتری ژن‌های tRNA و 5S-rRNA به طور کامل داخل توالی رونویسی شده قرار می‌گیرد (شکل ۵۳-۷). دو عدد از چنین عناصر پروموتری داخلی که جعبه A و جعبه B نامیده می‌شوند در همه ژن‌های tRNA وجود دارند. این توالی‌های بسیار حفاظت شده نه تنها به عنوان پروموتر عمل می‌کنند بلکه دو قسمت ثابت از tRNA های یوکاریوتی را رمزمی‌کنند که برای سنتز پروتئین مورد نیاز هستند. در ژن‌های 5SrRNA یک ناحیه کنترل داخلی منفرد، (جعبه C) به صورت پروموتر عمل می‌کند.



▲ **شکل ۵۳-۷ (شکل رنگی) عناصر کنترل رونویسی در ژن‌های رونویسی شده توسط RNA پلیمراز III.** هر دو ژن tRNA و 5S-rRNA دارای عناصر پروموتری درونی، در پایین دست جایگاه شروع قرار گرفته است و جعبه‌های A، B و C نامیده می‌شوند. تجمع کمپلکس‌های شروع رونویسی بر روی این ژن‌ها با اتصال عوامل رونویسی عمومی خاص پلیمراز III، TFIIIA، TFIIIB و TFIIIC به این عناصر کنترلی شروع می‌شود. پیکان‌های سبز میانکنش‌های قوی پروتئین با DNA مختص توالی را نشان می‌دهند. پیکان‌های آبی نشان دهنده میانکنش بین عوامل عمومی است. پیکان‌های ارغوانی نشان دهنده میانکنش‌های بین عوامل رونویسی عمومی و پلیمراز III است.

سه عامل رونویسی عمومی برای آغاز رونویسی از ژن‌های tRNA و 5s-rRNA در *In Vitro* لازم هستند. دو عامل چندتایی، (TFIIIC و TFIIIB) در آغاز رونویسی در پروموترهای tRNA و 5S-rRNA شرکت می‌کنند. عامل سوم، TFIIIA برای آغاز رونویسی در پروموترهای 5S-rRNA مورد نیاز است. مانند تجمع کمپلکس‌های آغازی پلیمراز I و پلیمراز II ، عوامل رونویسی عمومی پلیمراز III به DNAی پروموتر در یک توالی تعیین شده متصل می‌شوند.

نیمه انتهای N از زیرواحد TFIIIB که *BRF* نامیده می‌شود (عامل وابسته به TFIIB) دارای توالی مشابهی با TFIIB است (یک عامل پلیمراز II). این شباهت پیشنهاد می‌کند که *BRF* و TFIIB مشابهی را در آغاز رونویسی برای هدایت پلیمراز به جایگاه شروع انجام می‌دهد. هنگامی که TFIIIB به ژن tRNA یا 5S-rRNA متصل شده است، پلیمراز III می‌تواند به پروموتر متصل شده و رونویسی را در حضور ریبونوکلئوتید تری‌فسفاته آغاز کند. زیرواحد BRF از TFIIIB به طور اختصاصی با یکی از زیرواحدهای پلیمراز که مختص آن است، میانکنش می‌دهد که گمان

می‌شود برای شروع رونویسی توسط این RNA پلیمراز هسته‌ای ویژه باشد.

یکی دیگر از سه زیرواحد تشکیل دهنده TFIIIB، TBF است که یکی از اجزاء تشکیل‌دهنده عامل رونویسی عمومی برای هر سه RNA پلیمراز هسته‌ای یوکاریوتی است. این یافته که TBP در آغاز رونویسی توسط پلیمراز I و پلیمراز III نقش دارد جالب بود. از اینرو پروموترهایی که توسط این آنزیم‌ها شناخته می‌شود اغلب دارای جعبه‌های TATA نیستند. با وجود این، مطالعات اخیر حاکی از این است که زیرواحد TBP از TFIIIB با DNA مشابه با طریقی که با جعبه‌های TATA میانکنش می‌دهد، میانکنش می‌دهد.

DNA های میتوکندریایی و کلروپلاستی توسط پلیمرازهای خاص اندامکی رونویسی می‌شوند

همانطور که در فصل ۶ شرح داده شده است، میتوکندری و کلروپلاست‌ها از باکتری‌ها حاصل شده‌اند و به سلول‌های اجدادی دارای هسته یوکاریوتی آندوسیتوز شده‌اند. در یوکاریوت‌های پیشرفته هر دو اندامک دارای RNAهای مجزایی هستند که برخی از پروتئین‌های اساسی برای عملکرد آنها را رمز می‌کنند. به طور جالب توجه، RNA پلیمرازهایی که DNA میتوکندریایی و DNA کلروپلاستی را رونویسی می‌کنند مشابه پلیمرازهای باکتری‌ها و باکتریوفاژها است که منعکس‌کننده منشاء تکاملی آنها است.

رونویسی میتوکندریایی. RNA پلیمرازی که mtRNA را رونویسی می‌کند توسط DNA هسته‌ای رمزدار می‌شود. بعد از سنتز آنزیم در سیتوزول، آن به داخل ماتریکس میتوکندری توسط مکانیسمی که در فصل ۱۳ شرح داده شده است وارد می‌شود. RNA پلیمرازهای میتوکندریایی از (ساکارومایسس سرویزیه) S. cervisiae و گزنوپوس لویس هر دو دارای یک زیرواحد بزرگ با فعالیت پلیمریزه کننده ریبونوکلئوتیدی و یک زیرواحد B کوچک است (TFBM). پروتئین ماتریکسی دیگر، عامل A رونویسی میتوکندریایی به پروموترهای mtRNA متصل می‌شود و در جایگاه‌های شروع استفاده شده در سلول برای آغاز رونویسی مهم است. زیرواحد بزرگ RNA پلیمراز میتوکندریایی مخمر به وضوح مرتبط با RNA پلیمرازهای مونومری باکتریوفاژ T7 و باکتریوفاژهای مشابه است. به هر حال، آنزیم میتوکندریایی از لحاظ عملکردی متفاوت از آنزیم باکتریوفاژی از لحاظ وابستگی آن به دو پلی پپتید دیگر برای رونویسی از جایگاه‌های شروع است.

توالی‌های پروموتری شناخته شده توسط RNA پلیمراز میتوکندریایی شامل جایگاه شروع رونویسی است. این توالی‌های پروموتری غنی از رزیدوهای A هستند و در mtDNA از منشأ مخمرها گیاهان و جانوران شناخته شده‌اند. ژنوم میتوکندریایی انسان حلقوی است و دارای دو توالی پروموتری ۱۵ جفت بازی وابسته به آن است، پروموتر برای رونویسی از هر دو زنجیره است. هر زنجیره به طور کامل رونویسی می‌شود، رونوشت اولیه بزرگ است و به منظور ایجاد mRNA ها، RNA ها و tRNA ها پردازش می‌شود. پروموتر دوم مسئول رونویسی نسخه‌های بیشتر از rRNA ها است.

در حال حاضر، فهم نسبتاً کمی از چگونگی تنظیم رونویسی ژنوم میتوکندریایی به منظور هماهنگ کردن تولید پروتئین‌های میتوکندریایی جدید با سنتز و ورود هزاران پروتئین رمز شده از DNA هسته‌ای که شامل پروتئین میتوکندریایی است، وجود دارد.

رونویسی کلروپلاستی. DNA ی کلروپلاستی توسط دو نوع RNA پلیمراز رونویسی می‌شود، یکی پروتئین چند زیرواحدی مشابه با RNA پلیمرازهای باکتریایی و یکی دیگر مشابه با آنزیم‌های تک زیرواحدی باکتریوفاژ و میتوکندری‌ها است. زیرواحدهای مرکزی آنزیم نوع باکتریایی زیرواحدهای α، β، β' و ω در DNA ی کلروپلاست‌های گیاهان عالی‌تر رمز می‌شود. در صورتی که شش عامل σ شبیه σ^{70} در DNA هسته‌ای گیاهان عالی‌تر رمز می‌شود. این مثال دیگری از انتقال ژن‌ها از ژنوم اندامکی به ژنوم هسته‌ای در طی تکامل است. در این حالت، ژن‌های رمزکننده عوامل آغاز رونویسی تنظیمی به هسته منتقل می‌شوند و در آنجا رونویسی‌شان توسط RNA پلیمراز هسته‌ای II را کنترل می‌کنند و به نظر می‌رسد به طور غیرمستقیم رونویسی عده‌ای از ژن‌های کلروپلاستی را نیز کنترل می‌کنند. RNA پلیمراز کلروپلاستی شبه باکتریایی، پلیمراز پلاستید نامیده می‌شود. زیرا مرکز کاتالیتیکی این آنزیم توسط ژنوم کلروپلاستی رمز می‌شود. اغلب ژن‌های کلروپلاستی توسط این آنزیم‌ها رونوشت‌برداری می‌شوند و نواحی کنترلی ۳۵- و ۱۰- شبیه به پروموتر در سیانوباکتری‌ها دارند که از آنها حاصل شده‌اند. RNA پلیمراز شبه T7 کلروپلاستی همچنین در ژنوم گیاهان عالی‌تر رمز می‌شود. آن عده متفاوتی از ژن‌های کلروپلاستی را رونویسی می‌کند که شامل ژن‌های رمزکننده زیرواحدهای پلیمراز پلاستیدی چندزیرواحدی شبه باکتریایی است. همانند رونویسی میتوکندریایی، در حال حاضر کمتر در مورد چگونگی تنظیم رونویسی DNA کلروپلاستی شناخته شده است.

نکات کلیدی بخش ۹-۷

سایر سیستم‌های رونویسی یوکاریوتی

- فرآیندهای شروع رونویسی توسط RNA پلیمراز I و RNA پلیمراز III شبیه RNA پلیمراز II است ولی نیاز به عوامل رونویسی متفاوت دارد که توسط عناصر پروموتر متفاوت هدایت می‌شود و هیدرولیز ATP را نیاز ندارد.
- DNA میتوکندریایی توسط RNA پلیمراز رمزشده از هسته که متشکل از دو زیرواحد است رونویسی می‌شود. یک زیرواحد مشابه RNA پلیمراز مونومری باکتریوفاژ T7 است و بقیه مشابه عوامل δ باکتریایی است.
- DNA کلروپلاستی توسط RNA پلیمراز رمزشده از کلروپلاست رونویسی می‌شود و مشابه RNA پلیمرازهای باکتریایی است ولی آن فاقد عامل δ است.

چشم‌اندازی به آینده

در سال‌های اخیر مطالب زیادی در مورد کنترل رونویسی در یوکاریوت‌ها آموخته شده است. ژن‌های رمزکننده در حدود ۲۰۰۰ فعال‌کننده و مهارگر می‌تواند در ژنوم انسان شناخته شوند. ما اکنون یک نگاه اجمالی به اینکه چگونه تعداد خیلی زیادی از ترکیبات امکان‌پذیر از این عوامل رونویسی می‌توانند ایجاد پیچیدگی کنترل ژنی مورد نیاز برای تولید موجودات زنده‌ای بکنند که ما آنها را در اطراف خود می‌بینیم، می‌اندازیم. اگرچه اکنون می‌دانیم که چه فرآیندهایی یک ژن را خاموش و روشن می‌کنند. ما فهم کمی از این داریم که چگونه میزان رونویسی به منظور تأمین یک سلول با مقادیر مناسب از انواع پروتئین‌هایش کنترل می‌شود. در پیش‌سازهای سلولی قرمز خونی ژن‌های گلوبولین با سرعت خیلی بیشتر از ژن‌های رمزکنندهٔ آنزیم‌های متابولیسمی رونویسی می‌شوند (که ژن‌های خانه نگهدار هم نامیده می‌شوند). چگونه تفاوت‌های زیاد در میزان شروع رونویسی در انواع ژن‌ها حاصل شده است؟ چه اتفاقی برای میانکنش‌های چندگانه بین دُمین‌های فعال‌کننده، کمپلکس‌های کمک فعال‌کننده، عوامل رونویسی و RNA پلیمراز II می‌افتد هنگامی که پلیمراز رونویسی را شروع می‌کند و در فاصله دوری از ناحیه پروموتری رونویسی می‌کند؟ آیا آنها به طور کامل در پروموترهایی که بطور کمی رونویسی می‌شوند از هم جدا می‌شوند بطوریکه اجزاء عوامل چندگانه مورد نیاز رونویسی بایستی از نو برای هر دور از رونویسی مجتمع شوند؟ آیا کمپلکس‌های فعال‌کننده با کمک فعال‌کننده‌های چندین میانکنش دهنده در پروموترهایی که آغاز دوباره در آنها با سرعت اتفاق می‌افتد، مجتمع می‌شوند، چنانکه تجمع کامل آنها هر زمان که یک پلیمراز رونویسی را آغاز می‌کند، لازم نیست ایجاد شود؟

مطالب زیادی برای فهم درباره ساختار کروماتین و اینکه چگونه آن ساختار رونویسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد باقی مانده است. چه ترکیبات اضافی دیگر در کنار HP1 و لیزین ۹ متیله شده‌ی H3 به منظور هدایت نواحی خاص کروماتین برای تشکیل هتروکروماتین جایی که رونویسی مهار شده است، مورد نیاز است؟ زمانی که کمپلکس‌های تغییرشکل‌دهنده کروماتین و کمپلکس‌های هیستون استیلاز با ناحیه پروموتری مرتبط می‌شوند، چگونه آنها متصل باقی می‌مانند؟ مدل‌های فعلی پیشنهاد می‌کند که زیرواحدهای خاص این کمپلکس‌ها به دنباله‌های هیستونی تغییریافته متصل می‌شوند. چنانکه نتیجه ترکیب اتصال به تغییر دنباله هیستونی خاص با تغییر دنباله هیستونی به همان روش، بازگشت کمپلکس تغییردهنده در یک ناحیه پروموتر فعال شده است. در برخی حالات، این نوع از مکانیسم تجمع باعث می‌شود که این کمپلکس‌ها در طول رشته کروماتینی منتشر شوند. چه چیزی کنترل می‌کند که چنین کمپلکس‌هایی پخش شوند و به چه فواصلی آنها پخش خواهند شد؟ دُمین‌های فعال‌کننده منفرد کشف شده‌اند که با چندین کمپلکس کمک فعال‌کننده میانکنش می‌دهند. آیا این میانکنش‌ها موقت هستند چنانکه همان دُمین فعال‌کننده می‌تواند به ترتیب با چندین کمک فعال‌کننده میانکنش دهد؟ ترتیب خاصی از میانکنش کمک فعال‌کننده لازم است؟ چگونه میانکنش دُمین‌های فعال‌کننده با واسطه‌گر رونویسی را تحریک می‌کند؟ آیا این میانکنش‌ها به سادگی تجمع کمپلکس پیش آغازی را تحریک می‌کنند و یا سرعتی را که در آن RNA پلیمراز II رونویسی از یک کمپلکس پیش آغازی مجتمع شده را شروع می‌کند، تحت تأثیر قرار می‌دهد؟

فعالسازی رونویسی یک فرایند بسیار تعاونی است بطوریکه ژن‌های بیان شده در یک نوع خاص سلول فقط زمانی که عده کاملی از فعال‌کننده‌ها که بیان ژن را کنترل می‌کنند بیان می‌شوند. همچنان که قبلاً توضیح داده شده است برخی از عوامل رونویسی که بیان ژن TTR را در کبد کنترل می‌کنند در سلول‌های روده‌ای و کبدی نیز بیان می‌شوند. ولی ژن TTR در سایر بافت‌ها بیان نمی‌شود به این جهت که رونویسی آن نیاز به دو عامل رونویسی دیگری دارد که فقط در کبد بیان می‌شوند. چه مکانیسمی را برای این عمل بسیار تعاونی عوامل رونویسی تخمین می‌زنید که برای بیان ژن مختص نوع سلولی ضروری است؟

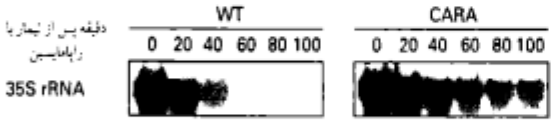
اگرچه فهم تکوین طبیعی و فرآیندهای غیرطبیعی مرتبط با بیماری نیاز به پاسخ به این سؤالات و بسیاری از سؤالات مرتبط خواهد داشت. فهم بیشتر از اصول کنترل رونویسی حاصل شده است و این دانش به نظرمی رسد به کار برده می‌شود. این فهم ممکن است اجازه کنترل دقیق بیان ژن‌های درمانی وارد شده توسط حامل‌های ژن درمانی همچنانکه آنها گسترش پیدا می‌کنند را بدهد. فهم جزئی از میانکنش‌های مولکولی که رونویسی را کنترل می‌کنند ممکن است اهداف جدیدی را برای گسترش داروهای درمانی که بیان ژن‌های خاص را مهار یا تحریک می‌کنند، به وجود آورد. فهم کامل‌تر از مکانیسم‌های کنترل رونویسی ممکن است اجازهٔ مهندسی بهتر محصولات کشاورزی با خصوصیات مورد نظر را بدهد. به طور مشخص، پیشرفت‌های بیشتر در حیطهٔ کنترل رونویسی به ارضاء خواسته ما برای درک اینکه چگونه موجودات پیچیده‌ای مانند انسان تکوین می‌یابند و عمل می‌کنند، کمک خواهد کرد؟

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در یوکاریوت‌ها سه RNA پلیمراز I، II و III هرکدام ژن‌های خاص مورد نیاز برای سنتز ریبوزوم‌های RNA، ۱۸S و ۲۵S (پلیمراز I)، ۵S rRNA (پلیمراز III) و mRNA‌ها برای پروتئین‌های ریبوزومی (پلیمراز II) را رونویسی می‌کنند. محققان فکر می‌کنند که فعالیت‌های این سه RNA پلیمراز براساس نیاز سلول برای سنتز ریبوزوم هماهنگ می‌شود. (به طور عمده در سلول‌های در حال همانندسازی و در شرایط تغذیه‌ای غنی و یا وقتی که مواد مغذی کمیاب هستند). به منظور تعیین اینکه آیا فعالیت‌های سه نوع پلیمراز هماهنگ می‌شود، لافرت[1] و همکارانش سوشی از مخمر را که تا حدی مقاوم به مهار رشد سلولی توسط داروی راپامایسین بود را طراحی کردند.

همچنانکه در فصل ۸ توضیح داده شده است، راپامایسین یک پروتئین کیناز را (که TOR نامیده می‌شود و هدف راپامایسین هست) مهار می‌کند که سرعت کلی سنتز پروتئین و سنتز ریبوزوم را تنظیم می‌کند. وقتی TOR توسط راپامایسین مهار شد، رونویسی از rRNA ها توسط پلیمراز I و III و mRNA های پروتئین ریبوزومی توسط RNA پلیمراز II به سرعت مهار شد. قسمتی از مهار سنتز rRNA توسط پلیمراز I درنتیجه جدا شدن عامل رونویسی پلیمراز Rrn3 از پلیمراز I (شکل ۵۲-۷ را ملاحظه کنید)، است. در سوش ایجاد شده توسط لافرت و همکارانش ژن Rrn3 گونه وحشی و ژن A43 گونه وحشی (زیرواحدی از پلیمراز I را رمز می‌کرد که به Rrn3 متصل می‌شد)، با یک ژن رمزدارکننده یک پروتئین ادغامی از زیرواحد A43 پلیمراز I با Rrn3 جابجا شد. نظریه بر این اساس بود که الحاق کووالان دو پروتئین مانع از جدا شدن Rrn3 از پلیمراز I خواهد شد که در نتیجه تیمار با راپامایسین اتفاق می‌افتد. سوش CARA[2] (ارتباط ساختاری Rrn3 و A43) حاصل دیده شد که تا حدی به راپامایسین مقاوم است. در غیاب راپامایسین، سوش CARA با همان سرعت مساوی و با تعداد ریبوزوم‌های برابر با سلول‌های گونه وحشی رشد می‌کند.

a. به منظور تجزیه تحلیل رونویسی rRNA توسط پلیمراز I، RNAکل از سلول‌های نوع وحشی (WT) که سریع رشد می‌کردند و سلول‌های CARA در زمان‌های مختلف بعد از افزودن راپامایسین جداسازی شد. غلظت پیش ساز 35S rRNA رونویسی شده توسط پلیمراز I (شکل ۳۵-۸ را ملاحظه کنید) توسط روش بسط پرایمری[3] اندازه‌گیری شد. از این جهت که انتهای ′۵ از پیش ساز 35S rRNA در طی پردازش rRNA ی25S و 18S تجزیه می‌شود، این روش پیش ساز پیش rRNA با عمر نسبتاً کوتاه را اندازه‌گیری می‌کند. این یک اندازه‌گیری غیرمستقیم از سرعت رونویسی rRNA توسط پلیمراز I است. نتایج این اندازه‌گیری بسط پرایمری در زیر نشان داده شده است. چگونه پلیمراز I با Rrn3 الحاقی CARA پاسخ رونویسی پلیمراز I به راپامایسین را تحت تأثیر قرار می‌دهد؟



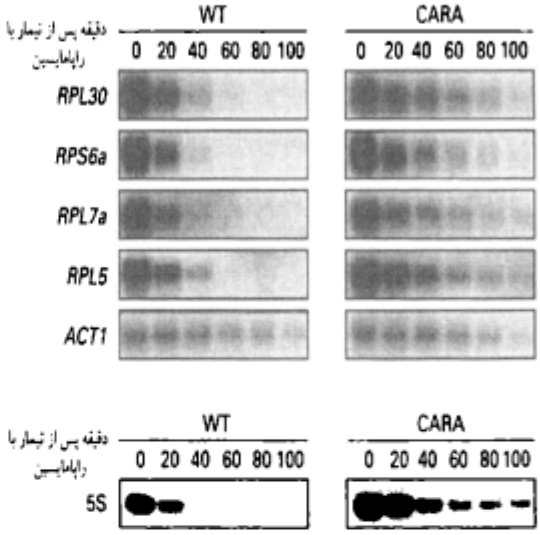
b. غلظت‌هایی از چهار mRNA رمزکننده پروتئین ریبوزومی RPL30 و RPS6a و RPL7a و RPL5 و mRNAی اکتین (ACT1) (پروتئین موجود در سیتواسکلتون) در سلول‌های گونه وحشی و CARA توسط روش نوترن بلاتینگ در زمان‌های مختلف بعد از افزودن راپامایسین به سلول‌های در حال رشد سریع (اتورادیوگرام‌های بالاتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. رونویسی 5SrRNA توسط نشانگذاری پالس سلول‌های WT و CARA سریع رشدکننده با اوراسیل H^3 (برای مدت ۲۰ دقیقه) در زمان‌های مختلف بعد از افزودن راپامایسین به محیط کشت، اندازه‌گیری شد.

1- Laferte

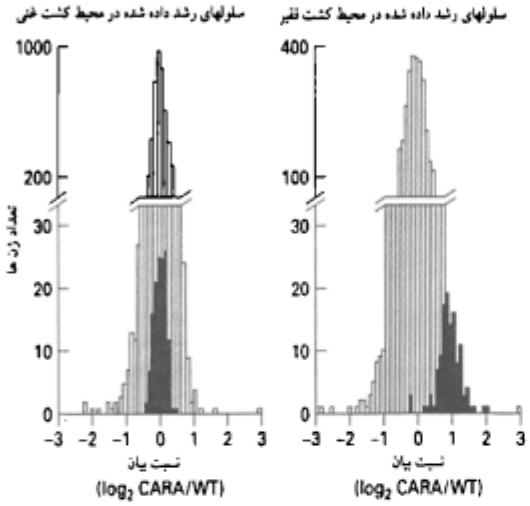
2- Constitutive association of Rrn3 and A43). CARA

3- Primer extension method

RNA کل سلولی جداسازی شد و مورد الکتروفورز ژلی و اتورادیوگرافی قرار گرفت. اتورادیوگرام‌های پایینی نواحی از ژل دارای 5S rRNA را نشان می‌دهند. براساس این داده‌ها، درباره تأثیر رونویسی پلیمراز I بر روی ژن‌های پروتئین ریبوزومی توسط پلیمراز II و 5S rRNA توسط پلیمراز III چه نتیجه‌ای می‌توان گرفت؟



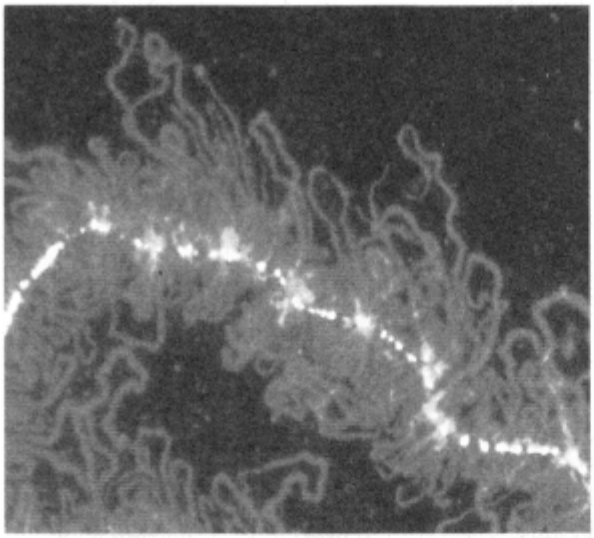
c. به منظور تعیین تفاوت در رفتار سلول‌های گونه وحشی و CARA که می‌توانست در شرایط فیزیولوژیکی عادی مشاهده شود (مانند حالت بدون تیمار با دارو) سلول‌های به لحاظ منابع غذایی‌شان از محیط کشت غنی از مواد غذایی به محیط کشت فقیر از مواد غذایی منتقل شدند. تحت این شرایط، در سلول‌های گونه وحشی،پروتئین کیناز TOR غیرفعال می‌شود. درنتیجه، سلول‌های جابجا شده از محیط کشت غنی از مواد غذایی به محیط کشت فقیر از مواد غذایی بایستی پاسخ فیزیولوژیکی طبیعی راکه همسان با سلول‌های در حال تیمار است را به راپامایسین که TOR را مهار می‌کند، بدهند. برای تعیین اینکه چگونه پروتئین ادغامی CARA پاسخ به این تغییر محیط را تحت تاثیر قرار می‌دهد، RNAی استخراج شده سلول‌های گونه وحشی و سلول‌های CARA تحت آزمایش زیرآرایه برای قالب‌های خواندن باز مخمر قرار گرفتند. مقدار دورگه شدن RNA با آرایه‌ها اندازه‌گیری شده و در نمودارهایی به صورت لگاریتم در پایه دو (Log_2) از نسبت غلظت RNAی سلول CARA به غلظت RNAی سلول گونه وحشی برای قالب خواندن باز، بیان شد. مقدار صفر نشان‌دهنده سوشی از مخمر است که مقدار یکسانی از بیان را برای این RNAی ویژه نشان می‌دهند. مقدار یک نشاندهنده این است که سلول‌های CARA دو برابر RNA ویژه بیشتری نسبت به سلول‌های گونه وحشی هستند. نمودارهای زیر مقدار قالب‌های خواندن باز (محور y) را نشان می‌دهند که مقادیر Log_2 در محور X نشان داده شده است. نتایج دورگه‌سازی قالب‌های خواندن باز که mRNAهای پروتئین‌های ریبوزومی را رمز می‌کنند توسط بارهای سیاه و برای بقیه mRNAها با بارهای سفید نشان داده شده است. نمودار سمت چپ نتایج سلول‌های رشد داده شده در محیط غنی از مواد غذایی و نمودار سمت راست سلول‌های قرار گرفته در محیط عاری از محیط غذایی را به مدت ۹۰ دقیقه نشان می‌دهد. این داده‌ها در مورد تنظیم رونویسی ژن پروتئین ریبوزومی توسط پلیمراز II چه چیزی پیشنهاد می‌کنید؟



فصل

۸

کنترل بیان ژن بعد از رونویسی



(شکل رنگی) قسمتی از کروموزوم لمپ بردش (کروموزوم شیشه شوی) که از اووسیت سمندر "Nophthalmus viridescens" بدست آمده است. پروتئین hnRNP همراه با RNA رونوشت تازه سنتز شده RNA بعد از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی مونوکلنال به رنگ قرمز فلورسانس درآمده است.

رئوس مطالب

۸.۱ پردازش پیش mRNA یوکاریوتی

۸.۲ تنظیم پردازش پیش mRNA

۸.۳ انتقال mRNA از عرض پوشش هسته‌ای

۸.۴ مکانیسم‌های سیتوپلاسمی کنترل بعد از رونویسی

۸.۵ پردازش rRNA و tRNA

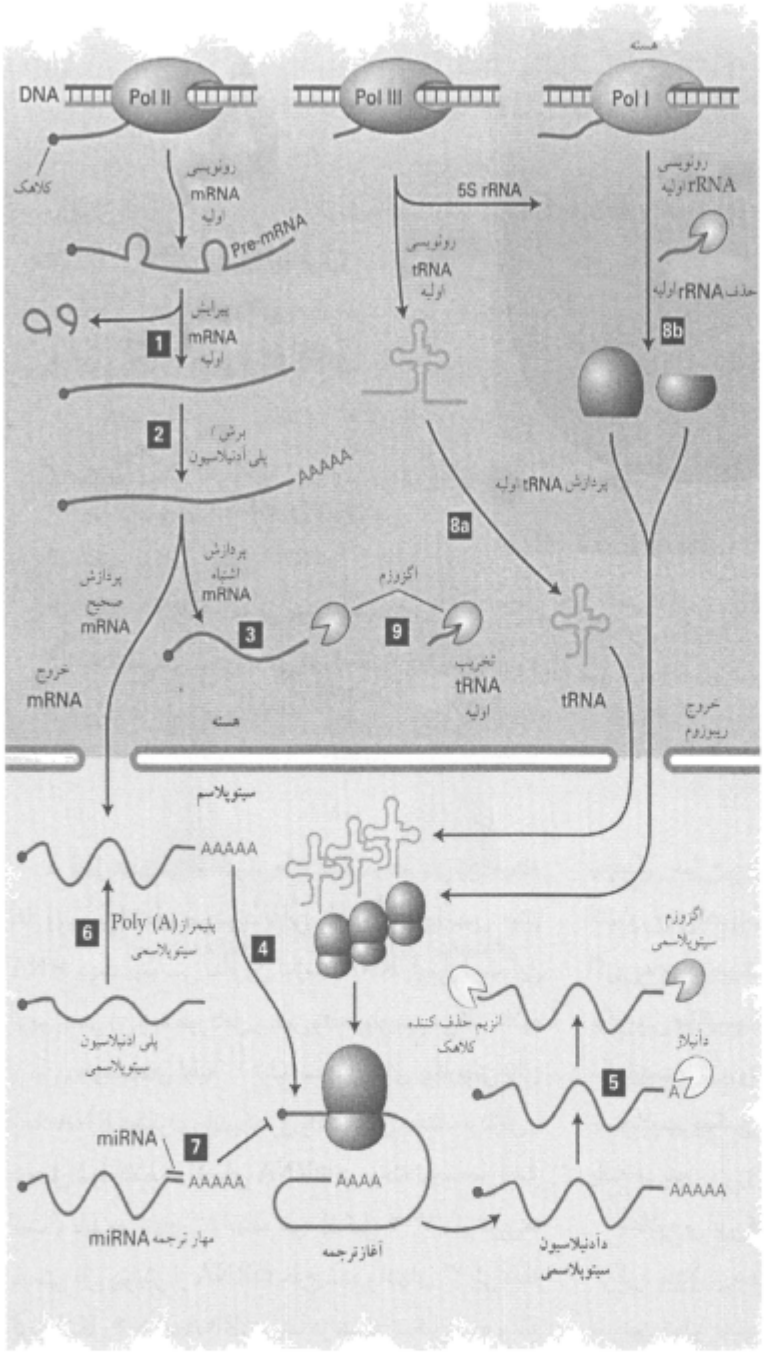
در فصل قبلی دیدیم اکثر ژن‌ها در اولین مرحله بیان ژن (مرحله آغاز رونویسی) تنظیم می‌شوند. با این حال در آغاز رونویسی، سنتز RNA جهت رونویسی تمام ژن نیازمند RNA پلیمراز است. این آنزیم تمامی ژن را به طور کامل و بدون وقفه رونویسی می‌کند. علاوه بر این **رونوشت‌های اولیه**[1] تولید شده، ژن‌های یوکاریوتی برای ایجاد RNA عملکردی باید یکسری واکنش‌های مختلف پردازش را متحمل شود. کلاهک ′۵ برای mRNA در مرحله ترجمه مورد نیاز است و باید به انتهای ′۵ اضافه شود (شکل ۴-۱۴). اینترون‌ها بایستی طی پیرایش از mRNA خارج شده و انتهای ′۳ پلی‌آدنیله گردد (شکل ۴-۱۵). mRNA، ابتدا در هسته تشکیل شده و بالغ می‌شود سپس RNA دارای عملکرد به صورت ریبونوکلئوپروتئین به سیتوپلاسم وارد می‌شود. هر دو فرآیند پردازش RNA ها و خروج RNA ها از هسته فرصت بیشتری را برای تنظیم بیان ژن پس از آغاز رونویسی فراهم می‌کند.

اخیراً اطلاعات فراوان در مورد توالی cDNA انسان، نشان داد ٪۶۰ ژن‌های انسانی به صورت متناوب پیرایش شده و پروتئین‌های رمزدهی شده بوسیلهٔ mRNA های پیرایش یافته، در توالی‌های مربوط به دمین‌های با عملکرد ویژه با هم متفاوت هستند. در بسیاری از موارد، پیرایش متناوب RNA ، باعث ایجاد پروتئین‌های ایزوفرم ویژه در یک نوع سلول خاص می‌شود. بعلت پیچیدگی عمل پیرایش در mRNA اولیه گاهی در عمل پیرایش اشتباه رخ می‌دهد و منجر به ایجاد mRNA پیش‌سازی می‌گردد که اگزون‌های آن بدرستی پیرایش نیافته‌اند. با وجود این در سلول‌های یوکاریوتی **مکانیسم‌های نظارت RNA**[2] ایجاد شده‌اند که این مکانیسم‌ها از ورود RNA های نادرست پردازش شده به سیتوپلاسم جلوگیری کرده و یا باعث تجزیه RNA های انتقال یافته می‌شود.

علاوه بر این، کنترل دیگر از بیان ژن در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد مثلاً در مورد ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین، میزان پروتئین تولید شده بستگی به پایداری mRNA مربوطه در سیتوپلاسم و سرعت ترجمه آنها دارد. در طی پاسخ ایمنی، لنفوسیت‌ها از طریق ترشح هورمون‌های پلی‌پپتیدی بنام سیتوکین‌ها با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند. سیتوکین‌ها از طریق گیرنده‌های سیتوکینی عبورکننده از غشای پلاسمایی پیام را به سلول‌های لنفوسیتی مجاور انتقال می‌دهند (فصل ۲۴). توقف سریع سنتز و ترشح سیتوکین‌ها در لنفوسیت‌ها اهمیت دارد. این عمل به علت ناپایداری mRNA های سیتوکینی و در نتیجه

1- Primary transcripts

2- RNA surveillance mechanisms



◀ **شکل ۱-۸ مروری بر پردازش RNA و کنترل ژن پس از رونویسی:** تقریباً پردازش همه RNAهای سیتوپلاسمی در هسته قبل از ورود آنها به سیتوپلاسم از رونوشت اولیه انجام می‌گیرد. در ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند کنترل ژن می‌تواند از طریق انتخاب اگزون‌های متفاوت در طی پیرایش mRNA اولیه ❷ انتخاب جایگاه‌های پلی (A)متناوب صورت گیرد. از ورود mRNAهایی که اشتباهاً پردازش یافته‌اند به سیتوپلاسم ممانعت به عمل می‌آید. ❸ این mRNA بوسیلهٔ کمپلکس بزرگی بنام اگزوزوم که شامل ریبونوکلئازهای متعددی است تجزیه می‌شوند. بعد از ورود به سیتوپلاسم ❹ فاکتورهای آغاز ترجمه به کلاهک انتهای ′۵ به صورت مشترک همراه با پروتئین‌های متصل شونده به پلی A ، به دم پلی A اتصال یافته و ترجمه را آغاز می‌کنند (شکل ۲۸-۴) ❺- mRNA در سیتوپلاسم طی دآدنیلاسیون و حذف کلاهک تجزیه می‌شوند. تجزیه شدن mRNA توسط اگزوزوم سیتوپلاسمی ادامه می‌یابد. سرعت تجزیه هر mRNA کنترل شده است. بنابراین غلظت mRNA و در نتیجه میزان پروتئین ترجمه شده تحت تنظیم است. بعضی از mRNAها بدون دم پلی A سنتز می‌شوند، ترجمه این mRNAها توسط کنترل سنتز دم پلی A به وسیله پلی A پلیمراز سیتوپلاسمی تنظیم می‌شود ❼ ترجمه همچنین توسط مکانیسم‌های دیگری مثل miRNA انجام می‌گیرد. این RNAهای ۲۲ نوکلئوتیدی هنگامی که بیان می‌شوند، ترجمه mRNAهای هیبرید شده با آنها راعموماً در ناحیه غیر قابل ترجمه ′۳ مهار می‌کنند. tRNAها و rRNAها نیز بصورت RNA پیش‌ساز تولید شده و بایستی ❽ قبل از اینکه عملکرد ویژه خود را پیدا کنند پردازش یابند. نواحی که از پیش‌سازهای RNAهای بریده می‌شوند، توسط اگزوزوم‌های هسته‌ای تجزیه می‌شوند ❾

کاهش غلظت mRNA موجود در سیتوپلاسم پس از توقف اولین سنتز آنها سریعاً امکان‌پذیر است. در مقایسه با این پروتئین‌ها mRNAهای رمزدهی کننده پروتئین‌های مورد نیاز در مقدار زیاد که بایستی مدّت طولانی عمل نمایند مانند پروتئین‌های ریبوزومی، به شدت پایدارند به طوری که چندین پلی‌پپتید از هر mRNA رونویسی می‌شود.

علاوه بر تنظیم پردازش mRNA اولیه، خروج از هسته ترجمه mRNA، موقعیت قرارگیری بعضی از mRNAها در سلول نیز تنظیم می‌شوند تا پروتئین‌های تازه سنتز شده در محل مورد نیاز به آنها قرار گیرند.

مثال جالب در این مورد سیستم‌های عصبی جانوران چندسلولی است. بعضی از نورون‌های مغز انسان با بیش از - ۱۰۰۰ سیناپس

مجزا، با نورون‌های دیگر ارتباط برقرار می‌کنند. طی فرآیند یادگیری، سیناپس‌های درگیر طولشان افزایش می‌یابد ولی سایر سیناپس‌های سنتز شده توسط این نورون طویل نمی‌شوند. این امر، بدلیل وجود mRNA هایی است که پروتئین‌های ضروری برای تشکیل سیناپس با اندازه طولانی را رمزدهی می‌کنند. این mRNA ها در همه سیناپس‌ها ذخیره می‌شوند. وقتی ترجمه این mRNAها انجام می‌شود، mRNA های ذخیره شده در هر سیناپس به طور مستقل با توجه به فراوانی شروع ترجمه تنظیم می‌شوند. بدین طریق سنتز پروتئین‌های موجود در هر سیناپس از سیناپس‌های بی‌شماری که توسط یک نورون ساخته می‌شود، مستقل از هریک از سیناپس‌های ساخته شده بوسیله آن نورون باشد.

نوع دیگری از تنظیم ژن که اخیراً مطرح شده است مربوط به میکرو RNA ها (mi RNAs) است. miRNA ها پایداری و ترجمه RNAهای ویژه‌ای را در جانوران و گیاهان چندسلولی تنظیم می‌کنند. بررسی این RNA های کوچک در بافت‌های مختلف انسانی نشان داد تقریباً ۱۰۰۰ miRNA در انواع متعددی از سلول‌های انسانی بیان می‌شوند. با اینکه اخیراً دیده شده، بعضی از آن‌ها عمل خود را از طریق مهار بیان ژن هدف در بافت و زمان خاص و در طول رشد انجام می‌دهند اما عمل بسیاری از miRNA های انسان هنوز ناشناخته است، بنابراین باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود. اگر اکثر miRNA ها واقعاً دارای عمل مشخص باشند در اینصورت ژن‌های miRNA قسمت قابل توجهی از ۲۵۰۰۰ ژن انسانی را بخود اختصاص می‌دهند. یک فرآیند بسیار مرتبط به این عمل miRNA، عمل RNA **مداخله‌گر** [1] (RNAi) است که باعث تجزیه RNA های ویروسی در سلول‌های آلوده و RNA های رمزدهی‌کننده توسط ترانسپوزون‌ها در سلول‌های یوکاریوتی می‌شود. این یکی از جالب‌ترین تحقیقات زیست‌شناسی است چون می‌توان RNA **های کوچک مداخله‌گر**[2] (Si RNA) طراحی کرد تا عملاً ترجمه mRNA خاصی را بطور عملی مهار کند. این فرآیند را خاموش کردن RNA[3] می‌نامند. بنابراین بوسیله siRNA ها می‌توان عملکرد ژن مورد نظر را حتی در موجوداتی که امکان جداسازی جهش‌یافته‌ها با روش‌های قدیمی ژنتیکی در آنها وجود ندارد را مهار نمود.

به همه مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی بعنوان **کنترل ژنی پس از رونویسی** می‌پردازیم (شکل ۱-۸) از آنجایی که پایداری و سرعت ترجمه یک mRNA مقدار پروتئین بیان شده از یک ژن را مشخص می‌کند بنابراین فرآیندهای پس از رونویسی بخش مهمی از **کنترل ژن** هستند. در واقع، مقدار پروتئین تولید شده بوسیله یک ژن در طول عمر mRNA یعنی از آغاز سنتز تا تجزیه شدن mRNA، تنظیم می‌شود. بنابراین فرآیندهای تنظیمی ژنتیکی بر روی RNA و DNA عمل می‌کنند. در این فصل، به همه رخدادهایی که در پردازش RNA بدنبال آغاز رونویسی و انواع مکانیسم‌های تنظیمی شناخته شده جهت تنظیم این رخدادها می‌پردازیم. در قسمت‌های بعدی مختصراً به پردازش رونوشت‌های اولیه تولید شده از ژن‌های rRNA و tRNA خواهیم پرداخت.

۸-۱ پردازش mRNA اولیه یوکاریوتی

در این بخش با دقت بیشتری به نحوه تبدیل رونوشت اولیه سنتز شده توسط RNA پلیمراز II به mRNA عملکردی در سلول‌های یوکاریوتی خواهیم پرداخت. در طی عمل‌پردازش سه پدیده روی می‌دهد: اضافه شدن کلاهک به انتهای ′۵؛ برش و پلی آدنیلاسیون انتهای ′۳، و پیرایش RNA. (شکل ۲-۸). افزایش این تغییرات ویژه به انتهای ′۳ و ′۵ mRNA اولیه اهمیت داشته و موجب حفاظت RNA در برابر آنزیم‌های تجزیه‌کننده می‌شوند. این آنزیمها RNA های بدون کلاهک حاصل از پردازش، اینترون‌های خارج شده و نیز RNA های رونویسی شده از فرو دست جایگاه پلی‌آدنیلاسیون راتجزیه می‌کنند. کلاهک ′۵ و دم پلی A ناحیه ′۳ مولکول mRNA اولیه را از سایر انواع RNA های موجود در هسته متمایز می‌کند. مولکول‌های mRNA اولیه به پروتئین‌های هسته‌ای متصل شده و به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند. پس از ورود mRNA ها به سیتوپلاسم، یکسری مولکول‌های پروتئینی دیگر به آنها متصل می‌شوند. این پروتئین باعث تحریک ترجمه شده و در پایداری mRNA در سیتوپلاسم ضروری هستند. علاوه بر این، اینترون‌ها بایستی حذف شوند تا ناحیه رمزدهی‌کننده صحیح در mRNA ایجاد شود. در یوکاریوت‌های پیشرفته، پیرایش متناوب به صورت پیچیده‌ای تنظیم می‌شود تا انواع مختلف دمین‌های عملکردی را در پروتئین‌ها ایجاد کرده و در نتیجه باعث گستردگی پروتئوم این موجودات می‌شود.

پدیده‌های پردازش mRNA اولیه شامل افزایش کلاهک، پیرایش و پلی آدنیلاسیون در هسته (محلی که mRNA پیش‌ساز

1- RNA Interference 2- Short interfering RNA
3- RNA knockdown

رونویسی می‌شود) رخ می‌دهد. بنابراین پردازش mRNA اولیه همزمان با رونویسی است. به محض جداشدن RNA از سطح RNA پلیمراز II انتهای ′۵ آن سریعاً با افزایش ساختار کلاهک ′۵ تغییر می‌یابد. این ساختار در همه mRNA ها یافت می‌شود. هنگامیکه mRNA اولیه تازه سنتز شده از سطح آنزیم جدا شد، بلافاصله توسط مجموعه کمپلکس پروتئین‌های متصل شونده به RNA پوشیده می‌شود. این کمپلکس پروتئینی به پیرایش RNA و خروج RNA کاملاً پردازش شده به سیتوپلاسم از طریق منافذ هسته‌ای کمک می‌کند. بعضی از این پروتئین‌ها متصل به mRNA در سیتوپلاسم باقی می‌مانند اما اکثر این پروتئین‌ها در هسته باقی مانده و یا به محض انتقال mRNA به سیتوپلاسم، مجدداً به هسته برمی‌گردند. پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل‌شونده به mRNA جایگزین پروتئین‌های هسته‌ای می‌شوند بنابراین mRNA ها هرگز به صورت مولکول آزاد در سلول یافت نمی‌شوند و همچون **کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین**[1] (RNP) همیشه متصل به پروتئین‌ها هستند. در ابتدا mRNP اولیه دارای کلاهک شده و در حین رونویسی، پیرایش شده و پس از برش و پلی‌آدنیله شدن mRNP های هسته‌ای نامیده می‌شود. سپس بدنبال تعویض پروتئین‌های همراهی‌کننده در انتقال به سیتوپلاسم mRNP های سیتوپلاسمی نامیده می‌شوند. گر چه غالباً mRNP ها را mRNA و mRNA اولیه را در نظر می‌گیریم ولی باید یادآور شویم آنها همیشه همراه با پروتئین‌ها و به صورت کمپلکس‌های RNP می‌باشند.

کلاهک ′۵ در مدت کوتاهی پس از آغاز رونویسی به RNA های نوظهور اضافه می‌شود

به محض اینکه رونوشت نوظهور RNA از کانال آنزیم RNA پلیمراز II جداشده و طول آن به حدود ۲۵ نوکلئوتید رسید، کلاهک حفاظتی شامل ۷- متیل گوانوزین و ریبوزهای متیله شده به انتهای ′۵ mRNA های یوکاریوتی افزوده می‌شود. (شکل ۴-۱۴). کلاهک ′۵، مولکول RNA را به صورت پیش‌سازهای mRNA مشخص کرده و باعث حفاظت RNA در برابر آنزیم‌های تجزیه‌کننده RNA در هسته و سیتوپلاسم می‌شود (′۵ - اگزوریبونوکلئاز). این مرحله آغازین در پردازش RNA توسط یک آنزیم مسئول کلاهک‌گذاری انجام می‌شود. این آنزیم به انتهایی کربوکسیل آنزیم RNA پلیمراز II متصل است. ناحیه CTD طی آغاز رونویسی توسط فاکتور رونویسی عمومی TFIIH فسفریله می‌شود. (شکل ۳۱-۷). اتصال به CTD فعالیت آنزیم مسئول کلاهک‌گذاری را تحریک می‌کند، این آنزیم عمل خود را در RNA های دارای انتهای ′۵-تری فسفات خارج شده از RNA پلیمراز II انجام می‌دهد و بر روی RNA های تولید شده از RNA پلیمراز I و III که فاقد دمین CTD هستند اثری ندارد. این موضوع بسیار اهمیت دارد زیرا که سنتز mRNA اولیه کمتر از ۱۰ درصد کل RNA سنتزشده در سلول‌های در حال همانندسازی را تشکیل می‌دهد. تقریباً ۸۰ درصد از کل RNA سنتزشده، RNA ریبوزومی اولیه است که توسط RNA پلیمراز I رونویسی می‌شود و رونویسی حدود ۱۵ درصد RNA ها توسط RNA پلیمراز III انجام می‌گیرد و که شامل 5srRNA، tRNA و سایر RNA های کوچک پایدار است. (۱) اتصال آنزیم مسئول تشکیل کلاهک به صورت اختصاصی به ناحیه منحصر بفرد CTD فسفریله آنزیم RNA پلیمراز II، (۲) فعال شدن آنزیم مسئول تشکیل‌کلاهک از طریق اتصال به CTD فسفریله دو مکانیسمی هستند که منجر به ایجاد کلاهک ویژه تنها در بخش کوچکی از RNA های رونویسی شده توسط RNA پلیمراز II می‌گردند.

یک زیرواحد از آنزیم که مسئول کلاهک‌گذاری است، γ- فسفات را از انتهای ′۵ RNA تازه سنتزشده حذف می‌کند (شکل ۸). دُمین دیگر این زیرواحد بخش GMP از مولکول GTP را به ′۵ دی فسفات ایجاد شده در رونوشت اولیه منتقل می‌کند و یک ساختار غیرعادی گوانوزین ′۵-′۵ تری فسفات را ایجاد می‌کند. در مرحله آخر آنزیم دیگری گروه متیل را از آدنوزیل متیونین به موقعیت N_7 گوانین و اکسیژن ′۲ ریبوز در انتهای ′۵ RNA نوظهور منتقل می‌کند.

دلایل قابل توجهی نشان می‌دهد کلاهک‌گذاری رونوشت اولیه همراه با طویل شدن RNA رونویسی‌شده توسط RNA پلیمراز II صورت می‌گیرد به طوریکه همه رونوشت‌ها در اولین مرحله طویل شدن، دارای کلاهک می‌شوند. در یک مدل، مثلاً پرموتر HIV LTR طی مرحله آغاز رونویسی، آنزیم پلیمراز ۱۵ رونوشت تازه سنتزشده را با سرعت بسیار کمی طویل می‌کند. این به علت عملکرد فاکتور طویل کننده NELF (**فاکتور ادامه‌دهنده منفی**[2]) و Spt 4.5 است. (شکل ۵۱-۷). بعد از کلاهک‌دار شدن انتهای ′۵ RNA نوظهور فسفریلاسیون قسمت CTD آنزیم RNA پلیمراز و Spt5 توسط سیکلین وابسته به پروتئین T-Cdk9 تحریک شده و باعث

1- Ribonucleoprotein (RNP) Complexes

2- Negative elongation factor

آزادشدن فاکتور NELF می‌شود. همین امر موجب می‌شود RNA پلیمراز II با سرعت بیشتری مرحله طویل شدن را پیش برده و سریعاً توالی دور از پروموتر را رونویسی کند. این مکانیسم باعث می‌شود پلیمراز منتظر می‌ماند تا RNA نوظهور دارای کلاهک شده سپس مرحله طویل شدن را با سرعت بالا انجام دهد. ویروس HIV با استفاده از این مکانیسم و مکانیسم دیگری از کنترل رونویسی و از طریق پروتئین Tat و عامل TAR رونویسی را کنترل می‌کند. پروتئین Tat و عامل TAR برای آوردن سیکلین وابسته به کیناز T-Cdk9 به کمپلکس ادامه رونویسی در پروموتور LTR ویروس HIV ضروری هستند (شکل ۵۱-۷). در حال حاضر تفاوت بین رونویسی از پروموتر LTR ویروس HIV با سایر پروموترها که نیازی به پروتئین Tat برای آوردن سیکلین وابسته به کیناز T-Cdk9 ندارند، به درستی مشخص نیست.

مجموعه متنوعی از پروتئین‌ها با دُمین حفاظت شده اتصال به RNA با mRNA های اولیه مجتمع می‌شوند

همانطور که قبلاً گفته شد رونوشت RNA اولیه حاصل از ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین‌ها و mRNA های حدواسط در حال پردازش که مجموعاً mRNA **اولیه**[1] نامیده می‌شوند، در هسته سلول‌های یوکاریوتی به صورت مولکول‌های آزاد RNA یافت نمی‌شوند. از زمان جداشدن رونوشت اولیه از RNA پلیمراز II تا هنگام انتقال mRNA های بالغ به درون سیتوپلاسم، مولکول‌های RNA همراه بامجموعه کثیری از پروتئین‌های هسته‌ای هستند. ترکیب اصلی این پروتئین‌ها، **اجزای ریبونوکلئوپروتئین ناهمگن**[2] (hnRNPs) بوده و شامل RNA **ناهمگن هسته‌ای**[3] (hnRNA) نیز می‌باشد. hnRNA به mRNA اولیه و سایر RNA های هسته‌ای در اندازه‌های مختلف اطلاق می‌شود. پروتئین‌های hnRNP در مراحل بعدی پردازش RNA مثل پیرایش و پلی‌آدنیلاسیون و خروج از کمپلکس منافذ هسته‌ای به سیتوپلاسم، شرکت می‌کنند.

محققین پروتئین‌های hnRNP را برای اوّلین بار بعد از قرار دادن سلول‌های کشت در معرض تابش UV با دوز بالا شناسایی کردند. تابش UV باعث تشکیل پیوندهای عرضی کووالان بین بازهای RNA و پروتئین‌های متصل به آن می‌گردد. باکروماتوگرافی عصاره هسته حاصل از سلول‌های تیمارشده بر روی ستون سلولز الیگوداکسی تیمین (به RNA های دارای دم پلی A متصل می‌شود) پروتئین‌های متصل به RNA های آدنیله شناسایی شدند. تیمار بعدی عصاره‌های سلولی حاصل از سلول‌های اشعه ندیده با آنتی بادی مونوکلنال اختصاصی بر ضد بیشتر پروتئین‌هایی شناسایی شده با تکنیک تشکیل پیوند عرضی، مجموعه پیچیده‌ای از پروتئین‌های متعدد hnRNP دارای محدوده وزنی ۳۰-۱۲۰kD را شناسایی کرد.

اکثر پروتئین‌های hnRNP مانند فاکتورهای رونویسی، دارای واحدهای مستقل ساختاری هستند. این پروتئین‌ها دارای یک یا چند دُمین متصل شونده به RNA بوده و حداقل یکی از دُمین‌ها با سایر پروتئین‌ها میانکنش می‌دهد. چندین موتیف مختلف متصل شونده به RNA از طریق ایجاد حذف‌هایی در پروتئین‌های hnRNP و بررسی توانایی آنها در اتصال به RNA، شناسایی شده‌اند.

عملکردهای پروتئین‌های hnRNP

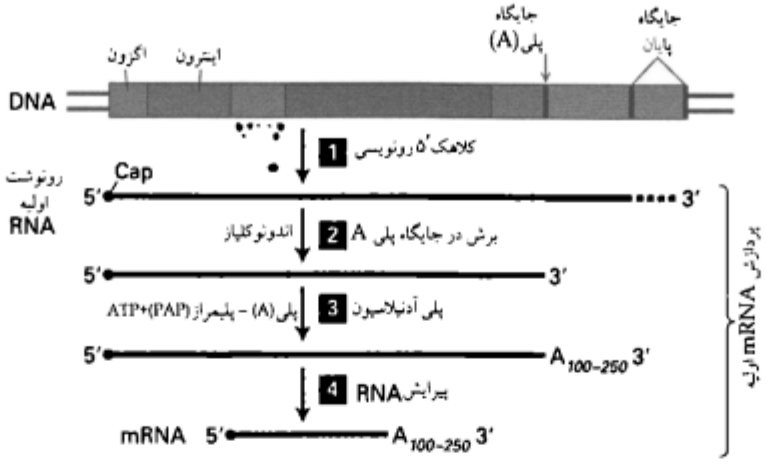
همراهی mRNA های اولیه با پروتئین‌های hnRNP، از ایجاد ساختارهای دوم در اثر جفت شدن بازهای مکمل جلوگیری کرده و در نتیجه RNA های اولیه برای میانکنش با سایر مولکول‌های RNA و پروتئین‌ها در دسترس قرار می‌گیرند. mRNA های اولیه متصل به پروتئین‌های hnRNP از لحاظ ساختاری سوبستراهای مناسبتری نسبت به RNA های اولیه آزاد که به‌پروتئین‌ها متصل نیستند، برای مراحل بعدی پردازش بوده و به علت وجود توالی‌های ویژه بازی و mRNA، ساختارهای ثانویه تشکیل می‌دهند.

مطالعات اتصال پروتئین‌های hnRNP خالص شده نشان می‌دهد انواع مختلفی از پروتئین‌های hnRNP به نواحی مختلف از مولکول‌های mRNA اولیه تازه سنتز شده متصل می‌شوند. مثلاً پروتئین‌های hnRNP، D و C و A_1 ترجیحاً در توالی غنی از پیریمیدین در انتهای اینترون‌ها قرار می‌گیرند (شکل ۷-۸). بعضی از پروتئین‌های hnRNP به توالی‌های RNA که ویژه پیرایش RNA یا برش. پلی‌آدنیلاسیون هستند متصل شده و ساختارهایی تشکیل می‌دهند که توسط فاکتورهای پردازش‌کننده RNA شناسایی می‌شوند. در نهایت آزمایشات استخراج سلولی نشان داد،

1- Pre - mRNA

2- Heterogeneous ribonucleoprotein particles

3- Heterogeneous nuclear RNA



▲ **شکل ۲-۸: مروری بر پردازش mRNA در یوکاریوت‌ها.** در مدت زمان کوتاهی پس از آغاز رونویسی از اولین نوکلئوتید اگزون شماره یک ژن توسط RNA پلیمراز II، انتهای ′۵ RNA تازه سنتز شده به وسیلهٔ ۷- متیل گوانیلات کلاهک‌دار می‌شود. (مرحله ❶) رونویسی توسط RNA پلیمراز II در یکی از چند جایگاه پایان موجود در فرو دست جایگاه پلی A که در ناحیه ′۳ آخرین اگزون قرار گرفته است خاتمه می‌یابد. سپس رونوشت اولیه از جایگاه پلی A بریده می‌شود (مرحله ❷) یک رشته از واحدهای آدنوزینی اضافه می‌شود (مرحله ❸) دم پلی A در پستانداران دارای تقریباً ۲۵۰ در حشرات ۱۵۰ و در مخمر ۱۰۰ واحد آدنینی است. در رونوشت‌های کوتاه اولیه با تعداد اینترون کم (مرحله ❹) معمولاً پیرایش بدنبال برش و پلی‌آدنیلاسیون انجام می‌گیرد. در ژن‌های بزرگ با اینترون‌های متعدد، اینترون‌ها اغلب قبل از کامل شدن رونویسی ژن طی رونویسی از رونوشت اولیه حذف می‌شوند. لازم به ذکر است کلاهک ′۵ و توالی نزدیک به دم پلی A در mRNA های بالغ حفظ می‌شود.

بعضی از پروتئین‌های hnRNP در هسته باقی می‌مانند در حالیکه تعدادی دیگر در درون و بیرون سیتوپلاسم درحال گردشند که بیان کننده انتقال mRNA بوسیلهٔ این پروتئین‌ها است. (شکل ۴-۸)

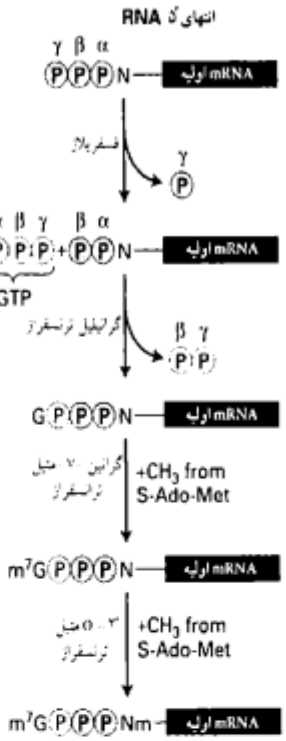
موتیف‌های حفاظت شده اتصال به RNA

موتیف شناسایی RNA[1] (R R M) که موتیف RNP و **دمین متصل شونده به RNA**[2] نیز نامیده می‌شود متداولترین دمین متصل‌شونده به RNA در پروتئین‌های hnRNP است. این موتیف ۸۰ اسیدآمینه‌ای در بسیاری از پروتئین‌های متصل شونده به RNA نیز وجود داشته و شامل دو توالی به شدت حفاظت‌شده RNP1 و RNP2 است که در بین موجودات زنده از مخمر گرفته تا انسان یافت می‌شود. وجود این توالی نشان می‌دهد، مانند بسیاری از دمین‌های متصل‌شونده به DNA، دمین متصل شونده به RNA نیز در ابتدای تکامل یوکاریوت‌ها، ایجاد شده‌اند. آنالیز ساختاری RRM نشان داد این دمین‌ها، شامل صفحات ۴ رشته‌ای و مارپیچ در یک جهت می‌باشند. صفحات β به منظور واکنش با بار منفی فسفات RNA، سطحی با بار مثبت را تشکیل می‌دهند. توالی‌های حفاظت شده RNP1 و RNP2 در کنار هم روی دو زنجیره مرکزی β قرار گرفته و زنجیره‌های جانبی آنها با ناحیه تک‌رشته‌ای RNA در سطح صفحه B پیوندهای متعددی تشکیل می‌دهند (شکل ۵-۸).

موتیف KH با ۴۵ اسیدآمینه در پروتئین hnRNPK و چندین پروتئین متصل شونده به RNA یافت شده است. ساختار سه‌بعدی دُمین‌های KH مشابه به دمین RRM بوده اما نسبت به آن کوچک‌تر است. دمین‌های KH از صفحه β سه رشته‌ای تشکیل شده و یک آنها دو مارپیچ α قرار می‌گیرد. علاوه بر این، دُمین KH به نحو متفاوتی از RRM با RNA میانکنش می‌دهد. دمین KH از طریق میانکنش با سطح آبگریز حاصل از مارپیچ‌های α و یک رشته β به RNA متصل می‌شود. پروتئین‌های hnRNP دارای موتیف دیگری به نام جعبه RGG هستند. این موتیف به RNA متصل شده و شامل ۵ تکرار از Arg-Gly-Gly (R G G) و چند اسید آمینه اروماتیک پراکنده است. با اینکه ساختار این موتیف تا بحال شناسایی نشده است ولی به دلیل طبیعت غنی از آرژنین آن به دمین‌های اتصال به RNA، در پروتئین Tat ویروس HIV شباهت دارد. در یک پروتئین متصل‌شونده به RNA دمین‌های KH و تکرارهای RGG اغلب به صورت دو یا چند مجموعه پراکنده شده‌اند.

1- RNA recognition motif

2- RNA - binding domain



▲ **شکل ۳-۸ (شکل رنگی): سنتز کلاهک انتهای ′۵ در mRNA های یوکاریوتی.** انتهای ′۵ RNA نوظهور دارای یک ′۵ تری فسفات از NTP آغازی است. در اولین مرحله کلاهک‌گذاری فسفات γ حذف شده و فسفات α و β باقی می‌مانند (نارنجی) فسفات سوم پیوند ۵ - ′۵تری فسفات از فسفات GTP دهنده گوانین حاصل می‌شود، s - آدنوزیل متیونین دهنده گروه متیل برای متیلاسیون گوانین کلاهک و ریبوزهای اول و دوم mRNA است.

پیرایش در توالی‌های کوتاه و حفاظت شده mRNA اولیه بوسیله دو واکنش ترانس استریفیکاسیون انجام می‌شود

طی تشکیل mRNA بالغ و دارای عملکرد، اینترون‌ها جداشده و اگزون‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند. در واحدهای کوچک رونویسی، پیرایش RNA معمولاً به دنبال برش و پلی آدنیلاسیون انتهای ′۳ رونوشت اولیه صورت می‌گیرد. (شکل ۲-۸). با وجود این، در واحدهای رونویسی بزرگ با چندین اگزون، پیرایش اگزون‌ها در RNA تازه سنتز شده قبل از اتمام رونویسی ژن شروع می‌شود.

شواهد اولیه برای جدا شدن اینترون‌ها طی پیرایش توسط میکروسکوپ الکترونی و از هیبرید RNA-DNA بین DNA آدنوویروس و mRNA رمزدهی‌کننده هگزون (پروتئین اصلی کسپید ویروسی) بدست آمده است (شکل ۶-۸). مطالعات دیگر نشان داد RNA های ویروسی هسته با DNA ویروسی (رونوشت اولیه) خطی شده و RNA ها دارای یک یا دو اینترون (حدواسطهای پردازش) حذف می‌شوند. این نتایج با یافته‌هایی که حاکی از این است که کلاهک ′۵ و دم پلی (A) ′۳، موجود در انتهاهای پیش‌سازهای mRNA های طویل در mRNA های بالغ و کوتاهتر سیتوپلاسمی باقی می‌مانند، منجر به درک این مطلب شد که اینترون‌ها از رونوشت اولیه و همزمان با به هم پیوستن اگزون‌ها، حذف می‌شوند.

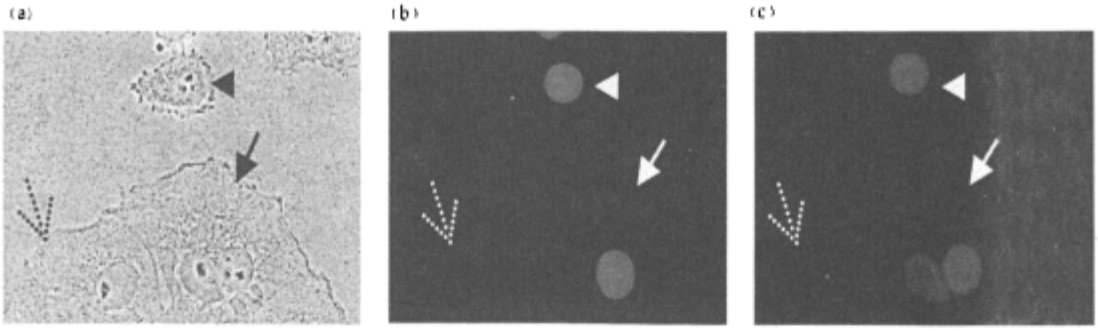
از طریق مقایسه توالی DNA ژنومی با cDNA تهیه شده از mRNA می‌توان به محل اتصال اگزون - اینترون (جایگاه پیرایش) را شناسایی کرد (شکل ۱۵-۵). توالی‌هایی که در DNA ژنومی قرار داشته ولی در cDNA وجود ندارند، اینترون‌ها بوده و جایگاه پیرایش[1] را مشخص می‌کنند. آنالیزهای مشابهی در تعداد زیادی از mRNA های اولیه مختلف یوکاریوتی نشان داد جایگاههای پیرایش نسبتاً کوتاه و حفاظت شده هستند و همچنین در کناره‌های اینترون‌ها قرار می‌گیرند. در mRNA اولیه سلول‌های یوکاریوت‌های عالی، در بالا دست جایگاه پیرایش ′۳ ناحیه غنی از پیریمیدین نیز وجود دارد (شکل ۷-۸). با مطالعه بر روی ژن‌های جهش یافته‌ای که قسمتی از اینترون‌هایشان حذف شده است، دیده شد بخش اعظم ناحیه مرکزی اینترون‌ها اثری بر روی پیرایش ندارند. برای انجام پیرایش با سرعت طبیعی عمدتاً ۴۰-۳۰ نوکلئوتید موجود در هر انتهای اینترون ضروری است.

با مطالعه حدواسطهای تشکیل شده طی پیرایش mRNA اولیه در آزمایشگاه، مشخص شد به هم پیوستن اگزون‌ها از طریق دو واکنش پی در پی ترانس استریفیکاسیون انجام می‌شود (شکل ۸-۸). اینترون‌ها به صورت ساختاری **کمندمانند**[2] برداشته می‌شوند. در این ساختار G ′۵ از اینترون به وسیله پیوند غیرمعمول فسفودی استری ′۵ و ′۲ به آدنوزین کنار انتهای ′۳ اینترون متصل می‌شود. این رزیدوی A **نقطه انشعاب**[3] نامیده می‌شود زیرا باعث تشکیل ساختار کمندمانند از رشته RNA می‌شود. در هر واکنش ترانس استریفیکاسیون یک پیوند فسفودی استری با دیگری جابجا می‌شود. از آنجائی که تعداد پیوندهای فسفودی استری در مولکول طی دو واکنش تغییر نمی‌کند، پس نیاز به مصرف انرژی نیست. نتیجه خالص این واکنش ترانس استریفیکاسیون، پیوند یافتن دو اگزون و خروج اینترون بین آنها به صورت یک ساختار کمندمانند است.

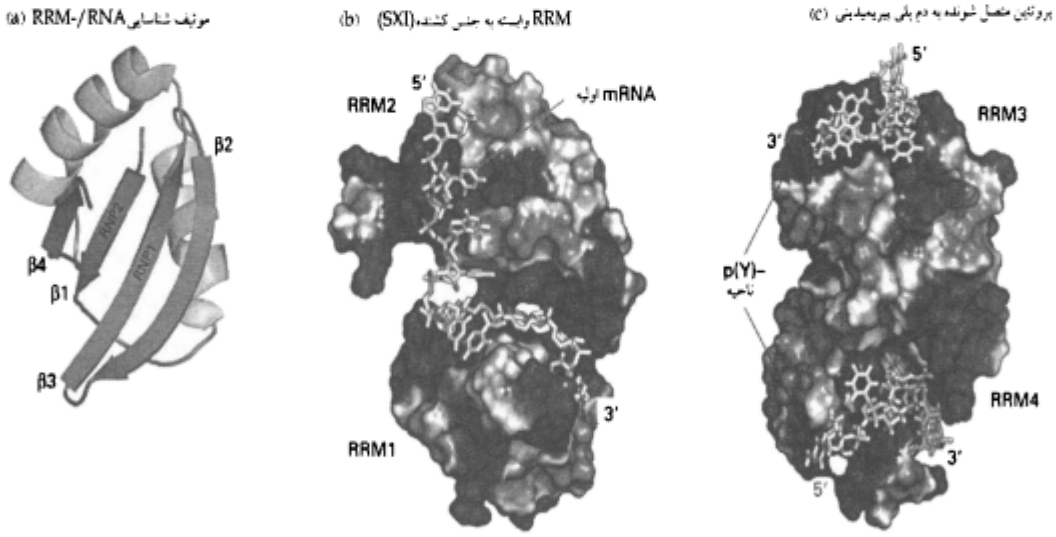
طی پیرایش SnRNA ها با mRNA اولیه جفت می‌شوند

پیرایش نیازمند وجود RNA های کوچک هسته‌ای

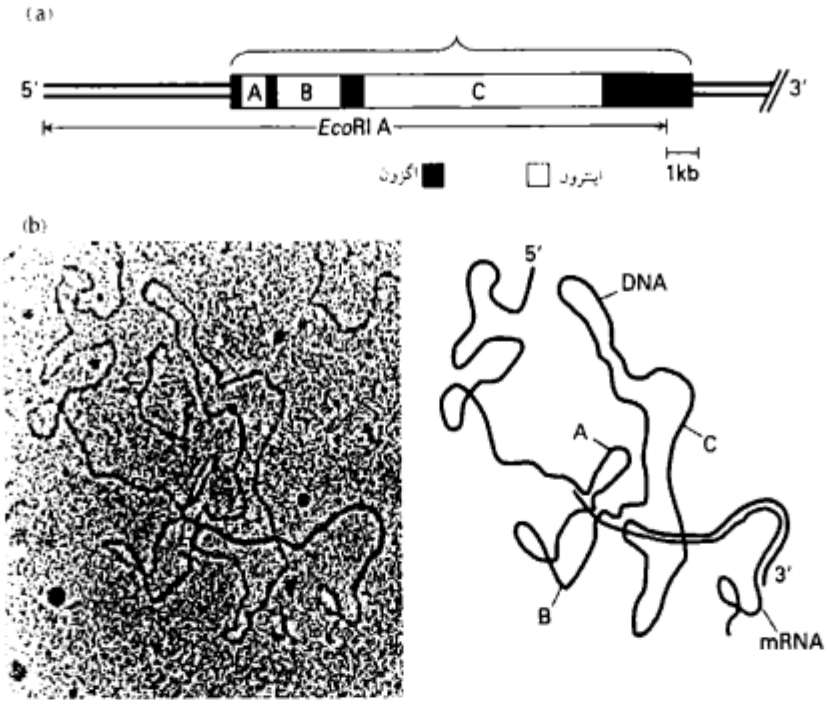
1- Splice site
2- Lariat-like
3- Branchpoint



▲ **شکل ۴-۸ (شکل رنگی): پروتئین hnRNPA6 انسانی برخلاف پروتئین hnRNPC انسانی می‌تواند بین درون و بیرون سیتوپلاسم حرکت کند.** سلول‌های کشت داده شده و هلا و زنوپوس با تیمار پلی‌اتیلن گلیکول به یکدیگر ادغام شده و در نتیجه یک سلول هتروکاریون (ناجور هسته) حاوی هسته هر دو نوع سلول تشکیل شد. سلول‌های هیبریدی به منظور مهارسنتز پروتئین بلافاصله بعد از ادغام با سیکلوهگزیمید تیمار داده شدند. بعد از ۲ ساعت سلول‌ها تثبیت شده و با آنتی بادی نشاندار با مواد فلورسانس ویژه پروتئین‌های hnRNPC انسانی و پروتئین A1 رنگ‌آمیزی شدند. (a) نمونه تثبیت شده از طریق مشاهده با میکروسکوپ اختلاف فاز شامل سلول‌های ادغام نشده هلا(سر پیکان) و زنوپوس (پیکان نقطه چین) و سلول‌های ادغام شده هتروکاریون (پیکان پررنگ) است. در این میکروگراف در هتروکاریون، هسته سلول هلا در سمت راست هسته تخمک زنوپوس قرار دارد. (c و b) هنگامیکه همان نمونه با میکروسکوپ فلورسانت مشاهده شد پروتئین hnRNPC به رنگ سبز و پروتئین hnRNPA6 به رنگ قرمز دیده می‌شوند. توجه کنید سلول زنوپوس ادغام نشده در سمت چپ رنگ نگرفته و این بیانگر آنست که آنتی‌بادی‌ها ویژه پروتئین‌های انسانی هستند. در هتروکاریون، پروتئین hnRNPC فقط در هسته سلول‌های هلا قرار دارد. (b) در حالیکه پروتئین A1 در هر دو هسته قرار دارد. (c) به دلیل اینکه سنتز پروتئین بعد از استخراج سلولی مهار شده ، بعضی از پروتئین‌های انسانی hnRNP1 باید هسته سلول‌های هلا را ترک کرده و از طرف سیتوپلاسم سلولی منتقل شده و وارد هسته‌های زنوپوس در هتروکاریون گردند.



▲ **شکل ۵-۸ (شکل رنگی): ساختار دمین RRM و میانکنش آن با RNA.** (a) شکلی از دمین RRM با ۲ مارپیچ (سبزرنگ) و ۴ رشته β که از ویژگیهای ساختاری این موتیف است. نواحی حفاظت شده RNP1 و RNP2 در مرکز دو رشته β قرار گرفته است. (b) نمایش سطحی دو دمین RRM در پروتئین کشنده وابسته به جنس دروزوفیلا که به توالی ۹ بازی در mRNA اولیه زرد رنگ متصل می‌شود. دو دمین RRM مانند دو قسمت یک جفت قاشقک باز جهت‌گیری می‌کند طوری که صفحات β به سمت بالا و صفحات β در ۲ RRM به سمت پایین قرار می‌گیرند. نواحی با بار مثبت در پروتئین sxl به صورت سایه آبی رنگ و نواحی با بار منفی به صورت سایه قرمز نشان داده شده‌اند. mRNA اولیه به سطح صفحات β با بار مثبت متصل شده و بیشترین تماس را با RNP1 و RNP2 و RRM برقرار می‌کند. (c) جهت‌گیری بسیار متفاوت دُمین‌های RRM در hnRNP مختلف، (پروتئین متصل‌کننده ناحیه پلی‌پیریمیدین (PTB))نشان می‌دهد، RRM ها در موقعیت‌های نسبی متفاوتی در hnRNP های مختلف جهت‌گیری می‌کنند. رنگ‌ها مانند قسمت b است. ناحیهٔ پلی‌پیریمیدین RNA تک‌رشته به سطح بالایی RRM3 و سطح پایینی RRM4 در صفحات β متصل می‌شود. RNA با رنگ زرد نشان داده شده است.



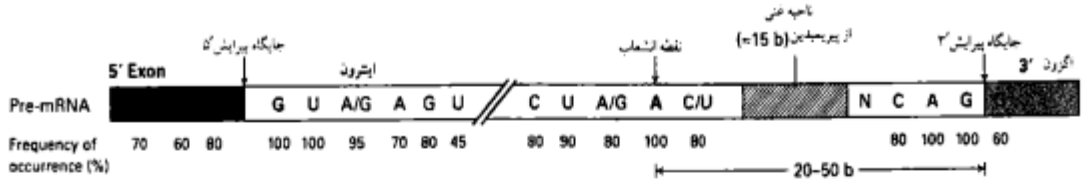
▲ **شکل ۶-۸: گراف میکروسکوپ الکترونی هیبرید DNA الگو-mRNA نشان می‌دهد که اینترون‌ها طی پردازش mRNA اولیه حذف می‌شوند.** (a) نمایش قطعه A از EcoRI مربوط به DNA آدنوویروس که از انتهای سمت چپ ژنوم تا قبل از انتهای آخرین اگزون ژن هگزون امتداد می‌یابد. این ژن دارای سه اگزون کوتاه و یک اگزون بلند (≈۳/۵kb) است. اگزون‌ها به وسیلهٔ سه اینترون تقریباً ۱، ۲/۵ و ۹ کیلو بازی از هم جدا شده‌اند. (b) میکروگراف الکترونی (چپ) و نمایش شماتیک (راست) هیبریدبین قطعه EcoRI و mRNA هگزون. حلقه‌های مشخص شده با A ،B ،C مربوط به اینترون‌های نشان داده شده در شکل (a) می‌باشند. چون توالی اینترون‌ها در DNA ژنومی ویروس در mRMA هگزون بالغ وجود ندارد حلقه‌ها از بین توالی‌های اگزون هیبرید شده با توالی مکملی‌شان در mRNA بیرون می‌افتند.

(sn RNA) (برای جفت شدن با mRNA اولیه ضروری هستند) و پروتئین‌های ضمیمه است. پنج snRNA غنی از U به صورت U_1، U_2، U_4، U_5 و U_6 نمایش داده می‌شوند و در پیرایش mRNA اولیه نقش دارند. این snRNAها از ۱۰۷ تا ۲۱۰ نوکلئوتید طول داشته و به ۱۰-۶ پروتئین متصل بوده و به صورت ذرات ریبونوکلئوپروتئین کوچک هسته‌ای در هسته سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند.

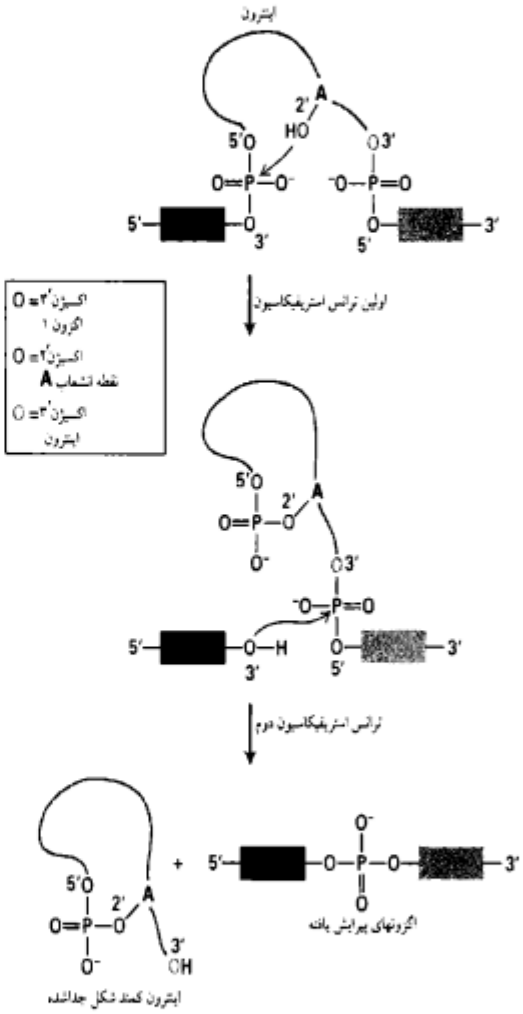
شواهد مشخصی که نقش snRNA را در پیرایش تعیین کرد حاصل از آزمایشاتی بود که نشان می‌داد جفت‌شدن بازها بین جایگاه پیرایش ′۵ از mRNA با ناحیه ′۵ از U_1 snRNA برای پیرایش RNA ضروری است (شکل ۹a-۸). آزمایشات نشان داد الیگونوکلئوتید سنتزی هیبرید شده با انتهای ′۵ U_1 snRNA باعث مهار پیرایش می‌شود. آزمایشات در بدن موجود زنده نشان داد جهش‌هایی که باعث گسیختگی جفت‌شدن بازها در mRNA اولیه می‌شود، پیرایش را مهار می‌کنند. با این حال، پیرایش را می‌توان مجدداً با بیان کردن جهش U_1 snRNA با یک جهش جبرانی (که جفت شدن بازها را در جایگاه mRNA اولیه بازسازی می‌کند.) به حالت اولیه برگرداند. (شکل ۹b-۸)

در مراحل اولیه شناسایی U_2 snRNA در پیرایش، تصور می‌شد این مولکول دارای یک توالی درونی مکمل توالی مورد توافق در طرفین نقطه انشعاب در mRNA اولیه باشد. (شکل ۷-۸). آزمایشات جهش‌های جبرانی، همچون جهش‌های انجام‌شده با U_1 snRNA و جایگاه‌های پیرایش ′۵، نشان داد جفت شدن بازها بین U_2 snRNA و توالی نقطه انشعاب در mRNA اولیه، نیز برای پیرایش ضروری هستند.

شکل ۹a-۸ ساختار عمومی U_2 snRNA و U_1 و چگونگی جفت شدن بازها در mRNA اولیه طی پیرایش را نشان می‌دهد. نقطه انشعاب A به تنهایی با U_2 snRNA جفت نمی‌شود بلکه به صورت یک برجستگی بیرون زده و از طریق ′۲ - هیدروکسیل خود در اولین مرحله از واکنش ترانس استریفیکاسیون پیرایش RNA شرکت می‌کند. مطالعات مشابه، با سایر snRNAها نشان داد آنها نیز طی پیرایش با RNA جفت می‌شوند. علاوه بر این، نوآرایی در



▲ **شکل ۷-۸. توالی مورد توافق اطراف جایگاههای پیرایش در mRNA های اولیه مهره‌داران.** تنها بازهای ثابت اینترون‌ها ۵′GU و ۳′GA هستند گر چه بازهای اطراف آنها در فرکانس بالاتر نسبت به حالت مورد انتظار بر اساس توزیع تصادفی یافت شده‌اند. ناحیه غنی از پیریمیدین (ناحیه هاشور زده) نزدیک انتهای ′۳ اینترون در بیشتر موارد موجود است. آدنوزین نقطه انشعاب نیز ثابت است و معمولاً ۵۰ - ۲۰ باز از محل پیرایش ′۳ فاصله دارد. ناحیه مرکزی اینترون تقریباً ۴۰ تا ۵۰ کیلو باز طول داشته و معمولاً در پدیده پیرایش ضرورتی ندارد.



▲ **شکل ۸-۸: دو واکنش ترانس استریفیکاسیون منجر به پیرایش اگزون‌ها در mRNA اولیه می‌گردد.** طی واکنش اول، پیوند بین فسفر ′۵ اینترون و اکسیژن ′۳ با پیوند استری با اکسیژن ′۲ واحد آدنوزینی محل انشعاب عوض می‌شود. در واکنش دوم پیوند استری بین فسفر ′۵ اگزون ۲ و اکسیژن ′۳ اینترون به وسیله پیوند استری با اکسیژن ′۳ اگزون ۱ عوض شده و اینترون به صورت ساختار کمند مانندی رها شده و دو اگزون بهم می‌پیوندند. پیکانها اکسیژن فعال‌شده هیدروکسیل را نشان می‌دهند که با اتم فسفر واکنش می‌دهند.

میانکنش‌های RNA-RNA در مسیر پیرایش بسیار ضروری هستند.

پیرایش به وسیلهٔ اسپلایسوزوم‌های تشکیل شده از snRNP و mRNA اولیه انجام می‌شود

پنج snRNPs و سایر پروتئین‌ها دخیل در پیرایش روی mRNA اولیه تجمع یافته و کمپلکس بزرگ ریبونوکلئوپروتئینی به نام اسپلایسوزوم[1] را تشکیل می‌دهند. (شکل ۱۱-۸). اسپلایسوزوم یک کمپلکس بزرگ ریبونوکلئوپروتئینی بوده و دارای جرمی مشابه با ریبوزوم است. شکل‌گیری اسپلایسوزوم با جفت‌شدن بازهای U_1 snRNP و U_2 snRNP با mRNA اولیه شروع می‌شود (شکل ۹-۸). جفت شدن بیشتر بازها بین U_4 snRNAs و U_6 snRNP کمپلکسی را تشکیل می‌دهد. این کمپلکس به U_5 snRNP متصل می‌شود. سپس کمپلکس U_5، U_4 و U_6 به کمپلکس mRNA اولیه/U_1/U_2 که قبلاً تشکیل شده بود، متصل شده و یک اسپلایسوزوم را ایجاد می‌کند.

بعد از تشکیل اسپلایسوزوم، نوآرایی بیشتر در جفت شدن snRNA و mRNA اولیه منجر به آزاد شدن U_1 و سپس U_4 snRNP می‌گردد. شکل ۱۰b-۸ ساختار یک حد واسط را در پیرایش فاقد U_1 snRNP نشان می‌دهد که با میکروسکوپ کرایوالکترون گرفته شده است. نوآرایی‌های بعدی اجزای سازنده اسپلایسوزوم موجب از دست دادن U_4 snRNP و در نتیجه تشکیل یک کمپلکس می‌شود. این کمپلکس تشکیل پیوند ′۲ و ′۵ فسفودی‌استر بین ′۲ هیدروکسیل A محل انشعاب و فسفات - ′۵ در انتهای ′۵ اینترون را کاتالیز می‌کند. (شکل ۱۱-۸) به دنبال نوآرایی دیگر snRNP ها، واکنش ترانس استریفیکاسیون دوم، دو اگزون را با

1- Spliceosome

پیوند معمول ′۳ و ′۵ فسفودی‌استر بهم پیوند داده و اینترون متصل شده به snRNPها به صورت ساختار کمندمانند با snRNPها آزاد می‌شود. آخرین کمپلکس اینترون - snRNP سریعاً از هم پاشیده و هر snRNP آزاد شده می‌توانند در چرخهٔ جدید پیرایش شرکت کند.

همانطور که در بالا گفته شده اسپلایسوزوم از لحاظ اندازه تقریباً مشابه ریبوزوم بوده و تقریباً دارای ۱۰۰ پروتئین که در مجموع به عنوان فاکتورهای پیرایش نامیده می‌شوند و ۵ snRNP است. این پیچیدگی در پیرایش RNA با پیچیدگی آغاز رونویسی و سنتز پروتئین قابل مقایسه است. بعضی از فاکتورهای پیرایش همراه با snRNPها هستند اما برخی دیگر اینگونه نمی‌باشند، مثلاً زیرواحد ۶۵ kD از فاکتور متصل به U_2[1] (U_2-AF) به ناحیه غنی از پیریمیدین نزدیک انتهای ′۳ اینترون‌ها و U_2 snRNP متصل می‌شود. زیرواحد ۳۵ کیلودالتونی از U_2 AF به دی نوکلئوتید AG در انتهای ′۳ اینترون متصل شده و همچنین با زیرواحد بزرگتر AF U_1 که در نزدیکی آن واقع شده میانکنش می‌دهد. دو زیرواحد AF U_2 با همدیگر عمل نموده تا به مشخص شدن جایگاه پیرایش ′۳ به وسیله شروع میانکنش U_2 snRNP با نقطه اشعاب کمک کنند. (شکل ۹-۸). بعضی از فاکتورهای پیرایش از لحاظ توالی با RNA هلیکازهای شناخته شده مشابهت دارند. این فاکتورها احتمالاً برای نوآرایی جفت‌شدن باز که طی چرخه پیرایش اسپلایسوزوم در snRNAها روی می‌دهد، ضروری هستند.

به دنبال پیرایش RNA یک مجموعه ویژه از پروتئین‌های hnRNP روی RNA پیرایش یافته در ۲۰ نوکلئوتید در سمت ′۵ هر اتصال اگزون-اگزون متصل باقی مانده و کمپلکس تقاطع اگزون[2] را تشکیل می‌دهند. یکی از پروتئین‌های hnRNP متصل به کمپلکس تقاطع اگزونی، **فاکتور خروج RNA**[3] (REF) بوده و در خارج کردن mRNP کاملاً پیرایش یافته از هسته به سیتوپلاسم عمل می‌کند و در قسمت ۳-۸ توضیح داده می‌شود. سایر پروتئین‌های متصل به کمپلکس تقاطع اگزونی در مکانیسم کنترل کیفی عمل می‌کنند. این مکانیسم کنترل کیفی باعث تجزیه mRNAهایی می‌شوند که بدرستی پیرایش نیافته‌اند و به عنوان nonsense-medicted decay شناخته می‌شوند.

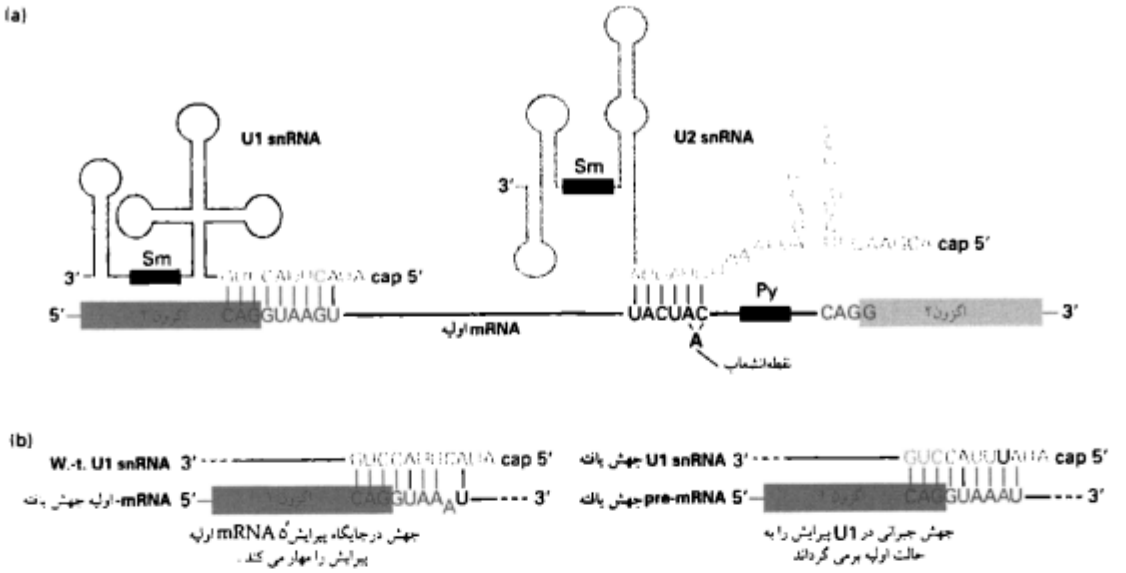
بخش کوچکی از mRNAهای اولیه (تقریباً ۱ درصد در انسان) دارای اینترون‌هایی هستند که جایگاه پیرایش آنها با توالی مورد توافق مطابقت نمی‌کند. این گروه از اینترون‌ها با AU شروع شده و انتهاهای آنها به جای قانون معمول "GU-AG" با AC خاتمه می‌یابد. (شکل ۷-۸) پیرایش این گروه از اینترون‌ها مشابه به چرخه پیرایش نشان داده شده در شکل ۱۱-۸ انجام می‌گیرد. ولی دارای چهار snRNP جدید با فراوانی کم به همراه U_5 ۵snRNP استاندارد می‌باشد.

تقریباً همه mRNAهای دارای عملکرد در مهره‌داران، حشرات و سلول‌های گیاهی از مولکول mRNA اولیه در اثر حذف اینترون‌های داخلی و پیرایش اگزون‌ها مشتق شده‌اند. با این حال، در دو نوع پرتوزوآ، یعنی تریپانوزوم[4] و اوگلنا[5]، mRNAها از طریق پیرایش مولکولهای RNA جدا از هم ساخته می‌شوند. این فرایند پیرایش ترانس[6] نامیده شده و برای سنتز ۱۵-۱۰ درصد از mRNAها در نماتد *caenorhabditis elegans* (مدل مهم بر مطالعه تکوین جنین) مورد استفاده قرار می‌گیرد. پیرایش ترانس با snRNPها و به وسیله فرآیندی مشابه پیدایش اگزون‌ها در یک mRNA اوّلیه انجام می‌شود.

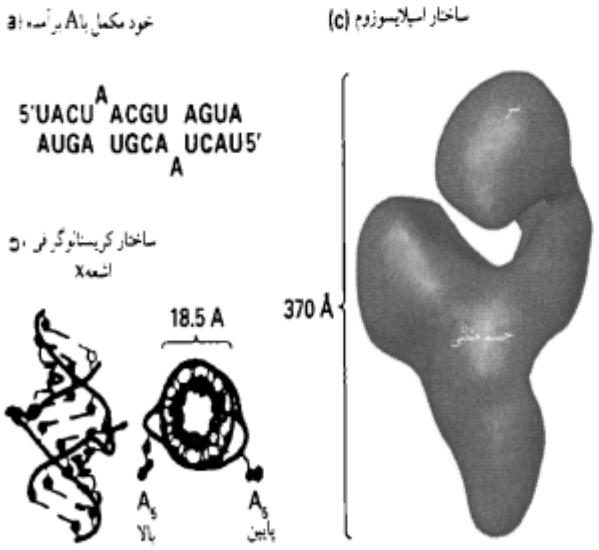
طویل‌شدن زنجیره توسط RNA پلیمراز II همراه با حضور فاکتورهای پردازش‌کننده RNA است

چگونه پردازش RNA با رونویسی mRNA اولیه به طور مؤثری همراه می‌شود؟ پاسخ در دُمین بلند انتهای کربوکسیل RNA (CTD) پلیمراز II نهفته است. همانطور که در فصل ۷ بحث گردید، این دمین از چندین توالی تکراری هفت زیرواحدی (هپتاپپتید) تشکیل شده است. هنگامیکه CTD دُمین آنزیم مخمر کاملاً باز شود حدود ۶۵ nm طول دارد (شکل ۱۲-۸). CTD از RNA پلیمراز II در انسان حدود دو برابر مخمر طول دارد. طول قابل توجه CTD ظاهراً باعث می‌شود که پروتئین‌های متعددی همزمان به یک مولکول RNA پلیمراز II متصل شوند. بعنوان مثال همانطور که قبلاً گفته شد، آنزیم‌هایی که کلاهک ′۵ به رونوشت اولیه اضافه می‌کنند در فاصله کوتاهی بعد از آغاز رونویسی به CTD فسفریله متصل می‌شوند. علاوه بر این، فاکتورهای پیرایش‌کننده RNA و پلی‌آدنیلاسیون نیز همراه با CTD فسفریله یافت شده‌اند. در نتیجه غلظت موضعی این فاکتورهای پردازش کننده افزایش یافته و هنگامیکه سیگنالهای پلی (A) و جایگاه‌های پیرایش توسط پلیمراز رونویسی شد، این امر باعث افزایش سرعت و ویژگی پردازش RNA می‌شود.

1- U_2 - associated factor
2- Exon - junction complex
3- RNA Export factor
4- Trypanosome
5- Euglena
6- Trans splicing

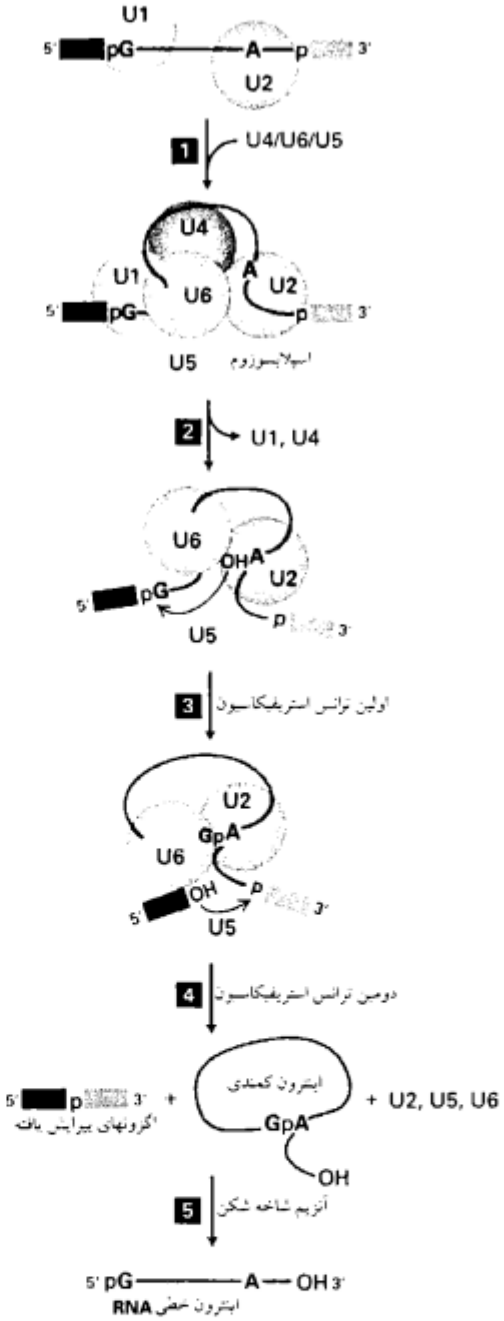


▲ **شکل ۹-۸ (شکل رنگی): جفت شدن بازها بین mRNA اولیه، U1SnRNA و U2SnRNA در فرایند پیرایش.** (a) در این شکل ساختارهای دوم در snRNA هایی که در طی پیرایش تغییر نمی‌کنند به صورت شماتیک نشان داده شده است. توالی نقطه انشعاب مخمر در اینجا نشان داده شده است. توجه کنید U_2 snRNA با توالی بازی که شامل A از نقطه انشعاب است جفت می‌شود. مستطیل بنفش‌رنگ توالی شناسایی شده توسط پروتئین‌های snRNP بوسیلهٔ اتصال به آنتی‌بادی‌های آنتی-sm را نشان می‌دهد. به دلایل ناشناخته سرم بیماران اتوایمن لوپوس اریتماتوس سیستماتیک[1] (SLE) حاوی آنتی بادی علیه پروتئین‌های snRNP است که در شناسایی اجزای سازنده واکنش‌های پیرایش بسیار مفیدند. (b) فقط انتهای ′۵ U_1 snRNA و جایگاه پیرایش ′۵ در mRNA اولیه نشان داده شده است. (چپ) یک جهش (A) در جایگاه پیرایش در جفت‌شدن بازها - انتهای ′۵ U_1 snRNA تداخل ایجاد کرده و مانع پیرایش می‌شود. بیان U_1 snRNA با یک جهش جبرانی (U) که جفت شدن بازها را میسر می‌سازد باعث پیرایش mRNA اولیه جهش یافته می‌شود.



◀ **شکل ۱۰-۸ (شکل رنگی): ساختارهای A بیرون افتاده در یک مارپیچ RNA-RNA و یک حدواسط در فرآیند پیرایش.** (a) ساختار RNA دوتایی با توالی نشان داده شده است و حاوی رزیدوی A بیرون افتاده (قرمز) در موقعیت ۵ مارپیچ RNA است که با کمک کریستالوگرافی اشعه X مشخص شده است. (b) رزیدوهای A بیرون افتاده از کناره مارپیچ فرم RNA-RNA A خارج شده‌اند. اسکلت فسفاتی یک رشته به رنگ سبز نشان داده شده است و رشته دیگر به صورت آبی. ساختار سمت راست ۹۰ درجه چرخیده شده تا پایین محور مارپیچ دیده شود. (c) تصویر ساختار حدواسط پیرایشی اسپلایسوزوم شامل U_6-snRNP، U_5، U_4 و U_2 بوده و توسط میکروسکوپ کرایوالکترون و بازسازی تصویری ساخته شده است. ساختار سه گانه $U_4/U_6/U_5$snRNP ساختار مشابهی با جسم مثلثی این کمپلکس دارد و بیان می‌کند این snRNP ها در پایین ساختاری که در اینجا نشان داده شده قرار دارند. بالای این ساختار به طور عمده از U_2 SnRNA تشکیل شده است.

1- Systematic lupus erytheomatosus



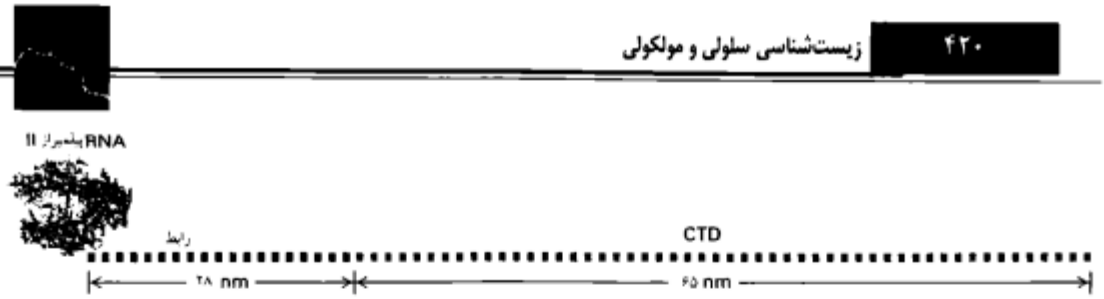
شکل ۱۱-۸: مدل پیرایش mRNA اولیه با وساطت اسپلایسوزوم. مرحله ❶ بعد از اتصال U_1 snRNA و U_2 snRNA به mRNA اولیه از طریق جفت شدن بازها (که در شکل ۹-۸ نشان داده شد) کمپلکس سه‌تایی snRNA از U_6، U_5، U_4 به کمپلکس اولیه ملحق شده و snRNAها اسپلایسوزوم را تشکیل می‌دهند. مرحله ❷ نوآرایی میانکنش‌های جفت شدن بازها بین snRNAها، اسپلایسوزوم را به حالت کنفورماسیونی فعال از لحاظ کاتالیزی تبدیل کرده و snRNAهای U_1 و U_4 را ناپایدار می‌کند تا آزاد شوند. مرحله ❸ به نظر می‌رسد هسته کاتالیزی با U_6 و U_2 تشکیل شده سپس این هسته کاتالیزی اولین واکنش ترانس استریفیکاسیون را کاتالیز نموده و حد واسط دارای پیوند '۲ - '۵ - فسفودی استری را تشکیل می‌دهد و در شکل ۸-۸ نشان داده شده است. مرحله ❹ بدنبال نوآرایی بیشتر بین snRNAها، دُمین واکنش ترانس استریفیکاسیون دو اگزون را با پیوند '۳ و '۵ - فسفودی استر بهم متصل کرده و اینترون به صورت ساختار کمند مانند به همراه snRNAها رها می‌شود. مرحله ❺ اینترون رها شده و به RNA خطی توسط آنزیم شاخه‌شکن تبدیل می‌شود.

حالیکه میانگین طول یک اینترون بسیار بیشتر (حدود ۳۵۰۰ باز) است، طویل‌ترین اینترون بیش از ۵۰۰ kb طول دارد. چون توالی‌های جایگاه پیرایش '۳ و '۵ و نقطه انشعاب دژنره هستند، احتمالاً به صورت تصادفی نسخه‌های متعددی از آنها در اینترون‌های طویل وجود دارند در نتیجه اطلاعات توالی دیگری نیاز است تا در موجودات عالی با اینترون‌های طویل، اگزون‌ها شناخته شده و به هم متصل شوند. اطلاعاتی شناسایی جایگاه‌های پیرایش که اگزون‌ها را تفکیک می‌کند در توالی‌های درون اگزون واقع شده‌اند. خانواده‌ای از پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA بنام پروتئین‌های SR با توالی‌هایی از اگزون‌ها که **تشدیدکننده‌های پیرایش اگزونی**[1] (ESEs) نامیده می‌شود، میانکنش می‌دهند. همانطور که قبلاً گفته شد، پروتئین SR زیرمجموعه‌ای از پروتئین‌های hnRNP بوده و دارای یک یا چند دمین RRM متصل‌شونده به RNA است. آنها همچنین دارای چندین دمین میانکنش پروتئین - پروتئین غنی از رزیدوهای سرین (S) و آرژنین (R) هستند. هنگامیکه پروتئین‌های SR به تشدیدکننده‌های پیرایشی اگزونی متصل می‌شود این پروتئین به صورت متعاون باعث اتصال U_1snRNP به جایگاه پیرایش '۵ و U_2 snRNP به نقطه انشعاب می‌گردد. این نتایج اخیر نشان می‌دهد، همکاری فاکتورهای پردازش‌کننده RNA با CTD فسفریله، باعث تحریک ادامه رونویسی می‌شود. طویل‌شدن زنجیره بااتصال فاکتورهای پردازش‌کننده RNA به CTD فسفریله همراه است. این مکانیسم شاید باعث شود تا mRNA اولیه فقط هنگامی سنتز شود که ماشین پردازش به صورت کامل و درست موضع‌گیری کرده باشد.

پروتئین‌های SR در تشخیص اگزون در mRNA اولیه طویل شرکت می‌کنند

میانگین طول یک اگزون در ژنوم انسان حدود ۱۵۰ باز است در

1- Exonic splicing enhancers



▲ **شکل ۱۲-۸: نمایش شماتیک RNA پلیمراز II با CTD باز شده.**
طول دمین انتهای کربوکسیل (CTD) آنزیم RNA پلیمراز II مخمر به صورت کامل باز شده و ناحیه رابطی که CTD را به پلیمراز متصل می‌کند طول CTD، در RNA پلیمراز II پستانداران دو برابر مخمر است. در حالت کاملاً باز، CTD می‌تواند به صورت همزمان به فاکتورهای متعدد پردازش کننده RNA متصل شود.

اتصال از طریق شبکه‌ای از میانکنش‌های پروتئین - پروتئین که در طول اگزون پل می‌زنند، صورت می‌گیرد (شکل ۱۳-۸). مجموعه پروتئین‌های SR، snRNPها و سایر فاکتورهای پیرایش‌کننده(مثل U_2 AF) که روی اگزون تجمع می‌یابند به عنوان **کمپلکس شناسایی درون اگزونی**[1] نامیده شده و در تشخیص دقیق اگزون‌ها در mRNAهای اولیه طویل نقش دارند.

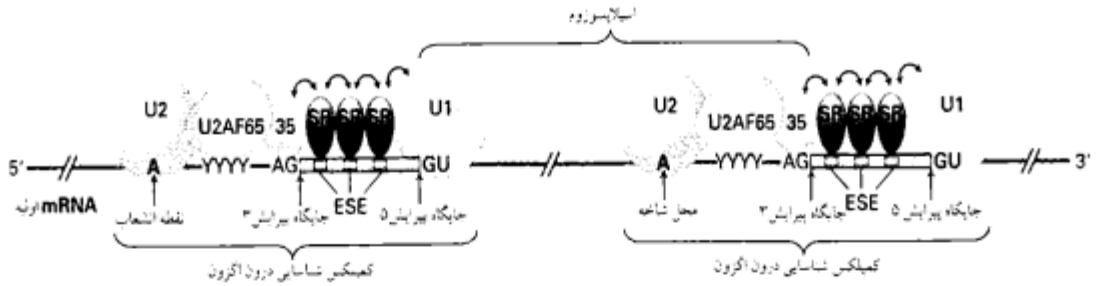
در واحدهای رونویسی موجودات عالی که دارای اینترون‌های طویل هستند، اگزون‌ها نه تنها توالی اسیدآمینه‌ای انواع پروتئین‌ها را رمزدهی می‌کنند، بلکه جایگاه‌های اتصال برای پروتئین‌های SR دارند. جهش‌هایی که در اتصال پروتئین SR به تشدیدکننده پیرایش اگزونی تداخل ایجاد می‌کنند حتی اگر توالی اسیدآمینه‌ای رمزشده را تغییر ندهد از تشکیل کمپلکس شناسایی درون اگزون جلوگیری می‌کند. در نتیجه، اگزون متأثر از جهش در پیرایش نادیده گرفته شده[2] و در mRNA نهایی پردازش یافته قرار نمی‌گیرد. mRNA ناقص ایجاد شده در این حالت تجزیه شده و یا به صورت یک پروتئین جهش‌یافته و دارای عمل غیرطبیعی ترجمه می‌شود. مطالعات اخیر وجود این نوع جهش‌ها را در بیماریهای ژنتیکی انسان نشان داده است. مثلاً **تحلیل ماهیچه ستون فقرات**[3] شایع‌ترین عامل ژنتیکی مرگ و میر نوزادان است. این بیماری به دلیل جهش در ناحیه‌ای از ژن که دارای دو ژن مرتبط به هم است (SMN_1 و SMN_2) ایجاد می‌شود. این ژن‌ها در اثر مضاعف شدن ژنی ایجاد شده‌اند. SMN2 پروتئین مشابه به SMN1 را رمزدهی می‌کند. SMN2 به میزان کمتری بیان می‌شود زیرا جهشی خاموش در یک اگزون از اتصال پروتئین SR به آن جلوگیری می‌کند. این امر منجر به حذف اگزون در اکثر mRNAهای SMN2 می‌گردد. ژن همولوگ SMN موش فقط یک نسخه از ژن همولوگ SMN داشته که برای زنده ماندن سلول‌ها ضروری است. تحلیل ماهیچه‌ای ستون فقرات در انسان از جهش‌های همولوگی که SMN1 را غیرفعال می‌کند ایجاد می‌شود. برای حفظ بقای سلولی طی جنین‌زایی و رشد و نمو جنین، مقدار اندکی پروتئین حاصل از ترجمه قسمت کوچکی از mRNAهای SMN2 که بدرستی پیرایش یافته‌اند، کافیست. اما این مقدار پروتئین برای حفظ بقای نورون‌های حرکتی نخاع در نوزادان کافی نبوده و در نتیجه منجر به مرگ و بیماری‌های مربوطه می‌گردد.

تقریباً ۱۵ درصد جهش‌های تک جفت بازی که موجب بیماری‌های ژنتیکی در انسان می‌شود مربوط به اختلال در تشخیص صحیح اگزونی است. بعضی از این جهش‌ها در جایگاه پیرایش ′۳ یا ′۵ روی داده و اغلب منجر به استفاده از محلهای پیرایش مشابه دیگری که در توالی معمول ژن به طور پنهان وجود دارند، می‌گردد. در غیاب جایگاههای معمول پیرایش، کمپلکس شناسایی درون اگزون جایگاههای دیگری را شناسایی می‌کند. جهش‌های دیگری که منجر به پیرایش غیرمعمول می‌گردد جهش‌هایی است که توالی جایگاه پیرایش مورد توافقی جدید را ایجاد می‌کند و به جای جایگاه معمول پیرایش شناسایی می‌شوند. نهایتاً، بعضی از جهش‌ها پیرایش طبیعی را در جایگاه معمول پیرایش مهار می‌کنند (مثلاً در مورد ژن SMN2) که باعث نادیده گرفته شدن اگزون می‌گردد.

اینترون‌های خود پیراینده گروه دو در مورد تکامل snRNPها اطلاعاتی را فراهم می‌آورند

تحت شرایط خاص غیرفیزیولوژیکی در آزمایشگاه نمونه‌های خالص بعضی رونوشت‌های RNA به آرامی اینترون‌ها را بدون دخالت هیچگونه پروتئینی پیرایش می‌کند. این مشاهدات باعث شناسایی اینترون‌های **خود پیراینده**[4] شد. تا به حال دو نوع از اینترون خود پیراینده شناسایی شده‌اند: اینترون‌های گروه I که در ژن‌های rRNA هسته پروتوزآها وجود دارند و اینترون‌های گروه II

1 - Cross-exon recognition complex
2- Skipped
3- Spinal muscle atrophy
4- Self - splicing



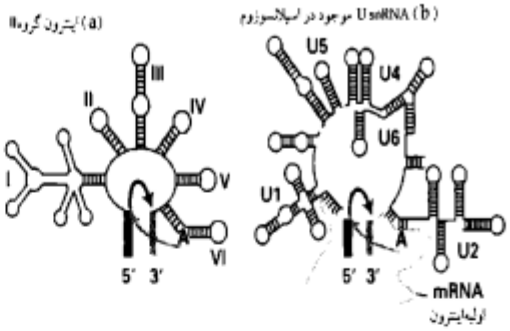
▲ **شکل ۱۳-۸: شناسایی اگزون از طریق اتصال متعاون پروتئین‌های SR و فاکتورهای پیرایشی به mRNA اولیه.** جایگاههای صحیح پیرایشی ′۵GU و ′۳ AG توسط فاکتورهای پیرایشی بر اساس نزدیکی آنها به اگزون تشخیص داده می‌شوند. اگزون‌ها دارای تشدیدکننده‌های پیرایشی اگزونی هستند که جایگاه اتصال پروتئین‌های SR هستند. این پروتئین‌ها هنگام اتصال به ESEs با یکدیگر میانکنش داده و باعث اتصال متعاون U_1 snRNP به جایگاه پیرایشی ′۵ فرودست اینترون و U_2 snRNP به نقطه انشعاب فرادست اینترون و همچنین اتصال متعاون زیرواحدهای ۶۵ و ۳۵ کیلودالتونی U_2 AF به ناحیه غنی از پیریمیدین و جایگاه پیرایش ′۳ AG فرادست اینترون و سایر فاکتورهای پیرایش (نشان داده شده است) می‌شوند. در نتیجه میانکش‌های بین پروتئین و RNA کمپلکس شناسایی درون اگزونی در روی اگزون قرار گرفته و جایگاههای پیرایش صحیح را جهت پیرایش RNA فعال می‌کند. توجه کنید snRNPهای U_1 و U_2 موجود در این واحد از یک اسپلایسوزوم نیستند. U_2 snRNP در سمت راست با U_1 snRNP متصل به انتهای ′۵ همان اینترون یک اسپلایسوزوم را تشکیل می‌دهد. U_1 snRNP نشان داده شده در سمت راست با U_2 snRNP سمت چپ اینترون U_1 snRNP متصل به نقطه انشعاب فرودست اسپلایسوزوم تشکیل می‌دهد (نشانداده نشده است) و U_2 snRNP سمت چپ اینترون U_1 snRNP متصل به جایگاه پیرایش ′۵ در فرادست اینترون اسپلایسوزوم را ایجاد می‌کند. پیکان‌های دوسره، میانکنش‌های پروتئین - پروتئین را نمایش می‌دهد.

که در ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین و بعضی از ژن‌های rRNA و tRNA میتوکندری و کلروپلاست گیاهان و قارچ‌ها وجود دارند. کشف فعالیت کاتالیزی اینترون‌های خودپیراینده مفاهیم موجود درباره وظایف RNA را مجدداً متحول کرد. همانطور که در فصل ۴ بحث شد امروزه گفته می‌شود RNA تشکیل پیوند دی پپتیدی را هنگام سنتز پروتئین در ریبوزوم کاتالیز می‌کند. در اینجا ما نقش احتمالی اینترون‌های گروه II را که تاکنون در DNA میتوکندری و کلروپلاست یافت شده است در تکامل snRNPها بررسی می‌کنیم. عملکرد اینترون‌های گروه I در قسمت بعدی و در پردازش rRNA مورد توجه قرار خواهد گرفت.

با اینکه توالی‌های اینترون‌های گروه II چندانی حفاظت شده نیستند اما همه آنها به صورت ساختارهای دوّم کمپلکس و حفاظت شده تا می‌خورند.این ساختارها دارای ساقه حلقه‌های زیادی هستند(شکل a ۱۴-۸). عمل خودپیرایشی اینترون‌های گروه دو از طریق دو واکنش ترانس استریفیکاسیون انجام می‌گیرد. این عمل پیرایش دارای حدواسطها و محصولات مشابهی با آنچه که در پیرایش mRNA اولیه دیده شده، است. شباهت مکانیسمی بین اینترون‌های خودپیراینده گروه II و پیرایش اسپلایسوزومی این نظریه را ایجادکرد که snRNAها در حالتی مشابه با ساختار ساقه - حلقه موجود در اینترون‌های گروه II عمل می‌کنند. بر اساس این نظریه snRNAها با جایگاههای پیرایش ′۳ و ′۵ mRNA اولیه و با یکدیگر میانکنش می‌دهند تا ساختار سه‌بعدی RNA که از لحاظ عملکردی مشابه به اینترون‌های خودپیراینده گروه II هستند را ایجاد نمایند (شکل b ۱۴-۸).

با بسط این نظریه می‌توان دریافت اینترون‌های mRNA اولیه اجدادی از اینترون‌های خودپیراینده گروه II تکامل یافته‌اند. این تکامل از طریق حذف پیشرونده ساختارهای درونی RNA که همزمان به صورت snRNAهای عمل‌کننده از دور تبدیل شده و همان وظایف را انجام می‌دهند، صورت گرفته است. پذیرش این نوع مدل تکاملی در نتیجه بررسی جهش یافته‌های اینترون‌های گروه II که در آنها دمین V و یا قسمتی از دمین I حذف شده بود، بدست آمده است. رونوشت‌های RNA با چنین اینترون‌هایی، در عمل خودپیرایشی دچار نقص هستند اما هنگامیکه در آزمایشگاه مولکول‌های RNA مشابه نواحی حذف شده به واکنش خودپیرایش افزوده می‌شود، عمل خودپیرایش صورت می‌گیرد. این یافته‌ها نشان داد. این دُمین‌ها در اینترون‌های گروه II همانند snRNAها می‌توانند عمل کننده از دور باشند.

شباهت بین مکانیسم عمل اینترون خودپیراینده گروه II و پیرایش اسپلایسوزومی mRNA اولیه همچنین بیان می‌کند واکنش پیرایش توسط snRNA (نه توسط پروتئین‌ها) موجود در اسپلایسوزوم کاتالیز می‌شود. گر چه اینترون‌های گروه II در شرایط آزمایشگاهی در دمای بالا و غلظت‌های زیاد Mg^{2+} می‌توانند عمل



▲ **شکل ۱۴-۸ (شکل رنگی): مقایسه اینترون‌های خودپیراینده گروه II و اسپلایسوزوم‌ها** نمایش شماتیک مقایسه ساختارهای ثانویه (a) اینترون‌های خودپیراینده گروه II و (b) UsnRNAهای موجود را اسپلایسوزوم، اولین مرحله واکنش ترانس استریفیکاسیون با پیکان سبز روشن و واکنش دوم با پیکانهای آبی رنگ نمایش داده شده است. نقطه انشعاب A برجسته شده است. شباهت ساختاری موجود بین این دو، نشان می‌دهد snRNAهای موجود در اسپلایسوزوم از اینترون‌های گروه II مشتق شده‌اند به طوریکه پروتئین snRNAهای عمل کننده از دور از لحاظ عملکرد با دمین‌های مربوطه در اینترون‌های گروه II شباهت دارند. قطعات رنگی اطراف اینترون‌ها در a و b اگزون‌ها را نشان می‌دهد.

خودپیرایش را انجام دهند ولی در درون بدن پروتئین‌های به نام ماچوراز[1] (که به RNA اینترون گروه II متصل می‌شوند) جهت تسریع عمل پیرایش لازمند. ماچورازها به نظر می‌رسد برای پایدار کردن میانکنشهای سه‌بعدی دقیق RNA جهت انجام دو واکنش ترانس استریفیکاسیون پیرایش ضروری باشند. به طور مشابه پروتئین‌های snRNP موجود در اسپلایسوزوم ساختار دقیق هندسی snRNAها و نوکلئوتیدهای اینترون مورد نیاز جهت انجام پیرایش mRNA اولیه را پایدار می‌کنند.

تکامل snRNAها احتمالاً مرحله‌ای مهم در تکامل یوکاریوت‌های عالی است. هنگامیکه توالی‌های داخلی اینترون حذف شدند و عمل آن‌ها در پیرایش mRNA توسط snRNAهای عمل‌کننده از دور جبران شد، توالی‌های اینترونی باقیمانده برای تکامل واگرا آزاد ماندند. احتمالاً این امر تکامل ژن‌ها را از طریق تلاطم اگزون تسهیل نمود، چون محدودیت کمی بر روی توالی‌های جدید اینترونی تولید شده در این فرآیند وجود دارد (شکل ۱۸-۶ و ۱۹-۶) و این امر همچنین موجب افزایش تنوع پروتئینی حاصل از پیرایش‌های متناوب RNA و سطح دیگری از کنترل ژن در نتیجهٔ پیرایش تنظیم‌شده RNA گردید.

برش ′۳ و پلی آدنیلاسیون mRNA های اولیه به شدت به هم مرتبط هستند

در سلول‌های یوکاریوتی همه mRNAها به جز mRNAهای هیستونی دارای یک دم پلی A هستند. اکثر mRNAهای هیستونی به میزان چشمگیری در مرحله S از ژن‌های تکراری سلول‌های در حال همانندسازی، رونویسی می‌شوند. آنها حالت خاصی از پردازش انتهای ′۳ که شامل برش بدون پلی آدنیلاسیون است را پشت سر می‌گذارند. پروتئین‌های اختصاصی متصل شونده به RNA که به تنظیم ترجمه mRNA هیستونی کمک می‌کنند به انتهای ′۳ ایجادشده در این سیستم ویژه متصل می‌شوند. مطالعات اولیه به وسیلهٔ RNAهای نشاندار شده با ویروس SV۴۰ و آدنوویروس نشان داد، رونوشت‌های اولیه ویروسی از پشت جایگاهی که دم پلی A امتداد می‌یابد، طویل می‌شوند. این نتایج بیان می‌کنند، رزیدوهای A به هیدروکسیل ′۳ تولید شده در اثر برش اندوکلئازی رونوشت بزرگتر افزوده می‌شوند، اما قطعات پیش‌بینی شده RNA فرودست آنها احتمالاً بدلیل تجزیه سریع هرگز در شرایط درون بدن دیده نمی‌شوند. با این حال تشخیص دو محصول پیش‌بینی شده حاصل از برش از طریق واکنش‌های پردازش در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از عصاره هسته سلول‌های انسانی کشت داده شده، مشاهده گردید. فرآیند برش / پلی آدنیلاسیون و تجزیه RNA فرودست ناحیه برش در شرایط آزمایشگاهی بسیار به آرامی صورت گرفته و در نتیجه شناسایی محصول فرودستی برش را تسهیل می‌کند.

نتایج توالی‌یابی اولیه کلونهای cDNA سلول‌های جانوری نشان داد تقریباً همه RNAها دارای توالی ۳۵-۳۰ نوکلئوتیدی AAUAAA در فرادست دم پلی (A) هستند. (شکل ۱۵-۸) تقریباً پلی آدنیلاسیون رونوشت‌های RNA در اثر جهش در DNA الگو به استثنای جهشی که توالی بسیار نزدیک (AUUAAA) را تولید می‌کنند، کاهش می‌یابد. رونوشت‌های RNA پردازش نیافته که از چنین جهش‌هایی ایجاد می‌شوند در هسته تجمع نمی‌یابند بلکه سریعاً تجزیه می‌شوند. مطالعات بیشتر جهش‌زایی نشان داد سیگنال دومی در فرودست ناحیه برش برای برش کارآمد و پلی آدنیلاسیون اکثر mRNAهای اولیه در سلول‌های جانوری لازم است. این سیگنال فرودست دارای توالی خاص نیست بلکه نسبتاً غنی از GU و یا ناحیه غنی از U در حدود ۵۰ نوکلئوتید از ناحیه برش است.

1- Maturase

شناسایی و تخلیص پروتئین‌های مورد نیاز برای برش و پلی‌آدنیلاسیون mRNA منجر به ارایه مدل نشان داده شده در شکل ۱۵-۸ گردید. بر اساس این مدل، **فاکتور اختصاصیت برش و پلی آدنیلاسیون**[1] که دارای ۳۶۰kD (CPSF) وزن مولکولی و چهار پلی‌پپتید است، و ابتدا یک کمپلکس پایدار با سیگنال فرادست پلی (A) AAUAAA تشکیل می‌دهد، سپس حداقل سه پروتئین دیگر به کمپلکس CPSF-RNA متصل می‌شوند. یک پروتئین هترودیمر ۲۰۰kD که **فاکتور محرک برش**[2] (CStF) نامیده می‌شود و با ناحیه غنی از G/U واکنش می‌دهد. پروتئین هترودایمر ۱۵۰ کیلودالتونی که **فاکتور برش** I(CFI)[3] نامیده می‌شود و یک پروتئین بنام **فاکتور برش** II(CFII) (کمتر شناخته شده است) به آن ملحق می‌شود. در نهایت پلی A پلیمراز (PAP) قبل از ایجاد برش به کمپلکس متصل می‌شود. اتصال آنزیم PAP برای ارتباط دادن برش و پلی‌آدنیلاسیون به همدیگر ضروری است به طوریکه انتهای ′۳ ایجاد شده سریعاً پلی آدنیله شده و هیچگونه اطلاعات ضروری در اثر تجزیه نوکلئازی ناحیه ′۳ حفاظت نشده از بین نمی‌رود.

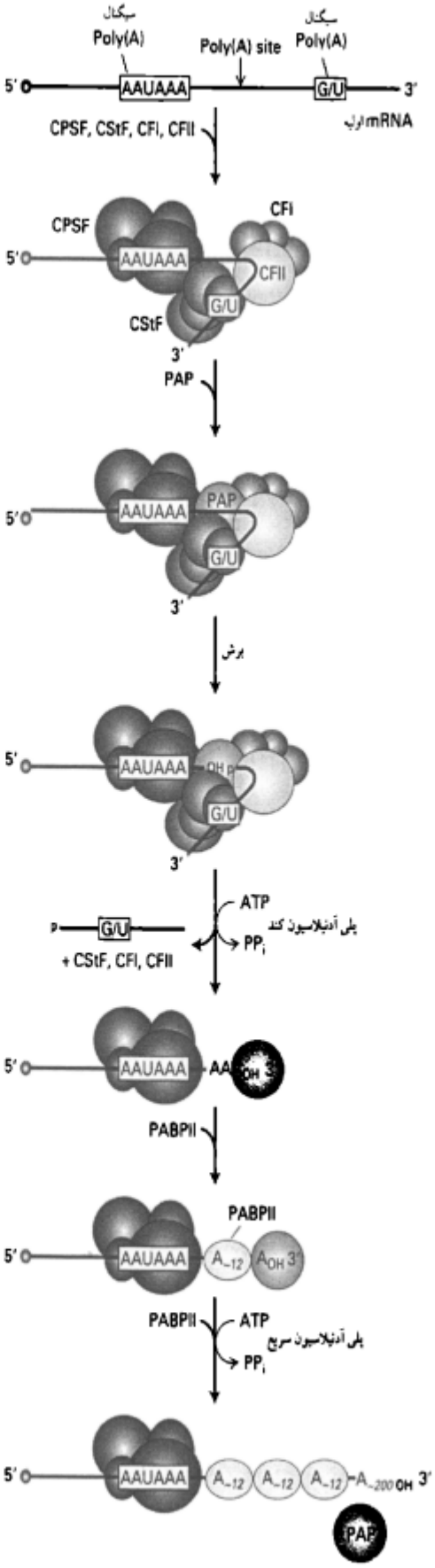
تشکیل مجموعه بزرگ و چندپروتئینی کمپلکس برش / پلی‌آدنیلاسیون در اطراف سیگنال غنی از AU پلی A در mRNA اولیه در بسیار از موارد به تشکیل کمپلکس پیش آغازین رونویسی در ناحیه غنی از AT جعبه TATA در DNA الگو شباهت دارد. (شکل ۳۱-۷). در بعضی موارد کمپلکس چندپروتئینی به صورت متعاون از طریق یک شبکه واکنش پروتئین - اسیدنوکلئیک و پروتئین - پروتئین شکل می‌گیرد. بدنبال برش محل پلی A، پلی آدنیلاسیون در دو مرحله انجام می‌شود. افزایش ۱۲ یا تعداد بیشتری رزیدوی A در مرحلهٔ اول بکندی صورت می‌گیرد. اما افزایش‌های بعدی تا ۲۵۰-۲۰۰ واحد A به سرعت انجام می‌گیرد. مرحله سریع مستلزم اتصال نسخه‌های متعددی از پروتئین متصل شونده به پلی A حاوی موتیف RRM است. این پروتئین‌ها به صورت PABPII نمایش داده می‌شوند تا از پروتئین‌های متصل شونده به پلی A موجود در سیتوپلاسم متمایز گردند. PABPII به دم کوتاه پلی A آغازین که توسط PAP افزوده می‌شود، متصل شده و سرعت پلیمریزاسیون افزایش واحدهای A را توسط PAP افزایش داده و منجر به ایجاد مرحله سریع در پلی‌آدنیلاسیون می‌شود (شکل ۱۵-۸) هنگامیکه طول دم پلی A به ۲۵۰-۲۰۰ واحد رزیدو رسید، پیام‌رسانی به پلی A پلیمراز برای پایان پلیمریزاسیون نیز توسط PABPII صورت می‌گیرد. با این حال مکانیسم کنترل طول دم پلی A هنوز شناخته نشده است. اتصال PABP به دم پلی A جهت ورود mRNA به سیتوپلاسم ضروری است .

اگزونوکلئازهای هسته‌ای RNA حاصل از پردازش اشتباه mRNA های اولیه را تجزیه می‌کنند

چون ژنوم انسانی دارای اینترون‌های بلند است، فقط ۵ درصد از نوکلئوتیدهایی که توسط RNA پلیمراز II در طی رونویسی پلیمریزه می‌شوند در mRNA های بالغ پردازش یافته، باقی می‌مانند. گر چه این فرآیند مؤثر به نظر نمی‌رسد ولی احتمالاً در تکامل موجودات چندسلولی دخالت می‌کند، زیرا فرآیند تلاطم اگزونی تکامل ژن‌های جدید را در موجودات دارای اینترون‌های بلند (فصل ۶) تسهیل می‌کنند. اینترون‌های حاصل از پیرایش نواحی فرودست محل برش و پلی‌آدنیلاسیون توسط اگزوریبوز نوکلئاز هسته‌ای تجزیه می‌شوند. این آنزیم در هر بار یک باز را از انتهای ′۵ یا ′۳ رشته RNA هیدرولیز می‌کند.

همانطور که قبلاً اشاره شد، پیوند ′۲، ′۵ - فسفودی‌استر در اینترون‌های خارج شده [از mRNA اولیه] توسط آنزیم شاخه‌شکن هیدرولیز شده و یک مولکولی خطی با انتهاهای حفاظت نشده ایجاد می‌شود. این مولکول خطی توسط اگزونوکلئازها مورد حمله قرار می‌گیرد (شکل ۱۱-۸). مسیر غالب تجزیه هسته‌ای، هیدرولیز در جهت ′۵ → ′۳ توسط ۱۱ اگزونوکلئاز است که با یکدیگر در یک کمپلکس پروتئینی بنام **اگزوزوم**[4] همکاری می‌کنند. سایر پروتئین‌های موجود در کمپلکس RNA هلیکازها که جفت بازها و میانکنشهای RNA - پروتئین (که از عمل اگزونوکلئازها جلوگیری می‌کنند) را از بین می‌برند. اگزوزوم‌ها در سیتوپلاسم نیز عمل می‌کنند که بعداً بحث خواهد شد. علاوه بر این به نظر می‌رسد اگزوزوم mRNA های اولیه‌ای را که به درستی پردازش نیافته و یا پلی‌آدنیله نشده‌اند، تجزیه می‌کند. هنوز بدرستی روشن نیست چگونه اگزوزوم mRNA های اولیه اشتباه پردازش شده را شناسایی می‌کند. اما در سلول‌های مخمر با پلی (A) پلیمراز جهش‌یافته و حساس به حرارت (شکل ۱۵-۸) در دماهای غیرمعمول mRNA های اولیه در محل رونویسی‌شان باقی می‌مانند. این mRNA های اولیه بصورت غیر طبیعی پردازش یافته و در سلول‌های دارای جهش ثانویه در یک زیرواحد اگزوزوم موجود در هسته (نه در اگزوزوم سیتوپلاسمی) آزاد

1- Cleavage and poly adenylation specificity factor
2- Cleavage stimulatory factor
3- Cleavage factor I
4- Exosome



▶ شکل ۱۵-۸ مدل برش و پلی‌آدنیلاسیون mRNA های اولیه در سلول‌های جانوری. فاکتور اختصاصیت برش و پلی‌آدنیلاسیون (CPSF) به سیگنال فروست پلی (A) AAUAAA متصل می‌شود. CStF با توالی فرودست غنی از GU یا U میانکنش داده و با CPSF متصل شده میانکنش داده و حلقه‌ای در RNA تشکیل می‌دهد. اتصال CF1 و CF11 این کمپلکس را پایدار می‌کند. اتصال پلی A پلیمراز (PAP) موجب تحریک برش در ناحیه پلی A می‌شود. ناحیه برش معمولاً ۳۵-۱۰ نوکلئوتید ′۳ در فرادست سیگنال پلی (A) هستند و محصول برش RNA به همراه فاکتورهای برش آزادشده و سریعاً تجزیه می‌شوند. پس PAP اتصال یافته تقریباً ۱۲ رزیدوی A را با سرعت کم به گروه هیدروکسیل ′۳ ایجادشده در اثر واکنش برش اضافه می‌کند. اتصال پروتئین II متصل شونده به پلی (A) (PABII) به دم پلی (A) اولیه و کوتاه، سرعت افزایش واحدهای A را توسط PAP افزایش می‌دهد. بعد از اضافه شدن ۲۵۰-۲۰۰ رزیدوی A، PABPII به PAP سیگنال داده و پلیمریزاسیون را متوقف می‌کند.

می‌شوند. (۱۰۰kD PM-sel در انسان) اگزوزوم‌ها همچنین به مقدار زیادی در محل‌های رونویسی کروموزوم‌های پلی‌تن دروزوفیلا یافت شده و در آنجا با فاکتورهای طویلسازی RNA پلیمراز II همکاری می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد اگزوزوم در یک مکانیسم کنترلی (اطلاعات در مورد این مکانیسم خیلی کم است) شرکت می‌کند. این مکانیسم mRNA های اولیه راکه به صورت غیرطبیعی پردازش یافته‌اند، تشخیص داده و از ورود آنها به سیتوپلاسم جلوگیری کرده و در نهایت باعث تجزیه آنها می‌شود.

برای جلوگیری از تجزیه رونوشت‌های اولیه و حدواسطهای mRNA های اولیه در حال پردازش و mRNA های بالغ توسط اگزونوکلئازهای هسته‌ای باید انتهاهای آن‌ها پوشیده شوند. همانطور که در بالا گفته شد انتهای ′۵ رونوشت‌های اولیه به محض خروج انتهای ′۵ از پلیمراز با افزودن ساختار کلاهک ′۵ حفاظت می‌شود. کلاهک ′۵ با اتصال **کمپلکس هسته‌ای متصل‌شونده به کلاهک**[1] حفاظت می‌شود. این کمپلکس از عمل اگزونوکلئازهای ′۵ جلوگیری کرده و همچنین در عمل خروج mRNA از هسته به سیتوپلاسم دخالت می‌کند. انتهای ′۳ رونوشت در حال ساخت در درون RNA پلیمراز قرار داشته و اگزونوکلئازها به آن دسترسی ندارند. همانطور که قبلاً گفته شد انتهای ′۳ آزادی که در اثر برش فرودست سیگنال ناحیه پلی A در mRNA اولیه ایجاد می‌شود به سرعت توسط پلی (A) پلیمراز و سایر فاکتورهای پردازشی انتهای ′۳، پلی آدنیله می‌شود و دم پلی A متصل به PABPII را ایجاد می‌کند (شکل

1- Nuclear cap - binding complex

۸-۱۵). جفت شدن برش و پلی‌آدنیلاسیون با همدیگر انتهای ′۳ را از حمله اگزونوکلئازها حفظ می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۸-۱

پردازش mRNA اولیه یوکاریوتی

■ در هسته سلول‌های یوکاریوتی mRNAهای اولیه با پروتئین‌های hnRNP تجمع یافته و با کلاهک‌دار شدن در ′۵ و برش و پلی‌آدنیلاسیون ′۳ پردازش یافته و قبل از انتقال به سیتوپلاسم پیرایش می‌شوند (شکل ۸-۲ را ملاحظه کنید).

■ مدت کوتاهی بعد از آغاز رونویسی آنزیم اضافه‌کننده کلاهک که با CTD فسفریله از RNA پلیمراز II تجمع یافته کلاهک ′۵ را به رونوشت نوظهور اضافه می‌کند. سایر فاکتورهای پردازش کننده دخیل در پیرایش RNA، برش ′۳ و پلی آدنیلاسیون نیز با CTD فسفریله تجمع یافته و سرعت ادامه رونویسی را افزایش می‌دهند. در نتیجه رونویسی تا جمع‌شدن فاکتورهای پردازش شده RNA بر روی CTD با سرعت بالا انجام نخواهد شد. در CTD فاکتورهای پردازش‌کننده باقی می‌مانند تا به محض خروج mRNA نوظهور (تازه سنتزشده) از سطح پلیمراز با آن میانکنش دهند.

■ پنج تا snRNP مختلف با ایجاد جفت باز با یکدیگر و با mRNA اولیه اسپلاسیوزوم را تشکیل می‌دهند (شکل ۸-۱۱ را ملاحظه کنید). این کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی بزرگ دو واکنش ترانس استریفیکاسیون را کاتالیز می‌کند که طی آن دو اگزون به هم متصل شده و اینترون به صورت ساختار کمند مانند (که بعداً تجزیه می‌شود) برداشته می‌شود (شکل ۸-۸ را ملاحظه کنید).

■ SR پروتئین‌ها که به توالی‌های تشدیدکننده پیرایش اگزونی متصل می‌شوند در تعیین اگزون‌ها در mRNAهای اولیه بزرگ موجودات عالی ضروری هستند. شبکه‌ای از میانکنش بین SR پروتئین‌ها، snRNPها و فاکتورهای پیرایش در کمپلکس شناسایی درون اگزون ایجاد می‌شود. این کمپلکس جایگاههای پیرایش صحیح را نشان می‌دهد. (شکل ۸-۱۳ را ملاحظه کنید).

■ عقیده بر این است که snRNAها در اسپلایسوزوم ساختار سوم شبیه به اینترون‌های خود پیراینده گروه II دارند.

■ برای واحدهای رونویسی طویل در موجودات عالی، پیرایش اگزون‌ها معمولاً در هنگام تشکیل mRNA اولیه شروع می‌شود. برش و پلی‌آدنیلاسیون انتهای ′۳ mRNA بعد از رونویسی جایگاه پلی (A) انجام می‌گیرد.

■ در اغلب ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین سیگنال پلی (A) توالی AAUAAA حفاظت شده بوده و اندکی فرادست جایگاه پلی (A) قرار می‌گیرد. در جایگاه پلی (A) برش و پلی آدنیلاسیون اتفاق می‌افتد. توالی غنی از GU یا U فرودست جایگاه پلی (A) در کارایی برش و پلی آدنیلاسیون دخیل است.

■ کمپلکس چند پروتئین حاوی پلی (A) (PAP) برش و پلی‌آدنیلاسیون mRNA اولیه را انجام می‌دهد. یک پروتئین هسته‌ای متصل شونده به پلی (A) (PABPII) اضافه شده رزیدوهای A را بوسیله PAP و توقف اضافه شدن آنها را هنگامی که طول دم به ۲۵۰-۲۰۰ رزیدور رسید تحریک کند (شکل ۸-۱۵ را ملاحظه کنید).

■ اینترون‌های خارج شده و RNA فرو دست حاصل از برش جایگاه پلی (A) در اول بوسیله اگزوزوم‌ها تجزیه می‌شوند. اگزوزوم‌ها (کمپلکس‌های چند پروتئینی هستند که یازده اگزونوکلئاز ′۵→′۳ و همچنین RNA هلیکازها را دارند) mRNAهای اولیه پردازش شده نادرست را نیز تجزیه می‌کنند.

۸-۲ تنظیم پردازش mRNA اولیه

تابحال دیدیم که mRNAهای اولیه چگونه به صورت mRNA بالغ درمی‌آیند. در اینجا چگونگی تنظیم این فرآیند و ژن‌های کنترلی دخیل در این فرآیند را بررسی خواهیم کرد. از فصل ۶ به یاد داریم، یوکاریوت‌های عالی دارای واحدهای رونویسی ساده و پیچیده در DNA الگو هستند. رونوشت‌های اولیه ایجادشده از واحدهای رونویسی ساده یک جایگاه پلی A داشته و فقط یک الگو برای پیرایش RNA اینترون‌های متعدد در ساختار خود دارند، بنابراین آنها فقط یک mRNA، رمزدهی می‌کنند. در مقابل، رونوشت‌های اولیه ایجادشده از واحدهای رونویسی پیچیده (۶۰ درصد کل واحدهای رونویسی در انسان) می‌توانند به صورتهای مختلفی پیرایش شده و mRNAهای مختلفی را تولید کنند. این mRNاها پروتئین‌های متفاوتی را رمزدهی می‌کنند (شکل ۳-۶). پیرایش متناوب مکانیسم اولیه تنظیم پردازش RNA است.

کشف اینکه قسمت عمده واحدهای رونویسی در موجودات عالی mRNAهایی را رمزدهی می‌کنند که با روش پیرایش متناوب پردازش می‌یابند و mRNAهای پردازش یافته با روش‌های

مختلف، در انواع مختلف سلول‌ها بیان می‌شوند، نشان داد، تنظیم پیرایش RNA یک مکانیسم مهم کنترل ژن در موجودات عالی است. گر چه موارد متعددی از برش در جایگاه‌های مختلف پلی (A) در mRNA های اولیه شناخته شده است، **پیرایش متناوب**[1] اگزون‌های مختلف، مکانیسم بسیار متداول از بیان پروتئین‌های مختلف از یک واحد رونویسی پیچیده است.

در فصل ۴ دیدیم، فیبروبلاست‌ها پروتئین خارج سلولی فیبرونکتین را تولید می‌کنند در حالیکه هپاتوسیت‌ها نوع دیگری از آن را سنتز می‌کنند. هر دو نوع ایزوفرم فیبرونکتین توسط یک واحد رونویسی رمزدار می‌شود و به صورتهای مختلف در دو نوع سلول پیرایش یافته و دو نوع mRNA مختلف ایجاد می‌شود. در موارد دیگر، پردازش متناوب به صورت همزمان در یک نوع سلول در پاسخ به پیام‌های تکوینی یا محیطی اتفاق می‌افتد. ابتدا ما یکی از موارد تنظیم پردازش RNA که به خوبی درک شده است را بررسی خواهیم کرد سپس به طور خلاصه به پیامدهای پیرایش RNA در تکوین سیستم عصبی خواهیم پرداخت.

آبشاری از تنظیم پیرایش RNA تمایز جنسی دروزوفیلا را کنترل می‌کند. یکی از اولین موارد تنظیم پیرایش متناوب mRNA اوّلیه از مطالعات تمایز جنسی در دروزوفیلا حاصل شده است. ژن‌های دخیل در تمایز جنسی طبیعی دروزوفیلا در ابتدا با جداسازی جهش‌یافته‌هایی که در این فرآیند دچار نقص بودند، شناسایی شد. زمانی که پروتئین‌های رمزدهی شده توسط ژن‌های نوع وحشی از لحاظ بیوشیمیایی بررسی شدند، مشخص گردید دو نوع از این پروتئین‌ها آبشار پیرایش RNA را در جنین مگس سرکه تنظیم می‌کنند. تحقیقات بیشتر نشان داد که چگونه این پروتئین‌ها پردازش RNA را تنظیم کرده و در نهایت باعث ایجاد دو نوع مهارکننده مختلف رونویسی مختص به جنس می‌شوند. این مهارکننده‌ها تکوین خصوصیات جنس مخالف را مهار می‌کنند.

پروتئین Sxl اولین پروتئینی است که در آبشار عمل می‌کند و توسط **ژن کشنده جنس**[2] رمزدهی می‌شود (شکل ۱۶-۸). پروتئین Sxl فقط در جنین‌های ماده وجود دارد. در ابتدای تکوین ژن از روی پروموتری که فقط در جنس ماده عملکرد دارد رونویسی می‌شود. در مراحل بعدی تکوین این پرموتر ویژه جنس ماده خاموش شده و پرموتر دیگری برای کشندگی جنسی در هر دو جنس نر و ماده فعال می‌شود. با این حال در پروتئین اولیه Sxl، در جنین نر mRNA اولیه ژن کشنده جنس به گونه‌ای پیرایش می‌یابد که حاوی یک رمز توقف در ابتدای توالی خود است. در نتیجه جنین‌های نر، پروتئین Sxl دارای عملکرد را نه در ابتدا و نه در اواخر تکوین نمی‌توانند تولید کنند.

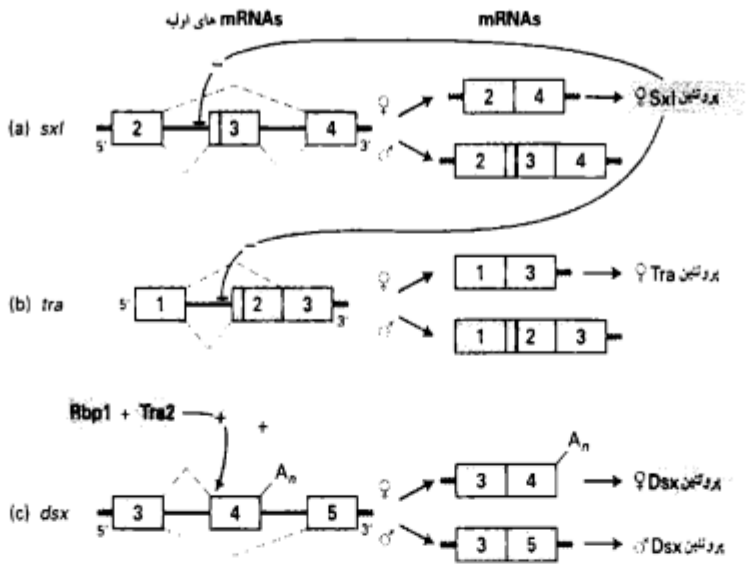
برعکس، پروتئین Sxl بیان شده در ابتدای تکوین جنین‌های ماده، پیرایش mRNA های اولیه ژن کشنده جنس را هدایت می‌کند به طوریکه mRNA کشنده وابسته به جنس فعال و دارای عملکرد تولید می‌شود (شکل ۱۶-۸ a) Sxl این عمل را با اتصال به توالی نزدیک به انتهای ′۳ اینترون بین اگزون ۲ و ۳ mRNA اولیه انجام داده و بنابراین از تجمع صحیح U_2 AF و U_2 snRNP جلوگیری می‌کند. در نتیجه U_1 snRNP متصل به انتهای ′۳ اگزون ۲ با U_2 snRNP متصل به نقطه انشعاب در انتهای ′۳ اینترون بین اگزون‌های ۳ و ۴ به صورت اسپلایسوزوم تجمع می‌یابند و منجر به الحاق اگزون ۲ به ۴ و نادیده گرفته شدن و حذف اگزون ۳ می‌گردند. این mRNA کشنده جنس ویژه جنس ماده حاصل به صورت پروتئین Sxl دارای عملکرد ترجمه شده و این پروتئین بیان خود را در جنین ماده از طریق ادامه حذف اگزون ۳ تقویت می‌کند. فقدان پروتئین Sxl در جنین‌های نر، باعث می‌شود که اگزون شماره ۳ در mRNA وجود داشته و در نتیجه رمز پایان آن از ترجمه پروتئین Sxl دارای عملکرد جلوگیری کند.

پروتئین Sxl همچنین پیرایش متناوب mRNA اولیه ژن **تبدیل‌کننده**[3] را تنظیم می‌کند (شکل ۱۶b-۸) در جنین‌های نر، (که پروتئین Sxl بیان نمی‌شود)، اگزون ۱ به اگزون ۲ که حاوی یک رمز پایان است، اتصال یافته و از سنتز پروتئین **تبدیل کننده** دارای عملکرد جلوگیری می‌کند. با وجود این در جنین‌های ماده، اتصال پروتئین Sxl به انتهای ′۳ اینترون بین اگزون ۱ و ۲، از اتصال U_2 AF به این جایگاه ممانعت می‌کند. میانکنش Sxl با mRNA اولیه پروتئین تبدیل‌کننده توسط دو دُمین RRM موجود در پروتئین انجام می‌شود. (شکل ۵-۸) هنگامی که Sxl متصل شده است U_2 AF با تمایل کمتر به محل دورتری از ′۳ در mRNA اولیه متصل می‌گردد در نتیجه mRNA پروتئین تبدیل‌کننده ویژه جنس که از لحاظ ساختاری دارای اگزون‌های پیرایش‌شده بیشتری است به صورت پروتئین دارای عملکرد (Tra) ترجمه می‌شود.

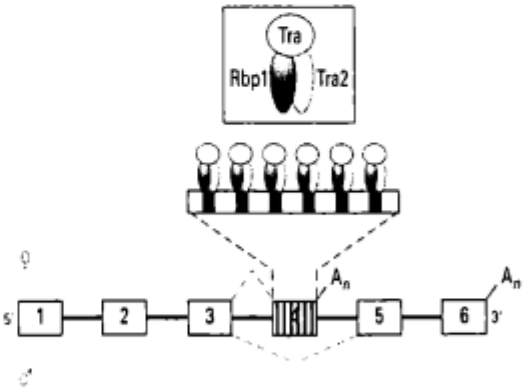
در نهایت، پروتئین Tra پردازش متناوب mRNA اولیه رونویسی شده از ژن دوجنسی را تنظیم می‌کند(شکل ۱۶ c-۸). در جنین‌های ماده، کمپلکسی از Tra و دو پروتئین بیان شده دیگر

1- Alternative splicing 2- Sex-Lethal gene

3- Transformer



▲ **شکل ۱۶-۸ (شکل رنگی) آبشاری از پیرایش تنظیم شده که تعیین جنسیت را در جنین مگس سرکه کنترل می‌کند.** برای روشن بودن مطالب فقط اگزون‌ها (جعبه‌ها) و اینترون‌های (خطوط سیاه) که در آن‌ها پیرایش تنظیم شده روی می‌دهد نشان داده شده است. پیرایش نمایش داده شده در بالا به صورت خطوط نقطه‌چین قرمز رنگ (ماده) و خطوط نقطه چین آبی رنگ در پایین (نر) می‌باشد. خطوط عمودی در اگزون‌ها محل رمز پایان را نشان می‌دهد که از سنتز پروتئین فعال جلوگیری می‌کند. فقط جنس ماده پروتئین Sxl دارای عملکرد تولید کرده و پیرایش بین اگزون ۲ و ۳ را در mRNA اولیه Sxl (a) و اگزون ۲ و ۳ را در mRNA اولیه Tra را مهار می‌کند (b). (c) در مقابل اتصال متعاون پروتئین Tra و دو پروتئین SR یعنی Rbp1 و Tra2، اتصال اگزون ۳ به ۴ و برش / پلی آدنیلاسیون A_n را در انتهای '۳ اگزون ۴ mRNA اولیه dsx در جنین ماده فعال می‌کند. در جنین‌های نر که فاقد پروتئین Tra هستند پروتئین‌های SR به اگزون ۴ متصل نمی‌شوند در نتیجه اگزون ۳ به اگزون ۵ متصل می‌شود. پروتئین Dsx متفاوتی در جنس نر و ماده در نتیجه این آبشار تنظیمی پیرایش، ایجاد شده و رونویسی ژن‌های مورد نیاز برای تمایز جنسی را در جنس مخالف مهار می‌کند.



▲ **شکل ۱۷-۸: مدل فعالسازی پیرایش توسط پروتئین Tra و پروتئین‌های SR، Rbp1 و Tra2.** در جنین‌های ماده مگس سرکه اتصال اگزون ۳ به ۴ در mRNA اولیه dsx با اتصال کمپلکس Tra/Tra2/Rbp1 به شش جایگاه موجود در اگزون ۴ فعال می‌شود. چون Rbp1 و Tra2 در غیاب Tra نمی‌توانند به mRNA اولیه متصل شوند بنابراین اگزون ۴ در جنس نر حذف می‌شود.

Rbp1 و Tra2، اتصال اگزون ۳ به ۴ را هدایت کرده و همچنین فرآیند برش / پلی‌آدنیلاسیون در جایگاه پلی (A) متناوبی را در انتهای '۳ اگزون ۴ را شروع می‌کنند و بنابراین باعث ایجاد یک نسخه کوتاه و ویژه جنس ماده بنام پروتئین Dsx می‌گردند. در جنین‌های نر فاقد پروتئین Tra، اگزون ۴ حذف و اگزون ۳ به اگزون ۵ متصل می‌شود. اگزون ۵ نیز به اگزون ۶ (در انتهای '۳ خود پلی‌آدنیله می‌شود) متصل شده و یک نسخه طولانی و ویژه جنس نر از پروتئین Dsx تولید می‌گردد. همانطور که نتایج آبشار پردازش تنظیم شده RNA درشکل ۱۶-۸ نشان می‌دهد، انواع مختلفی از پروتئین‌های Dsx در جنین نر و ماده بیان می‌شود. پروتئین Dsx در جنس نر مهارکننده رونویسی است و بیان ژن‌های دخیل در تکوین جنس ماده را مهار می‌کند. برعکس پروتئین Dsx موجود در جنس ماده رونویسی ژن‌های مورد نیاز در تکوین نر را مهار می‌کند.

شکل ۱۷-۸ نشان می‌دهد، که چگونه کمپلکس Tra/Tra2/Rbp1 با mRNA اولیه ژن دوجنسی واکنش می‌دهد. Rbp1 و Tra2 از پروتئین‌های SR هستند ولی آن‌ها در غیاب پروتئین Tra با اگزون شماره ۴ واکنش نمی‌دهند. پروتئین Tra با Rbp1 و Tra2 واکنش می‌دهد در نتیجه باعث اتصال متعاون هر سه پروتئین مذکور به شش تشدیدکننده پیرایش اگزونی در اگزون ۴ می‌گردند. سپس پروتئین‌های متصل شده Tra2 و Rbp1 اتصال

U_2 AF و U_2 snRNP را به انتهای ′۳ اینترون بین اگزون ۳ و ۴ را پیش برده و در پیرایش ساختاری اگزون‌ها، همانند سایر پروتئین‌های SR، اگزون‌های پیرایش یافته عمل می‌کنند (شکل ۱۳-۸). کمپلکس Tra/Tra2/Rbp1 همچنین ممکن است اتصال کمپلکس برش/پلی‌آدنیلاسیون را به انتهای ′۳ اگزون ۴ را افزایش دهد.

مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های پیرایش در جایگاههای مختلف، پیرایش را کنترل می‌کنند

با توجه به شواهد شکل ۱۶-۸، پروتئین Sxl دروزوفیلا و پروتئین Tra اثرات متضادی دارند. Sxl مانع از پیرایش و باعث حذف اگزون‌ها می‌شود، در حالیکه Tra پیرایش را شروع می‌کند. عمل پروتئین‌های مشابه می‌تواند بیان ایزوفرم‌های فیبرونکتین را با توجه به نوع سلول در انسان، توضیح دهد. مثلاً یک مهارکننده پیرایشی شبه Sxl در سلول‌های کبدی بیان می‌شود و ممکنست به جایگاههای پیرایشی در اگزون‌های EIIIA و EIIIB، mRNA اولیه فیبرونکتین متصل شده و باعث حذف آنها در طی پیرایش RNA گردند. (شکل ۱۶-۴). از طرف دیگر، فعال‌کننده پیرایش مشابه Tra، در فیبروبلاست‌ها بیان می‌شود و جایگاههای پیرایش اگزون‌های EIIIA و EIIIB فیرونکتین را فعال کرده و باعث می‌شود این اگزون‌ها در mRNA بالغ حضور داشته باشند. آزمایشات تجربی در بعضی از سیستم‌ها نشان داد، وجود یک اگزون در بعضی انواع سلولی و حذف همان اگزون در سایر انواع سلولی حاصل اثر ترکیبی مهار کننده و تشدید کننده‌های پیرایشی مختلف است.

پیرایش متناوب اگزون‌ها، بخصوص در سیستم عصبی متداول است و ایزوفرم‌های متعدد از انواع پروتئین‌های مورد نیاز درتکامل و عملکرد سیستم عصبی در مهره‌داران و بی‌مهرگان را ایجاد می‌کند. رونوشت‌های اولیه این ژن‌ها غالباً الگوهای مختلف پیرایشی داشته و می‌توانند چندین نوع mRNA مختلف تولید کنند. این mRNA های مختلف در محلهای متفاوت در سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شوند. در اینجا دو مورد شاخص را که نقش حیاتی این فرایند را در عملکرد عصبی نشان می‌دهد، موردتوجه قرار می‌دهیم.

بیان پروتئین‌های کانال K^+ در سلول‌های مویی مهره‌داران

در گوش داخلی مهره‌داران، سلول‌های مویی منحصر بفردی که نورون‌های مژه‌دار هستند قرار دارند و با قدرت زیاد به فرکانس خاصی از صدا پاسخ می‌دهند. سلول‌هایی که به فرکانس پایین (≈۵۰Hz) پاسخ می‌دهند در یک انتهای دیگر مجرای حلزونی (گوش داخلی را تشکیل می‌دهد) و سلول‌های مسئول فرکانس بالا (≈۵۰۰۰ Hz) در انتهای دیگر آن قرار دارند (شکل ۱۸ a-۸). سلول‌ها در بین این دو انتها، به شیبی از فرکانس‌های بین این دو محدوده پاسخ می‌دهند. یک عامل اصلی در سازگاری سلول‌های مو در خزندگان و پرندگان بازکردن کانالهای یونی K^+ در پاسخ به افزایش غلظت درون سلولی Ca^{2+} است. غلظتی از Ca^{2+} که در آن کانال باز می‌شود فرکانسی را که پتانسیل غشایی نوسان می‌کند مشخص نموده و از این رو فرکانسی را که سلول‌ها بدان سازگاری یافته‌اند را تعیین می‌کند.

ژن رمزدهی کننده این کانال K^+ فعال شونده با Ca^{2+} به صورت چندین mRNA به صورت متناوب پیرایش یافته، بیان می‌شود. پروتئین‌های مختلفی که به وسیله این mRNA های متنوع رمزدهی می‌شوند در غلظت‌های مختلف Ca^{2+} باز می‌شود. سلول‌های مویی با فرکانس پاسخی مختلف، بسته به موقعیت خود در طول مجرای حلزونی گوش ایزوفرم‌های مختلفی از پروتئین کانال را بیان می‌کنند (شکل ۳۰-۲۳). تنوع توالی در پروتئین‌ها بسیار پیچیده است، حداقل هشت ناحیه در mRNA وجود دارد که در آن اگزون‌ها به صورت یک در میان قرار داشته و با پیرایش متناوب به یکدیگر وصل شده و سبب می‌شوند تا ۵۷۶ ایزوفرم ممکن ایجاد شود. (شکل ۱۸ b-۸). مطالعات PCR با mRNA حاصل از سلول‌های مویی نشان داد، هر سلول مویی مخلوطی از mRNA های مختلف کانال K^+ فعال شونده با Ca^{2+} را تولید می‌کند که در سلول‌های مختلف بر اساس موقعیت‌شان در طول مجرای حلزونی گوش یکی از این mRNA ها غالب می‌باشد. این آرایش جالب بیان می‌کند پیرایش mRNA اولیه کانال K^+ فعال شونده با Ca^{2+} در پاسخ به سیگنالهای خارج سلولی که سلول را از موقعیت خود در طول مجرای گوش مطلع می‌سازد، تنظیم می‌شوند.

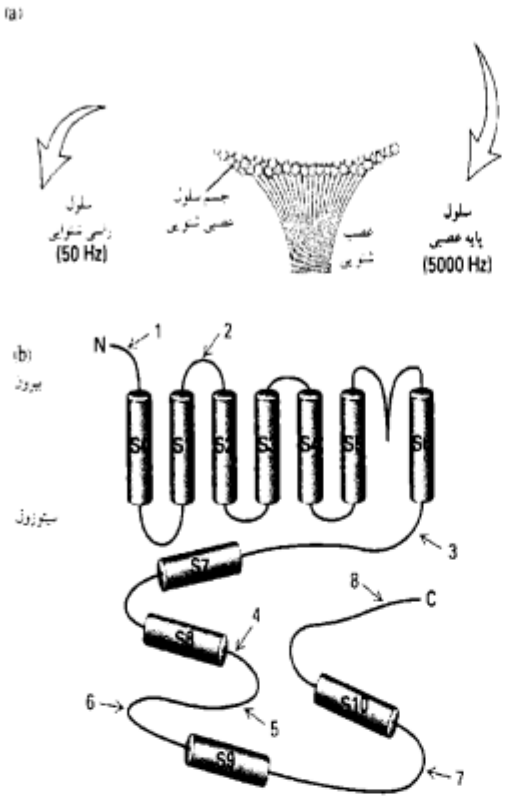
مطالعات دیگری نشان داد، هنگامیکه پروتئین کیناز ویژه در اثر دپلاریزاسیون نورون‌ها در پاسخ به فعالیت سیناپسی نورون‌های عملگر فعال می‌شود یکی از جایگاه‌های پیرایش متناوب در mRNA اولیه کانال K^+ فعال شونده Ca^{2+} مهار می‌شود. این مشاهدات این احتمال را به وجود می‌آورد که یک مهارگر پیرایشی ویژه این جایگاه در اثر فسفریلاسیون با این پروتئین کیناز فعال شده و فعالیت این کیناز نیز با فعالیت سیناپسی تنظیم می‌شود. از آنجائیکه پروتئین‌های SR و hnRNP به طور گسترده توسط فسفریلاسیون و سایر تغییرات پس ترجمه‌ای تغییر

داده می‌شوند به نظر می‌رسد، احتمالاً تنظیم کمپلکس پیرایش متناوب RNA از طریق تغییرات پس ترجمه‌ای فاکتورهای پیرایشی، در تنظیم عملکرد فعالیت نورون‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند.

ژن‌های متعددی مشابه نورون‌های کانال K^+ در مهره‌داران یافت شده است به mRNAهای پیرایش یافته بطور متناوب همزمان از یک ژن در یک نوع نورون و در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی با غلظت نسبی متفاوت بیان می‌شوند. افزایش تعداد واحدهای تکراری ماهواره‌های کوچک در نواحی رونویسی شده ژن‌های بیان شده در نورون‌ها، می‌تواند باعث تغییر غلظت نسبی mRNAهای پیرایش یافته به صورت متناوب گردد که از ژن‌های متعددی رونویسی می‌شود. در فصل ۶ توضیح دادیم چگونه انحراف به سمت عقب در طی همانندسازی DNA منجر به افزایش تکرارهای ماهواره‌های کوچک می‌گردد (شکل ۵-۶). حداقل ۱۴ نوع بیماری عصبی مختلف از افزایش نواحی ماهواره‌های کوچک در نواحی بیان شده نورون‌ها ایجاد می‌شود. به عنوان مثال، شایع‌ترین این نوع بیماریها، **تحلیل ماهیچه‌ای**[1] است که با رعشه و کاهش قوه ادراک و ناهنجاریهای شخصیتی و رفتاری مشخص می‌گردد. تحلیل ماهیچه‌ای در بعضی از بیماران در اثر افزایش نسخه‌های تکراری CUG و در سایر بیماران افزایش تکراری CCUG در رونوشت ایجاد می‌شود. زمانیکه تعداد این تکرارها، به ۱۰ برابر و یا بیشتر از تعداد طبیعی آن در این ژن‌ها می‌رسد، اختلالاتی در سطح دو پروتئین hnRNP مشاهده می‌شود که به این توالی‌های تکراری متصل می‌شوند. این نتایج احتمالاً به دلیل اتصال hnRNPها با غلظت غیرطبیعی بالا به توالی RNA در هسته نورون‌های چنین بیمارانی است. غلظت‌های غیرطبیعی پروتئین‌های hnRNP به نظر می‌رسد که باعث تغییر در سرعت پیرایش جایگاههای مختلف پیرایش متناوب در mRNAهای اولیه چندگانه می‌شود که به طور طبیعی توسط پروتئین‌های hnRNP تنظیم می‌گردد.

بیان ایزوفرم‌های Dscam در نورون‌های شبکیه دروزوفیلا

بهترین مثال از پردازش متناوب تنظیم شده RNA در بیان ژن Dscam دروزوفیلا می‌باشد که هنوز ناشناخته است. جهش در این ژن‌ها با اتصالات طبیعی سیناپسی ایجاد شده که بین اکسونها و در دندریت‌ها طی تکوین مگس تداخل ایجاد می‌کند. بررسی ژن Dscam مگس سرکه نشان داد، این ژن حاوی ۱۹۵ اگزون بوده و به صورت متناوب پیرایش یافته و می‌توانند تا ۳۸۰۰۰ ایزوفرم ایجاد نمایند! نتایج اخیر نشان داده‌اند، جهش یافته‌های دروزوفیلا با



▲ **شکل ۱۸-۸(شکل رنگی): نقش پیرایش متناوب در دریافت صداها با فرکانس‌های مختلف** (a) مجرای حلزونی گوش جوجه، یک لوله‌ای به طول ۵ mm بوده و حاوی اپی‌تلیومی از سلول‌های مژکدار شنوایی است که به شیبی از نوسانات فرکانس از ۵۰Hz در انتهای رأسی و ۵۰۰۰Hz در انتهای پایینی امتداد یافته‌اند. (b) کانال K^+ فعال‌شونده با Ca^{2+} دارای هفت مارپیچ α گذرنده از غشاء (s_0-s_6) بوده و در تشکیل کانال با یکدیگر شرکت می‌کنند. دمین سیتوزلی، شامل چهار ناحیه آبگریز (s_7-s_{10}) بوده و بازشدن کانال را در پاسخ به Ca^{2+} تنظیم می‌کند. ایزوفرم‌های کانال که توسط mRNA پیرایش یافته متناوب حاصل از یک رونوشت اولیه ایجاد می‌گردد در غلظت‌های مختلف Ca^{2+} بازشده و در نتیجه به فرکانس‌های مختلف پاسخ می‌دهند. اعداد قرمز رنگ به نواحی اشاره می‌کند که پیرایش متناوب، توالی اسیدآمینه‌ای متفاوت را در ایزوفرم‌های مختلف ایجاد می‌کند.

نسخه‌ایی از ژن که فقط تا ۲۲۰۰۰ صورت مختلف می‌توانند پیرایش یابند، دچار نقص در اتصالات بین نورون‌ها می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهد بیان اکثر ایزوفرم‌های ممکنه Dscam از طریق پیرایش تنظیم شده RNA به اختصاص یافتن دهها میلیون ارتباط

1- Myotonic dystrophy

سیناپسی ویژه متفاوت در بین نورون‌های مغز دروزوفیلا کمک می‌کند. بعبارت دیگر، ارتباط صحیح نورون‌ها در مغز دروزوفیلا نیازمند پیرایش تنظیم شده RNA است.

ویرایش RNA توالی برخی از mRNA های اولیه را عوض می‌کند.

در اواسط سالهای ۱۹۸۰ تعیین توالی کلون‌های متعدد cDNA و DNA های ژنومی مربوطه حاصل از موجودات مختلف منجر به کشف غیرمنتظره نوع دیگری از پردازش mRNA اولیه گردید. در این نوع پردازش که ویرایش RNA[1] نامیده می‌شود، توالی mRNA اولیه تغییر یافته و در نتیجه توالی mRNA بالغ مربوطه از اگزون‌های رمزدهی کننده آن در DNA ژنومی متفاوت خواهد بود.

ویرایش RNA درمیتوکندری پرتوزوآها و گیاهان و نیز در کلروپلاست‌ها صورت می‌گیرد. در میتوکندری‌های یک نوع تریپانوزومای بیماری‌زا بیش از نیمی از توالی بعضی از mRNA ها از توالی رونوشت‌های اولیه مربوطه متفاوت است. افزایش و حذف تعداد خاصی از یوراسیل به دنبال mRNA توسط RNA های راهنما[2] با جفت بازهای کوتاه انجام می‌شود. این RNA ها توسط هزاران DNA کوچک میتوکندریایی حلقوی کلاف مانند تا مولکول‌های DNA میتوکندریایی کمی بزرگتر رمزدهی می‌شوند. علت این مکانیسم متفاوت در رمزدار کردن پروتئین‌های میتوکندری درچنین پروتوزآهایی مشخص نیست. اما این سیستم می‌تواند هدف داروها جهت مهار آنزیم‌های کمپلکس پردازش مورد نیاز در میکروب‌ها باشد که در سلول‌های انسانی و یا سایر سلول‌های میزبانی مهره‌دار وجود ندارند.

در یوکاریوت‌های پیشرفته، ویرایش RNA بندرت اتفاق می‌افتد و بندرت تغییر یک باز مشاهده می‌شود. با این حال ویرایش RNA در بعضی موارد از لحاظ عملکردی نتیجه مطلوبی داشته است. مهم‌ترین مثال ویرایش RNA در پستانداران در مورد ژن apoB است. این ژن دو فرم متناوب از یک پروتئین سرمی مسئول برداشت و انتقال کلسترول را تولید می‌کند. بنابراین در فرایند بیماری که منجر به آرترواسکلروزیس می‌شود، اهمیت پیدا می‌کند. آرترواسکلروزیس بیماری عروقی بوده و مهم‌ترین عامل مرگ و میر در جهان توسعه‌یافته است. ژن apoB، آپولیپوپروتئین سرمی (apoB100) را در هپاتوسیت‌ها (مهم‌ترین سلول کبدی) تولید و apoB48 را در سلول‌های اپی‌تلیال روده بیان می‌کند. apoB48 با وزن تقریبی ۲۴۰kD به ناحیه انتهای آمینوی، پروتئین apoB100 به وزن تقریبی ۵۰۰kD مربوط می‌باشد. همانطور که در فصل ۱۰ گفته شد هر دو پروتئین apoB به صورت یک کمپلکس بزرگ لیپوپروتئین بیان شده و لیپیدها را در سرم انتقال می‌دهند. با این حال کمپلکس پروتئین با چگالی کم که حاوی apoB100 در تمام سطوح خود می‌باشد. کلسترول را با اتصال به رسپتور LDL موجود در سطح همه سلول‌ها به بافتهای بدن می‌رساند.

بیان مختص به نوع سلول دو نوع apoB در نتیجه ویرایش mRNA اولیه apoB ایجاد می‌شود، به طوری که نوکلئوتید موقعیت ۶۶۶۶ تغییر یافته و از C به U تبدیل می‌شود. این تغییر فقط در سلول‌های روده اتفاق می‌افتد و کدون CAA که برای گلوتامین است را به UAA (رمز پایان) تبدیل کرده و باعث ایجاد فرم کوتاهتر apoB48 می‌شود(شکل ۱۹-۸). مطالعات با آنزیم تخلیص شده به صورت جزئی انجام که دآمیناسیون پس از رونویسی C_{6666} را به U انجام دهد نشان داد که این آنزیم می‌تواند RNA را به اندازه ۲۶ نوکلئوتید اطراف C_{6666} در رونوشت اولیه apoB شناخته و ویرایش نماید.

نکات کلیدی بخش ۲-۸

تنظیم پردازش mRNA اولیه

- به دلیل پیرایش متناوب رونوشت‌های استفاده از پروموترها متناوب (متفاوت) برش در جایگاههای پلی (A) متفاوت، mRNA های متفاوتی ممکن است از بیان یک ژن در سلول‌ها و مراحل مختلف تکوین ایجاد گردد (شکل ۳-۶ و شکل ۱۸-۶ را ملاحظه کنید).
- پیرایش متناوب می‌تواند با پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA متفاوتی تنظیم شود. پروتئین‌های متصل شونده به RNA به توالی‌های خاصی نزدیک جایگاههای پیرایش تنظیم شونده متصل می‌شوند. مهارکننده‌های (رپرسورهای) پیرایش ممکن است بصورت فضایی اتصال فاکتورهای پیرایش را به جایگاههای خاص در mRNA های اولیه بلوکه کنند یا عملکرد آن‌ها را مهار نمایند. فعال‌کننده‌های پیرایش، از طریق میانکنش با فاکتورهای پیرایش پیرایش را تشدید نموده و بنابراین باعث تجمع آن‌ها در جایگاههای پیرایش تنظیم شده می‌گردد.
- در ویرایش mRNA، توالی نوکلئوتیدی RNA اولیه در هسته تغییر می‌کند. در مهره‌داران این فرآیند نادر بوده و باعث دآمینه شدن یک باز در توالی mRNA و در نتیجه تغییر در یک اسید آمینه خاص شده و پروتئینی تولید می‌کند که از لحاظ عملکرد متفاوت است.

1- RNA editing 2- Guide RNAs

۸-۳ انتقال mRNA از عرض پوشش هسته‌ای

mRNA هایی که به طور کامل در هسته پردازش یافته‌اند توسط پروتئین‌های hnRNP به کمپلکسی بنام mRNPs هسته‌ای متصل باقی می‌ماند. قبل از اینکه یک mRNA به پروتئین مربوطه‌اش ترجمه شود، بایستی از هسته به درون سیتوپلاسم منتقل شود. پوشش هسته‌ای غشای دولایه‌ای بوده و هسته را از سیتوپلاسم جدا می‌کند (شکل ۱-۹). مانند غشای پلاسمایی اطراف سلول‌ها، هر غشای هسته‌ای شامل دو لایه فسفولیپیدی نفوذناپذیر به آب و پروتئین‌های متعدد همراه با آن است. mRNP و سایر ماکرومولکول‌ها مثل tRNA و زیرواحدهای ریبوزومی بوسیله منافذ هسته‌ای از غشای هسته‌ای عبور می‌کنند. در این قسمت بر روی خروج mRNP از منافذ هسته‌ای و مکانیسم‌هایی که امکان تنظیم در این مرحله را می‌دهند، متمرکز خواهیم شد.

کمپلکس منافذ هسته‌ای ورود و خروج را از هسته کنترل می‌کند

کمپلکس منافذ هسته‌ای[1] (NPC,) ساختار پیچیده و بزرگی بوده و از نسخه‌های متعددی از چندین نوع پروتئین مختلف (تقریباً ۳۰ پروتئین) به نام **نوکلئوپورین‌ها**[2] تشکیل شده‌اند. این منافذ در داخل پوشش هسته‌ای قرار گرفته و ساختار هشت ضلعی و هشت رشته که به داخل نوکلئوپلاسم امتداد یافته‌اند و هشت رشته دیگر که به داخل سیتوپلاسم امتداد یافته‌اند، دارند (شکل ۲۰a-۸).

رشته‌های امتدادیافته از سطح هسته‌ای NPC در انتهای خود توسط حلقه انتهایی (ساختاری بنام **سبد هسته‌ای**[3] را تشکیل می‌دهد) به یکدیگر متصل می‌شوند. کلاس ویژه‌ای از نوکلئوپورین‌ها به نام نوکلئوپورین‌های FG[4] سراسر کانال مرکزی NPC را می‌پوشانند. نوکلئوپورین‌های FG حاوی رشته‌های بلندی از اسیدهای آمینه آبدوست بوده و دارای تکرارهای آبگریز FG می‌باشد. توالی تکراری FG، توالی کوتاه غنی از فنیل آلانین (F) و گلیسین (G) هستند.

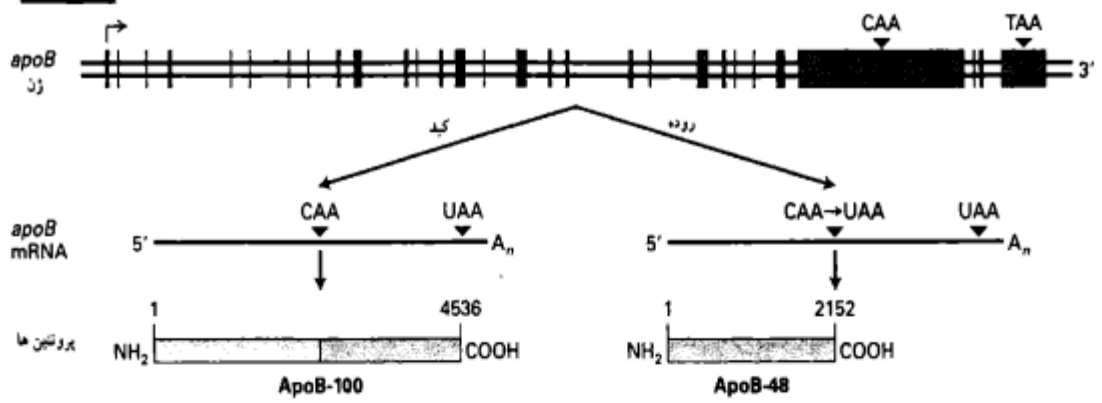
آب، یونها، متابولیت‌ها و پروتئین‌های کوچک کروی تا وزن ۴۰KD می‌توانند از کانال‌های پر شده با آب کمپلکس منافذ هسته انتشار یابند. با وجود این نوکلئوپروتئین‌های FG در کانال مرکزی یک سد محدودکننده برای انتشار ماکرومولکول‌ها بین سیتوپلاسم و هسته ایجاد می‌کنند. این مولکول‌های بزرگتر بایستی با کمک پروتئین‌های محلول ناقل (که به ماکرمولکول‌ها متصل می‌شوند) و همچنین میانکنش با تکرارهای FG از نوکلئوپروتئین‌های FG به صورت انتخابی از عرض پوشش هسته‌ای انتقال داده شوند.

در مدل حاضر از کانال مرکزی کمپلکس منفذ هسته‌ای، دمین‌های تکراری FG از نوکلئوپروتئین‌های FG نواحی پلی‌پپتیدی راندوم کویل را تشکیل می‌دهند که تا کانال امتداد می‌یابند. (شکل b ۲۰-۸). دُمین‌های تکراری FG مولکول‌های مختلف نوکلئوپروتئین FG با یکدیگر در تشکیل شبکه اسفنجی مولکولی و بازآرایی آن به صورت پوسته همکاری کرده و در نهایت این شبکه می‌تواند شبیه به یک غربال عمل نماید (شکل c ۲۰-۸). مولکول‌های کوچک می‌توانند از فضای بین دمین‌های تکراری FG عبور کنند. اما پروتئین‌های بزرگتر و ریبونوکلئوپروتئین‌ها مثل mRNP برای عبور از فضای بین رشته‌های تشکیل دهنده غربال مولکولی خیلی بزرگ بوده و در نتیجه نمی‌توانند از فضای کمپلکس منفذ هسته عبور کنند.

پروتئین‌های انتقالی هسته به صورت برگشت‌پذیر به نواحی FG آبگریز نوکلئوپروتئین‌های FG متصل می‌شوند. به نظر می‌رسد این میانکنش‌ها در سطوح متعدد ناقلین دخالت نموده و امکان می‌دهند پروتئین‌ها از کانال مرکزی انتشار یابند. (شکل d ۲۰-۸)

mRNP ها از NPC توسط **خارج کننده mRNP**[5] انتقال داده می‌شوند. خارج‌کننده mRNP هترودایمری از یک زیرواحد بزرگ به نام **فاکتور خارج‌کننده هسته‌ای**[6] (NXF1) یا TAP و زیرواحد کوچک، یعنی **ناقل خروج از هسته I**[7] (NXt1) است. TAP به mRNP های هسته‌ای از طریق همکاری با RNA و سایر پروتئین‌های کمپلکس mRNP اتصال می‌یابد. یکی از مهم‌ترین این پروتئین‌ها، **فاکتور خارج‌کننده RNA**[8] (REF) است که جزو کمپلکس تقاطع اگزونی بوده (قبلاً توضیح داده شده است) و تقریباً به ۲۰ نوکلئوتید در سر ′۵ هر تقاطع اگزون - اگزون متصل می‌شود (شکل ۲۱-۸). فاکتور خارج‌کننده TAP/Nt 1 mRNP همچنین با پروتئین‌های SR متصل به تشدیدکننده‌های پیرایش همکاری می‌کنند. بنابراین پروتئین‌های SR متصل

1- Nuclear pore complexes
2- Nucleoporins
3- Nuclear basket
4- FG-nucleoporins
5- mRNP exporter
6- Nuclear export factor 1
7- Nuclear export transp. r 1
8- RNA export factor



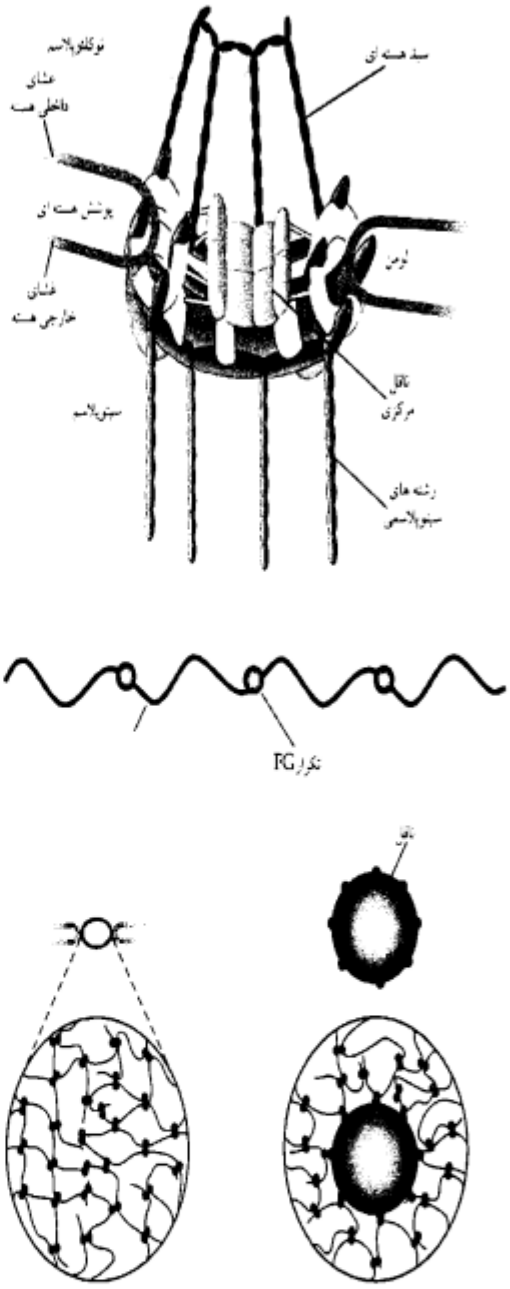
▲ **شکل ۱۹-۸: ویرایش RNA مربوط به mRNA اولیه apoB** در سلول‌های کبدی mRNA مربوط به apoB تولید می‌شود که همان توالی مربوط به رونوشت اولیه را دارد. این mRNA به صورت apo-B100 ترجمه شده و این پروتئین دو دُمین عملکردی دارد، دمین ناحیه آمینو به لیپیدها و دمین ناحیه کربوکسیل به رسپتورهای LDL در غشای سلولی متصل می‌شود. در mRNA، apoB تولید شده در روده رمز CAA در اگزون ۲۶ به رمز پایان UAA ویرایش می‌یابد. بنابراین در سلول روده apoB48 تولید می‌شود که به دُمین انتهای آمینوی apo-B100 مربوط می‌گردد.

به اگزون‌ها در پیرایش mRNA اولیه و خارج کردن mRNA های کاملاً پردازش یافته از طریق NPCها به داخل سیتوپلاسم دخالت می‌کنند. احتمالاً mRNP ها به صورت طولی توسط چندین فاکتور خارج‌کننده TAP/Nt 1 mRNP به یکدیگر متصل می‌شوند که هر دو با دمین‌های FG نوکلئوپورین‌های FG میانکنش دارد تا خروج mRNP ها از کانال مرکزی NPC تسهیل گردد (شکل ۲۰-۸). رشته‌هایی که در سطح هسته‌ای و سیتوپلاسمی NPC امتداد می‌یابند نیز در خروج mRNP شرکت می‌کنند. Cle2 یک پروتئین سازگار کننده بوده و به صورت برگشت‌پذیر به TAP و نوکلئوپورین موجود در سبد هسته‌ای متصل می‌شود و mRMP هسته‌ای را نزدیک منفذ آورده و آماده خروج می‌کند. نوکلئوپورین‌های موجود در رشته‌های سیتوپلاسمی NPC به یک RNA هلیکاز متصل می‌شود که احتمالاً در جدا شدن TAP/Nt 1 و سایر پروتئین‌های hnRNP از mRNP ها هنگام رسیدن به سیتوپلاسم نقش دارد.

در فرآیندی به نام **بازآرایی mRNP**[1] پروتئین‌های متصل به یک mRNA در کمپلس mRNP هنگام عبور mRNP از NPC با مجموعه متفاوتی از پروتئین‌ها مبادله می‌شوند. بعضی از پروتئین‌های mRNP در مراحل ابتدایی انتقال از mRNP جداشده و در هسته باقی می‌مانند تا به mRNA ی تازه سنتز شده متصل شوند. سایر پروتئین‌های هسته‌ای mRNP همراه با کمپلکس mRNP حتی در زمان انتقال از منفذ باقی مانده و بعد از اینکه mRNP به سیتوپلاسم رسید از کمپلکس جدا می‌شوند. این پروتئین‌ها شامل خارج‌کننده TAP/Nt 1 mRNP و CBC متصل به کلاهک و PABPII متصل به دم پلی A است. این پروتئین‌ها در بخش سیتوپلاسمی NPC در اثر عمل RNA هلیکاز از mRNP جدا می‌شود، این هلیکاز به رشته‌های NPC در بخش سیتوپلاسمی متصل است. این پروتئین‌ها همانطور که برای سایر پروتئین‌های هسته‌ای در فصل ۱۳ توضیح داده شده سپس به سمت هسته برگشته و در آنجا می‌توانند در انتقال mRNP دیگر شرکت کنند. در سیتوپلاسم فاکتور آغاز ترجمه متصل به کلاهک یعنی E eIF_4 جایگزین CBC متصل به کلاهک mRNP های هسته‌ای می‌گردد. در مهره‌داران پروتئین متصل شونده به دم پلی (A) PABPII با پروتیئن سیتوپلاسمی متصل شونده به پلی (A) PABPI جایگزین می‌شود، علت نامگذاری این است که این پروتئین قبل از PABPII شناسایی شد). (در مخمرهای جوانه زدن فقط یک نوع PABP در هسته و سیتوپلاسم یافت شده است).

پروتئین SR مخمر. مطالعات اخیر نشان می‌دهد، مسیر خروج mRNP از هسته به سیتوپلاسم با فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئین‌های سازگار کننده mRNP مثل REF کنترل می‌شود. REF در اتصال خارج‌کننده TAP/Nt mRNP به mRNP ها کمک می‌کند. در یک مورد پروتئین مخمری SR (Npl3) به عنوان پروتئین سازگارکننده عمل می‌کند و اتصال خارج‌کننده mRNP مخمری را باعث می‌شود (شکل ۲۲-۸). ابتدا، پروتئین SR در حالت فسفریله به mRNA های اولیه نوظهور متصل می‌شود. هنگامیکه برش و پلی‌آدنیلاسیون ′۳ بطور کامل انجام شد، پروتئین SR توسط فسفاتاز که یک پروتئین هسته‌ای لازم برای خروج mRNP است، دفسفریله می‌شود. فقط حالت دفسفریله پروتئین سازگارکننده

1- mRNP remodeling



▲ **شکل ۲۰-۸ مدل مسیر ناقلین از طریق یک NPC.** (a) ساختار NPC (b) دمین‌های FG نوکلئوپورین‌های FG به نظر می‌رسد که کنفورماسیونی پهن داشته و شامل نواحی طویل آبدوست پلی پپتیدی هستند که توسط دُمین‌های کوتاه FG آبگریز از هم جدا شده‌اند، (c) تکرارهای FG سریعاً به یکدیگر به صورت برگشت‌پذیر متصل شده و یک غربال مولکولی که دایماً در حال نوآرایی است را تشکیل داده و باعث انتشار مولکول‌های کوچک محلول در آب می‌شود. با این حال ماکرومولکول‌ها برای عبور از کانال بسیار بزرگ هستند. (d) ناقلین هسته‌ای دارای نواحی آبگریز در سطح خود بوده و به صورت برگشت‌پذیر به دُمین‌های FG در نوکلئوپورین‌های FG متصل می‌شود. در نتیجه آنها می‌توانند از غربال مولکولی در کانال مرکزی NPC نفوذ کرده و به داخل و خارج هسته انتشار یابند.

می‌تواند به خارج کننده mRNP متصل شود. بنابراین خروج mRNP با پلی آدنیلاسیون صحیح همراه است. این یک نوع «**کنترل کیفی**»[1] mRNA است. اگر mRNP نوظهور بدرستی پردازش نیافته باشد توسط فسفاتازی که Npl3 را دفسفریله می‌کند شناسایی نمی‌شود و در نتیجه به خارج‌کننده mRNA متصل نشده و از هسته خارج نمی‌گردد و در عوض توسط اگزوزوم تجزیه می‌شود. اگزوزوم کمپلکسی از چندین پروتئین بوده و RNA های فاقد پوشش را در هسته و سیتوپلاسم تجزیه می‌کند (شکل ۱-۸). به دنبال ورود به سیتوپلاسم پروتئین Npl3 SR توسط پروتئین کیناز ویژه موجود در سیتوپلاسم فسفریله می‌شود. این امر باعث جداشدن آن از mRNP و همینطور از خارج‌کننده mRNP می‌گردد. در این مسیر، دفسفریلاسیون پروتئین‌های سازگار کننده mRNP در هسته وقتی که RNA به طور کامل پردازش یافت، فسفریلاسیون آنها در سیتوپلاسم در اثر غلظت بالای کمپلکس mRNP و خارج‌کننده mRNP در هسته (در محل تشکیل آنها) و در غلظت‌های پایین‌تر این کمپلکس‌ها در سیتوپلاسم (در محل جداشدن آنها) صورت می‌گیرد. در نتیجه مسیر خروج mRNP با انتشار ساده در اثر اختلاف غلظت صورت می‌گیرد و کمپلکس mRNP و خارج‌کننده mRNP از NPC و از غلظت بالا در هسته به طرف غلظت پائین در سیتوپلاسم انتشار می‌یابد.

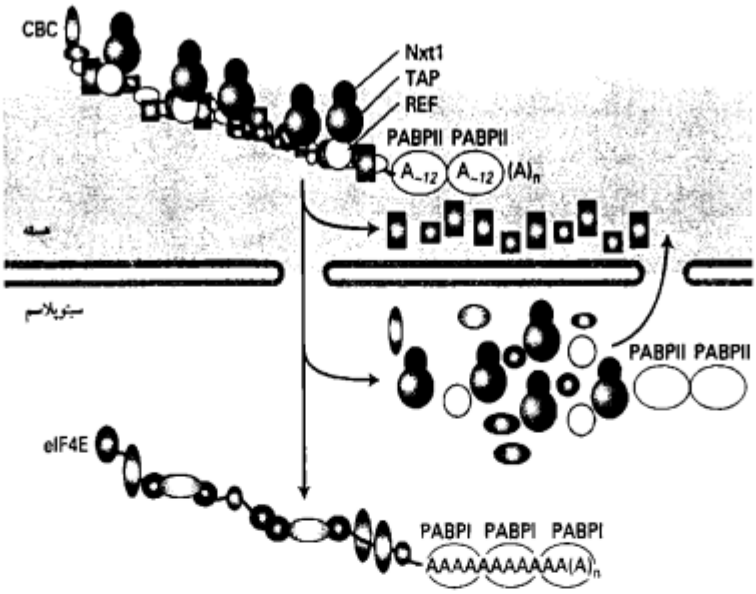
خروج از هسته mRNP های حلقه بالبیانی

غدد بزاقی لارو حشره *Chironomous tentans* مدل خوب برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی تشکیل hnRNP ها و انتقال آنها از طریق NPC ها می‌باشد. در این لاروها ژن‌ها در **تورم‌های کروموزومی بزرگ**[2] بنام **حلقه بالبیانی**[3] به فراوانی به mRNA های اولیه‌ای رونویسی می‌شوند که با پروتئین‌های hnRNP همراه شده و به صورت mRNP های پیچ خورده درمی‌آیند. طول این mRNA حدود ۷۵kb است (شکل ۲۳a,b-۸). این mRNA های بزرگ پروتئین‌های چسبنده‌ای را رمزدهی می‌کنند که لارو در حال تکوین را به سطح برگ می‌چسباند. بعد از پردازش mRNA اولیه hnRNP های حلقه بالبیانی، mRNA حاصله از منفذ هسته‌ای عبور کرده و به سیتوپلاسم می‌رسد. میکروگراف‌های الکترونی این سلول‌ها نشان می‌دهد که

1- Quality control

2- large chromosomal puffs

3- Balbiani Ring mRNPs



▲ **شکل ۲۱-۸ بازآرایی mRNP در هنگام خروج از هسته.** بعضی از پروتئین‌های mRNP (مربع) از mRNP هسته قبل از خروج از NPC جدا می‌شوند و بعضی دیگر (بیضی) همراه با mRNP از NPC عبور می‌کنند اما در سیتوپلاسم از آن جدا شده و از طریق NPC مجدداً به هسته برمی‌گردند. در سیتوپلاسم فاکتور آغاز ترجمه eIF4E جایگزین CBC متصل به کلاهک ′۵ می‌شود و PABPI به جای PABPII قرار می‌گیرد.

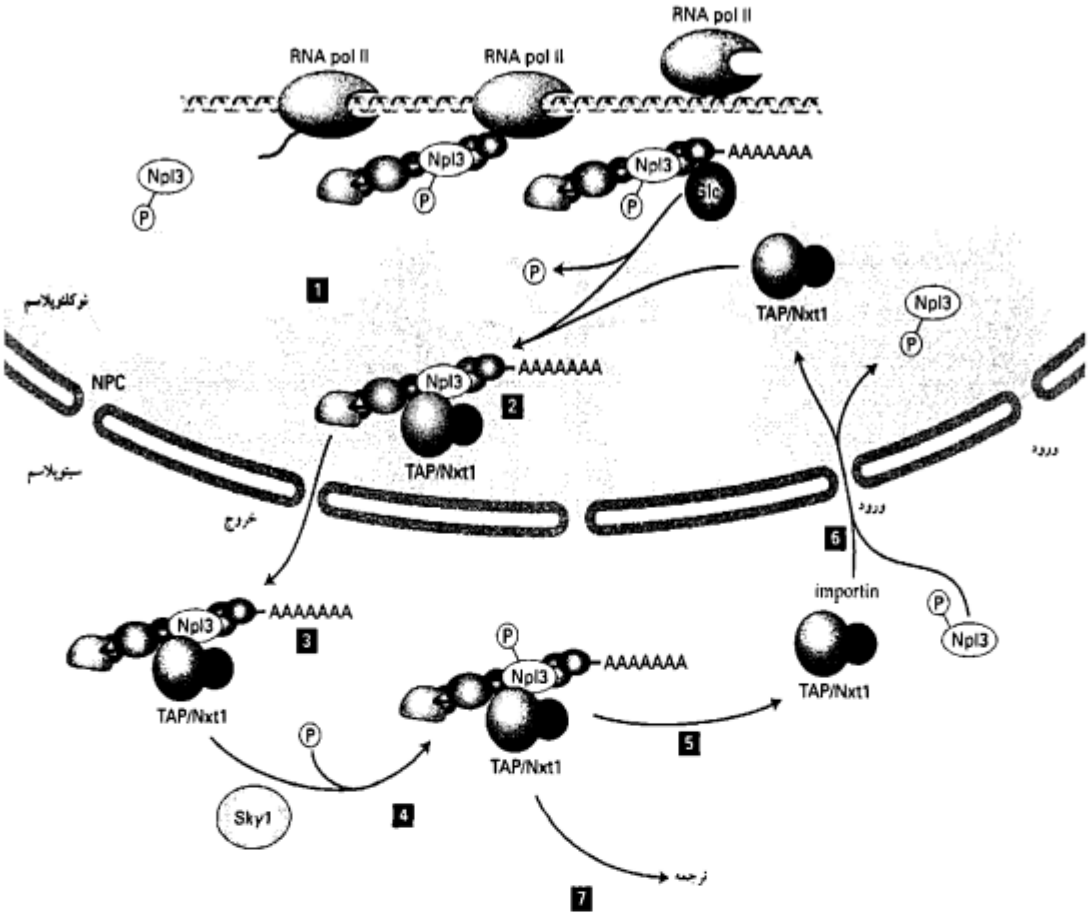
mRNA ها ظاهراً در طی عبور از منافذ هسته‌ای پیچ خورده نبوده و به محض ورود به سیتوپلاسم به ریبوزوم‌ها متصل می‌شوند. این بازشدن mRNA احتمالاً بدلیل بازآرایی mRNP در نتیجه فسفریلاسیون پروتئین‌های mRNP توسط کینازهای سیتوپلاسمی و عمل RNA هلیکاز متصل به دُمین سیتوپلاسمی رشته‌های NPC می‌باشد. مشاهده اینکه mRNP ها در طی انتقال با ریبوزوم‌ها مجتمع می‌شوند حاکی از آن است که انتهای ′۵ در مسیر عبور از کمپلکس منفذ در جلو قرار می‌گیرد. مطالعات بیشتر میکروسکوپ الکترونی انتقال mRNP های حلقه با لبیانی از کمپلکس منفذ هسته منجر به ارائه مدل نشان داده شده در شکل ۲۳c-۸ گردید.

mRNP های اولیه موجود در اسپلایسوزوم از هسته خارج نمی‌شوند

بطور حتم فقط mRNA های کاملاً پردازش یافته می‌توانند از هسته خارج شوند زیرا ترجمه mRNA هایی که بدرستی پردازش نیافته و دارای اینترون هستند پروتئین‌های ناقصی را تولید می‌کند که ممکن است با عملکرد سلولی تداخل داشته باشد. ممانعت از این عمل، معمولاً از انتقال mRNA های اولیه متصل به snRNP ها موجود در اسپلایسوزوم به سیتوپلاسم جلوگیری می‌کند.

در یک آزمایش که این محدودیت را نشان می‌دهد، ژن رمزدهی‌کننده mRNA اولیه با یک اینترون که معمولاً در اثر پیرایش برداشته می‌شود، جهش داده شدند تا توالی مورد توافق جایگاه پیرایش تغییر یابد. جهش در بازهای ′۳ و یا در ′۵ جایگاه پیرایش در انتهاهای اینترون، mRNA های اولیه راتولید می‌کند که با اتصال به snRNP ها، اسپلایسوزوم را تشکیل می‌دهد. با این حال پیرایش RNA صورت نگرفته و mRNA اولیه در هسته باقی می‌ماند. برعکس، جهش در هر دو جایگاه پیرایش ′۳ و ′۵ در همان mRNA اولیه منجر به خروج mRNA های اولیه پیرایش نیافته می‌شود، اما کارایی این خروج خیلی کمتر از mRNA پیرایش یافته است. هنگامیکه هر دو جایگاه پیرایش، جهش‌یافته هستند mRNA اولیه به خوبی به snRNP ها متصل نشده و در نتیجه خروج آنها بلوکه نمی‌گردد.

مطالعات اخیر در مخمر نشان داد، پروتئین هسته‌ای که با نوکلئوپورین در سبد هسته‌ای NPC تجمع می‌یابد، جهت نگهداری mRNA اولیه همراه با snRNP در هسته لازمست. اگر این پروتئین با



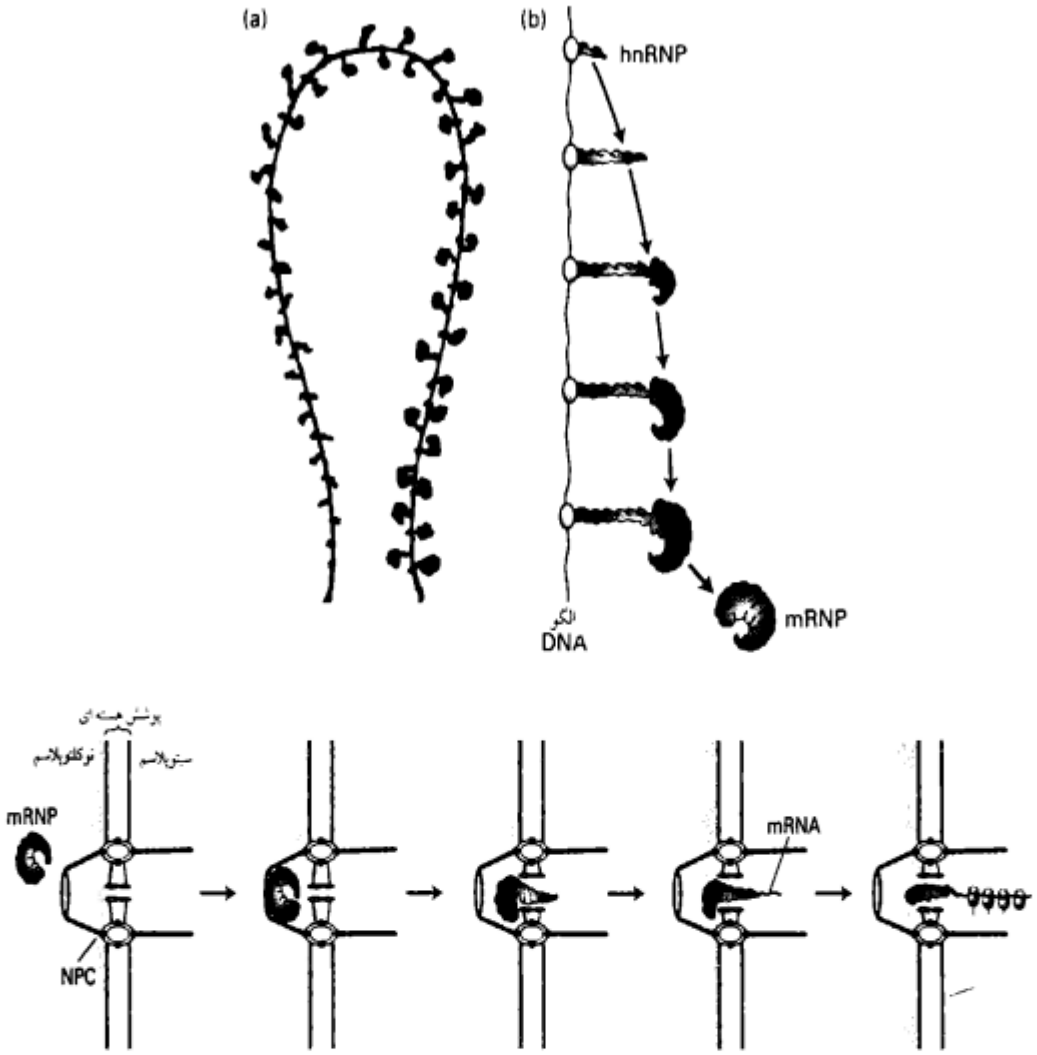
▲ **شکل ۲۲-۸ فسفریلاسیون برگشت‌پذیر و مسیر خروج mRNP از هسته.** مرحله ❶ پروتئین مخمری Npol3 SR در حالت فسفریله به mRNA اولیه توظهور متصل می‌شود ❷ هنگامیکه پلی آدنیلاسیون به صورت موفقیت‌آمیز رخ داده باشد، فسفاتاز هسته ای Glc7 که برای خروج mRNP لازمست Npl3 را دفسفریله می‌کند و باعث پیشروی اتصال خارج‌کننده mRNP مخمری TAP/Nt1 می‌گردد. مرحله ❸ خارج‌کننده mRNP اجازه انتشار به کمپلکس mRNP از میان کانال مرکزی کمپلکس مرکزی هسته NPC را می‌دهد. مرحله ❹ پروتئین کیناز سیتوپلاسمی sky1، NPB را در سیتوپلاسم فسفریله می‌کند. ❺ و باعث جدایی خارج‌کننده mRNP و Npl3 فسفریله احتمالاً در اثر عمل RNA هلیکاز متصل به رشته‌های سیتوپلاسمی NPC، می‌شود❻ ناقل mRNA و Npl3 فسفریله از طریق NPC به هسته برمی‌گردند ❼ mRNA انتقال یافته برای ترجمه در سیتوپلاسم قابل دسترس است.

نوکلئوپورینی که این پروتئین به آن متصل می‌شود حذف گردد، mRNA های اولیه پیرایش نیافته از هسته خارج می‌شوند.

اغلب موارد تالاسمی (یک بیماری ژنتیکی که منجر به کاهش غیرمعمول پروتئین‌های گلوبین می‌شود) در اثر جهش‌هایی ایجاد می‌شود که در جایگاه پیرایش ژن گلوبین صورت گرفته و باعث کاهش بازدهی پیرایش می‌گردد اما از اتصال mRNA اولیه به snRNPها جلوگیری نمی‌کند و در نتیجه mRNA های اولیه گلوبین پیرایش نیافته در هسته رتیکولوسیت‌ها باقی مانده و سریعاً تجزیه می‌شوند.

پروتئین Rev ویروس HIV انتقال mRNA های ویروسی پیرایش نیافته را تنظیم می‌کند.

همانطور که قبلاً اشاره شد، انتقال mRNA های حاوی mRNA های بالغ و دارای عملکرد از هسته به سیتوپلاسم مستلزم مکانیسم پیچیده‌ای است که برای بیان ژن ضروری است. (شکل‌های ۲۱-۸، ۲۲-۸، ۲۳-۸). تنظیم این انتقال از لحاظ تئوری نوع دیگری از کنترل ژن (با اینکه این نوع کنترل ، نادراست) می‌باشد. در واقع تنها موارد شناخته شده خروج تنظیم شده mRNA در پاسخ سلولی به شرایط محیطی (مثل شوک



▲ **شکل ۲۳-۸: تشکیل ذرات ناهمگون ریبونوکلئوپروتئینی (hnRNP) و خروج آنها از هسته.** (a) مدل لوپ رونویسی تک کروماتینی و تجمع mRNP حلقه بالبیانی در Chironomous tentans. رونوشت اولیه RNA ایجادشده از DNA الگو سریعاً با پروتئین‌ها تجمع یافته و تشکیل hnRNP را می‌دهد. افزایش تدریجی اندازه hnRNP ها، افزایش طول رونوشت‌های RNA را در فواصل بیشتری از جایگاه شروع رونویسی نشان می‌دهد. این مدل بر اساس میکروگراف‌های پشت سر هم از برش‌های سلول‌های غدد بزاقی لارو است. (b) نمایش شماتیک تولید hnRNP ها. بدنبال پردازش mRNA اولیه، ذرات ریبونوکلئوپروتئینی حاصله mRNP نامیده می‌شود. (c) مدل انتقال mRNP های حلقه بالبیانی از کمپلکس منفذ هسته بر اساس مطالعات میکروسکوپ الکترونی. توجه کنید که mRNP های خمیده هنگام عبور از منفذ خمیدگی خود را از دست می‌دهند. به موازات ورود mRNA به سیتوپلاسم، سریعاً به ریبوزوم‌ها متصل می‌شود که نشان می‌دهد انتهای ′۵ زودتر از منفذ عبور می‌کند.

حرارتی) که باعث دناتوره شدن پروتئین می‌گردند و یا طی عفونت ویروسی هنگامیکه تغییرات ایجاد شده توسط ویروس در نقل و انتقال هسته‌ای، همانندسازی ویروس را به حداکثر می‌رسانند، می‌باشند. در اینجا تنظیم خروج mRNA که توسط پروتئین رمزدهی‌شده توسط ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) تنظیم می‌گردد، توضیح داده می‌شود.

رتروویروس HIV یک نسخه DNA از ژنوم RNAای خود را به داخل ژنوم DNAای سلول میزبان ادغام می‌کند. (شکل ۴۹-۴). DNA وارد شده ویروسی، یا پروویروس، دارای یک واحدرونویسی بوده و به صورت یک رونوشت اولیه توسط RNA پلیمراز II سلولی رونویسی می‌شود. رونوشت HIV می‌تواند به روش‌های متناوبی پیرایش شده و سه گروه مختلف mRNA شامل mRNA پیرایش نیافته ۹ کیلوبازی، mRNA های تقریباً ۴ کیلوبازی که با حذف یک اینترون ایجاد

می‌شوند و mRNA هایی به طول حدود ۲kb که با حذف دو یا چند اینترون ایجاد می‌شود، تولید نماید. (شکل ۲۴-۸). بعد از سنتز این mRNA ها در هسته سلول میزبان، هر سه گروه mRNA مربوط به HIV به سیتوپلاسم منتقل شده و به صورت پروتئین‌های ویروسی ترجمه می‌شوند. بعضی از mRNAهای پیرایش نیافته ۹kb به صورت ژنوم، به ویروس‌های تازه تولیدشده وارد گشته و از سطح سلول جوانه می‌زنند.

چون mRNAهای ۴ و ۹ کیلوبازی در HIV دارای جایگاههای پیرایشی هستند، می‌توان آنها را به عنوان mRNA هایی که به صورت ناقص پیرایش یافته‌اند در نظر گرفت. با وجود این همانطور که قبلاً اشاره شد اتصال چنین mRNA هایی به snRNA ها در اسپلایسوزوم به طور طبیعی خروج آنها را از هسته متوقف می‌کند بنابراین HIV و سایر ویروس‌ها باید یکسری مکانیسم برای فائق آمدن بر این مسأله داشته باشند تا امکان خروج به mRNA های بلند ویروسی را بدهد. بعضی از رتروویروس‌ها یک توالی به نام **عنصر انتقال ساختاری**[1] (CTE) دارند که با تمایل بالا به خارج کننده TAP/Nt1 mRNP متصل شده و بنابراین امکان خروج به RNA های رتروویروسی پیرایش نیافته را می‌دهد. HIV این مساله را با روش دیگری حل کرده است.

مطالعات انجام گرفته با جهش یافته‌های HIV نشان داد mRNA پیرایش نیافته ۹ کیلوبازی و mRNA به طول ۴ کیلوباز که فقط یک بار پیرایش یافته است برای انتقال از هسته به سیتوپلاسم نیازمند پروتئین ویروسی Rev هستند. نتایج آزمایشات بعدی نشان داد Rev به **عنصر پاسخ به Rev**[2] (RRE) ویژه که در RNA ویروس وجود دارد متصل می‌شود. در سلول‌های آلوده شده با HIV جهش یافته فاقد RRE این دو mRNA در هسته باقی می‌مانند. این امر نشان می‌دهد که RRE برای تحریک خروج هسته‌ای به وسیله Rev ضروری است. Rev دارای یک سیگنال خروج از هسته‌ای غنی از لوسین بوده و با ناقل اکسپورتین میانکنش می‌دهد. همانطور که در فصل ۱۳ توضیح داده خواهد شد این امر باعث خروج mRNA های ویروسی پیرایش نیافته و یکبار پیرایش یافته از طریق کمپلکس منفذ هسته‌ای می‌گردد.

نکات کلیدی بخش ۳-۸

انتقال mRNA از پاکت هسته‌ای

■ اغلب mRNA ها بوسیله خارج‌کننده mRNP دوزیرواحدی از هسته خارج می‌شوند. این خارج‌کننده با تکرارهای FG در نوکلئوپورین‌های FG میانکنش می‌دهد (شکل ۲۰-۸ را ملاحظه کنید). جهت انتقال (هسته ← سیتوپلاسم) ممکن است نتیجه پراکنده شدن کمپلکس mRNP -خارج‌کننده در سیتوپلاسم بوسیله فسفریلاسیون پروتئین‌های mRNP با کینازهای سیتوپلاسمی و عملکرد RNA هلیکازهای همراه با رشته‌های سیتوپلاسمی در کمپلکس منفذ هسته‌ای باشد (شکل ۲۰-۸ را ملاحظه کنید).

■ خارج کننده mRNP به صورت متقارن با SR پروتئین‌های متصل به اگزون‌ها و REF مجتمع با کمپلکس‌های تقاطع اگزونی (که بعد از پیرایش mRNA به آنها متصل شوند) و پروتئین‌های mRNP دیگر، به اغلب mRNA ها متصل می‌شوند.

■ mRNA های اولیه متصل به اسپلایسوزوم به طور معمول به بیرون از هسته خارج نمی‌شوند، این امر تضمین می‌کند فقط mRNA های عملکردی و پردازش یافته برای ترجمه به سیتوپلاسم انتقال یابند.

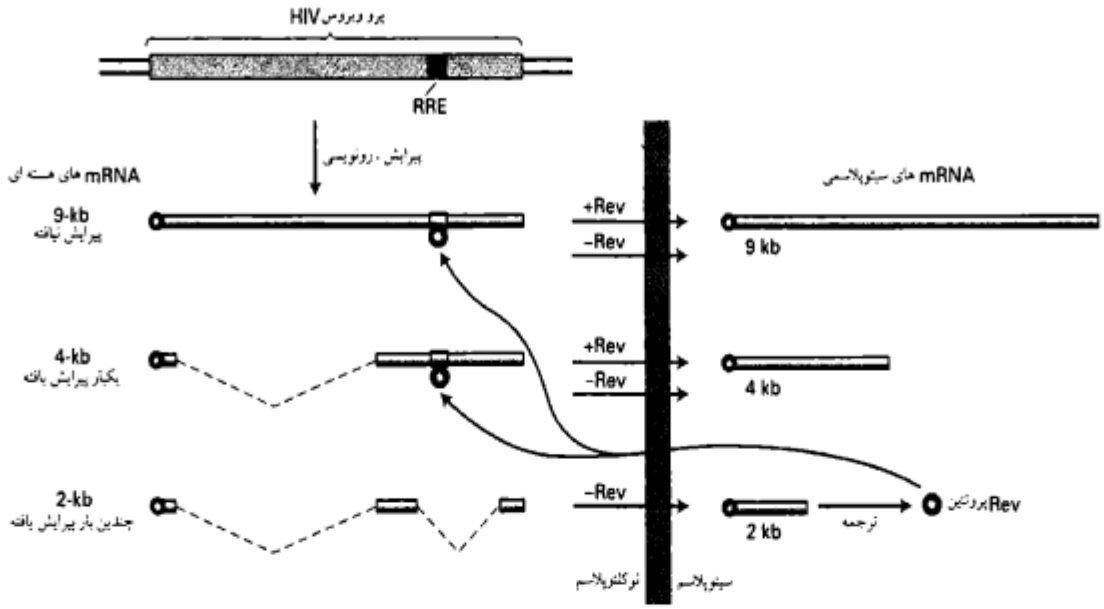
۸-۴ مکانیسم‌های سیتوپلاسمی کنترل بعد از رونویسی

قبل از ادامه بحث، به طور مختصر مراحلی از بیان ژن را که کنترل بر آن‌ها اعمال می‌شود مرور می‌کنیم. در فصل‌های قبلی دیدیم که تنظیم آغاز رونویسی مکانیسم اولیه در کنترل بیان ژن‌هاست. در قسمت‌های قبلی این فصل، آموختیم بیان ایزوفرم‌های مختلف یک پروتئین با تنظیم پیرایش متناوب RNA کنترل می‌شود. گرچه خروج از هسته mRNA های کاملاً پردازش یافته به سیتوپلاسم بندرت تنظیم می‌شود اما از خروج از هسته mRNP هایی که به صورت ناقص و یا نادرست بازآرایی شده‌اند، ممانعت به عمل آمده و چنین رونوشت‌های غیرطبیعی توسط اگزوزوم تجزیه می‌شوند. با این حال، رتروویروس‌هایی مثل HIV مکانیسم‌هایی را دارند که به آن‌ها امکان می‌دهد چنین mRNA های حاوی جایگاههای پیرایش را از هسته خارج نموده و ترجمه نمایند.

در این قسمت به سایر مکانیسم‌های کنترل بعد از رونویسی اشاره خواهد شد که در تنظیم بیان برخی از ژن‌ها دخالت می‌کنند. اکثر این مکانیسم‌ها در سیتوپلاسم عمل کرده و پایداری و قرارگیری mRNA و یا ترجمه آن را به پروتئین کنترل می‌کنند. ما با دو

1- Constituative transport element

2- Rev - response element



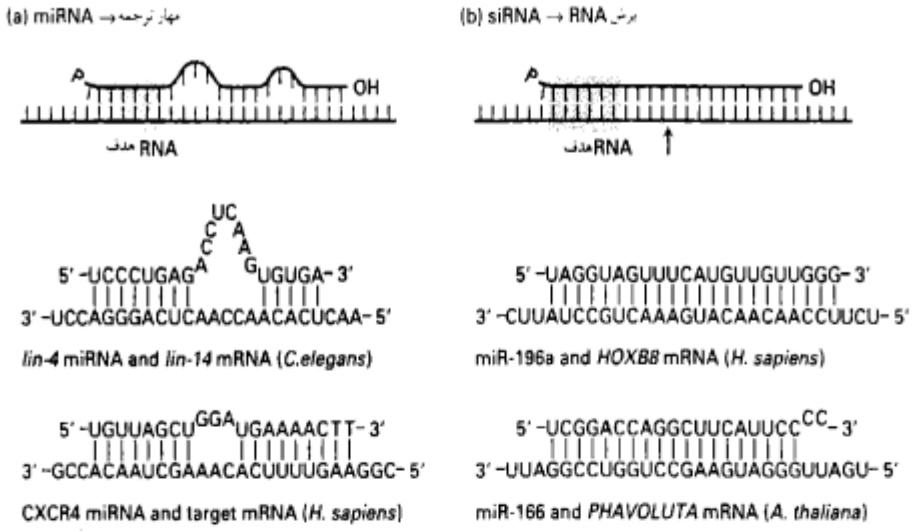
▲ **شکل ۲۴-۸: انتقال mRNA های ویروس HIV از هسته به سیتوپلاسم.** ژنوم HIV دارای چندین ناحیه رمزدهی‌کننده بوده و به صورت رونوشت اولیه ۹کیلوبازی رونویسی می‌شود. چندین mRNA به طول ۴کیلوبازی در نتیجه پیرایش متناوب در یکی از چند اینترون (خطوط نقطه‌چین) و چند mRNA به طول ۲ کیلوباز در اثر پیرایش متناوب دو یا چند اینترون ایجاد شده‌اند. بعد از انتقال به سیتوپلاسم انواع مختلف RNA به پروتئین‌های مختلف ویروسی ترجمه می‌شوند. پروتئین Rev توسط mRNA با طول ۲کیلوباز رمزدهی شده و با عنصر پاسخ به Rev (RRE) در mRNA های پیرایش نیافته و یکبار پیرایش‌یافته میانکنش داده و انتقال آنها را به سیتوپلاسم تحریک می‌کند.

مکانیسم کنترل ژن که اخیراً شناسایی شده و تکنیک جدیدقدرتمندی در دستکاری بیان ژن‌های ویژه برای اهداف آزمایشگاهی و دارویی فراهم نموده‌اند، شروع می‌کنیم. این مکانیسم‌ها توسط RNA های تک‌رشته‌ای کوتاه به طول حدود ۲۱ نوکلئوتید و به نام **میکرو RNA**[1] (mi RNA) و RNA **مداخله‌گر کوتاه**[2] (Si RNA) کنترل می‌شوند. هر دو با mRNA هدف به طور ویژه جفت شده و یا باعث مهار ترجمه (miRNA ها) و یا اینکه باعث تجزیه آن mRNA(siRNA) می‌شود. انسان تقریباً ۱۰۰۰ تا miRNA بیان می‌کند. اکثر این‌ها در سلول‌های ویژه در مراحل خاصی از جنین‌زایی و یا پس از تولد بیان می‌شوند. اغلب miRNA ها بیش از یک نوع mRNA را می‌توانند مورد هدف قرار دهند. در نتیجه این مکانیسم‌های تازه کشف شده بطور چشمگیری در تنظیم بیان ژن شرکت می‌کنند. siRNA در فرآیندی که تداخل RNA نامیده می‌شود شرکت می‌کنند و در دفاع سلولی علیه عفونت ویروسی و جابجایی توسط ترانسپوزون‌ها نیز دخالت دارند.

میکرو RNA ها ترجمه mRNA های ویژه‌ای را مهار می‌کنند

میکرو RNA ها (miRNA) اولین بار در نماتودا کرم حلقوی الگانس که در ژن‌های let-7 و lin-4 جهش یافته بودند، شناسایی شدند. این ژن‌ها تکامل موجود زنده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. کلونینگ و آنالیز نوع طبیعی ژن‌های let-7 و lin-4 نشان داد که آنها هیچ فرآورده پروتئینی را رمزدهی نمی‌کنند بلکه به جای آن RNA هایی به طول ۲۱ و ۲۲ نوکلئوتید ایجاد می‌کنند. RNA ها با نواحی غیرقابل ترجمه انتهای ′۳ mRNA های هدف هیبرید تشکیل می‌دهند، به عنوان مثال lin4-miRNA که در اوایل مراحل جنین‌زایی بیان می‌شود با نواحی غیر قابل ترجمه انتهای ′۳، در هر دو mRNA مربوط به lin4 و lin28 در سیتوپلاسم هیبرید شده و ترجمه آن‌ها را با مکانیسمی که بعداً اشاره خواهد شد، مهار می‌کند. بیان lin4-miRNA در مراحل بعدی تکوین مهار می‌شود و امکان ترجمه mRNA های تازه سنتز شده مربوط به lin14 و lin28 را در آن هنگام می‌دهد. بیان let-7 miRNA در زمانهای

1- Micro RNA 2- Short interfering RNA



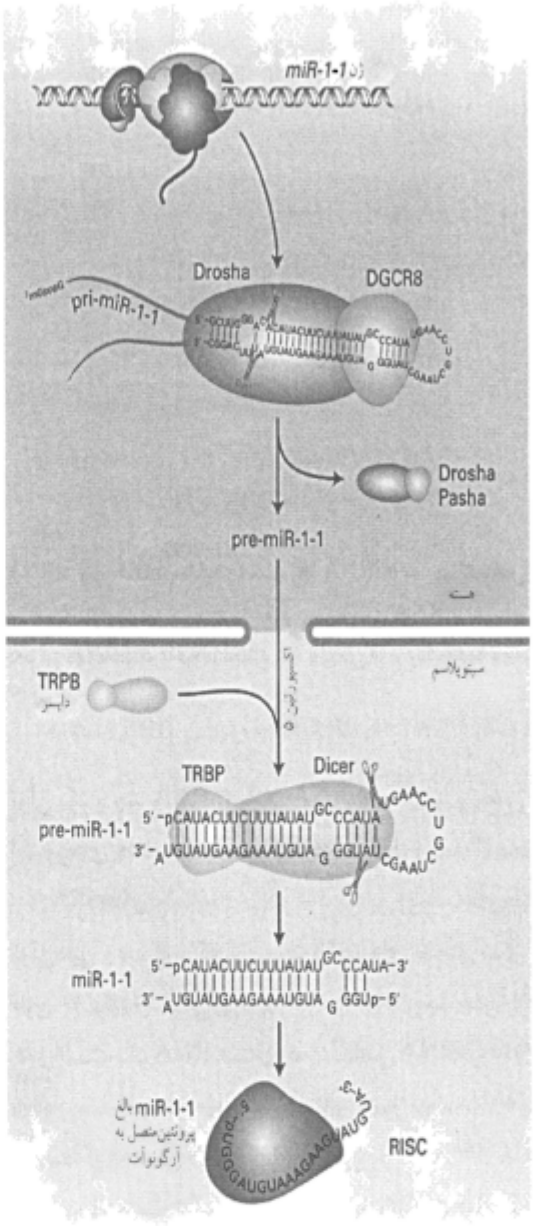
▲ **شکل ۲۵-۸ (شکل رنگی) جفت‌شدن بازها با RNAهای هدف بین siRNA و miRNA متفاوت است.** miRNA (a) به صورت ناقص با mRNAهای هدف هیبرید شده و ترجمه mRNA را مهار می‌کند. نوکلئوتیدهای ۲ تا ۷ (با رنگ آبی مشخص شده) برای شناسایی mRNA اختصاصی بسیار ضروری است. siRNA (b) بطور کامل با mRNA هدف جفت شده و باعث برش mRNA در ناحیه مشخص شده با پیکان قرمز رنگ گشته و باعث تجزیه سریع آن می‌شود.

مشابه در طی جنین‌زایی همه جانوران با دو پهلوی متقارن صورت می‌گیرد. نقش miRNAهای، lin4 و let-7 در هماهنگ نمودن‌زمان رویدادهای مراحل اولیه تکامل در کرم حلقوی الگانس بوده و در فصل ۲۲ توضیح داده می‌شود. در اینجا بر روی نحوه مهار ترجمه توسط miRNA متمرکز می‌شویم.

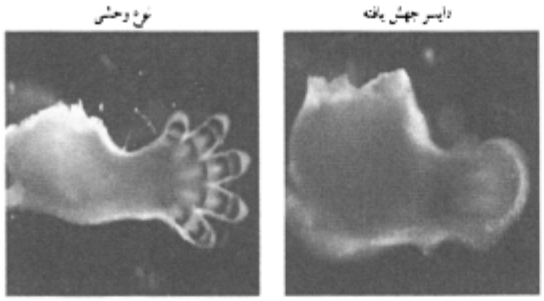
تنظیم ترجمه توسط miRNA در همه گیاهان چندسلولی و جانوران متداول است .در چند سال گذشته، RNAهای کوچک به طول ۲۶-۲۰ نوکلئوتیدی از انواع مختلفی از بافت‌های موجودات چندسلولی آزمایشگاهی مدل جدا، کلون و تعیین توالی شده‌اند. برآوردهای اخیر نشان می‌دهد که بیان $\frac{1}{3}$ کل ژن‌های انسانی توسط، ۱۰۰۰ miRNA انسانی که از بافتهای مختلف جدا شده‌اند تنظیم می‌شود. احتمال تنظیم ترجمه چندین mRNA توسط یک miRNA بسیار زیاد است زیرا لزومی ندارد جفت شدن باز بین miRNA و توالی موجود در انتهاهای ′۳ mRNA آنها، کامل باشد (شکل ۲۵-۸). در حقیقت، آزمایشاتی که با miRNA سنتزی انجام شد نشان داد مکمل شدن بین شش یا هفت نوکلئوتید انتهای ′۵ یک miRNA با نواحی ′۳ غیرقابل ترجمه mRNA هدف برای انتخاب mRNA هدف ضروری است.

اکثر miRNAها از رونوشت‌هایی به طول چند صد تا هزار نوکلئوتید حاصل از RNA پلیمراز II به نام pri-miRNA پردازش می‌یابند (شکل ۲۶-۸). pri-miRNA می‌تواند حاوی توالی یک یا چند miRNA باشد. miRNA همچنین از بعضی از اینترون‌های جداشده و همینطور از نواحی غیرقابل ترجمه ′۳ بعضی از mRNAهای اولیه ایجاد می‌شوند. درون این رونوشت‌های بلند، توالی‌هایی وجود دارند که به صورت ساختارهای سنجاق سری با طول ۷۰ نوکلئوتید تا می‌خورند که در ناحیه ساقه جفت شدن بازها کامل نیست. یک RNA هسته‌ای که اختصاصی RNA دورشته‌ای به نام دروشا[1] و همراه با پروتئین هسته‌ای متصل شونده به RNA دو رشته که در انسان DGCR8 (و در دروزوفیلا Pasha) نامیده می‌شود، ناحیه سنجاق سری برآمده را در RNA پیش‌ساز طویل بریده و miRNA اولیه را ایجاد می‌کند. miRNA اولیه توسط ناقل ویژه هسته‌ای (اکسپورتین ۵) شناسایی شده و به آن متصل می‌شود. اکسپورتین ۵ با دُمین FG نوکلئوپورین واکنش داده و امکان می‌دهد کمپلکس از طریق کانال داخلی در کمپلکس منفذ هسته‌ای انتشار یابد (شکل ۲۰-۸). به محض ورود به سیتوپلاسم، یک RNase سیتوپلاسمی ویژه RNA دورشته‌ای بنام دایسر[2] همراه با پروتئین سیتوپلاسمی متصل‌شونده به RNA دورشته‌ای که در انسان TRBP[3] نامیده می‌شود (در مگس سرکه لوکوسیوس[4]) بر روی miRNA اولیه پردازش‌های بعدی را انجام می‌دهند تا

1- Drosha
2- Dicer
3- Tar binding protein
4- Loquocious



▲ **شکل ۲۶-۸ پردازش miRNA.** این شکل رونویسی پردازش miR1-1MRNA را نشان می‌دهد. رونوشت اولیه miRNA توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شود. اندوریبونوکلئاز هسته‌ای ویژه RNA دورشته‌ای، دروشا، با مشارکت پروتئین متصل‌شونده به RNA دورشته‌ای‌اش یعنی DGCR81 (pasha در مگس سرکه) برش‌های اولیه را در pri-miRNA ایجاد نموده و یک miRNA اولیه با ۷۰ نوکلئوتید را ایجاد می‌کند. این miRNA اوّلیه توسط اکسپورتین ۵ (ناقل هسته‌ای) به سیتوپلاسم منتقل می‌شود، در سیتوپلاسم miRNA اولیه مورد پردازش دیگری قرار گرفته و توسط دایسر به miRNA دورشته‌ای با دو باز جفت نشده در دو انتهای ′۳ تبدیل می‌شود و به صورت کونژوگه با TRBP، پروتئین متصل شونده به DSRNA (loquatious در مگس سرکه) درمی‌آید. در نهایت یکی از دو رشته به یک کمپلکس ریسک وارد شده و در آنجا توسط پروتئین به یک آرگوناوت متصل می‌شود.



▲ **شکل ۲۷-۸ نقش miRNA در تکوین دست.** میکروگراف‌ها مقایسه‌ای بین دست طبیعی (چپ) و دست جنینی که ژنی دایسرش حذف شده است (راست). این میکروگراف‌ها مربوط به جنین‌های ۱۳ روزه موش بوده و توسط آنتی بادی پروتئین Gd5 رنگ‌آمیزی شده‌اند. پروتئین Gd5 یک پروتئین مارکر در تشکیل اتصالات است. با دایسردر جنین‌های موش در حال تکوین با بیان شرطی Cre جهت القا حذف ژن دایسر، در این سلول‌ها حذف می‌شود.

miRNA دورشته‌ای ایجاد شود. miRNA دورشته‌ای تقریباً به اندازه دو دور از مارپیچ RNA در فرم A طول داشته و هر رشته آن‌دارای ۲۳-۲۱ نوکلئوتید بوده و دو نوکلئوتید در هر انتهای ′۳ جفت نشده‌اند. نهایتاً یکی از دو رشته انتخاب می‌شود تا **کمپلکس خاموش‌کننده توسط RNA** RISC [1] (ریسک) ایجاد گردد. این کمپلکس شامل miRNA بالغ متصل به پروتئین چند دمینی آرگوناوت [2] است. این پروتئین عضو خانواده پروتئینی با یک توالی حفاظت شده مشخص است. چندین پروتئین آرگوناوت در بعضی از موجودات به ویژه در گیاهان بیان می‌شوند و در کمپلکس‌های ریسک دیگر عملکردهای متفاوتی دارند.

کمپلکس miRNA ریسک از طریق جفت شدن بازها بین miRNA بالغ متصل به آرگوناوت و نواحی مکملی آن در ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ (′۳-UTR) mRNA هدف به mRNP متصل می‌شوند (شکل ۲۵-۸). مهار ترجمه mRNA هدف مستلزم اتصال دو یا چند کمپلکس ریسک در نواحی مکمل جداگانه بر روی ناحیه ′۳-UTR مربوط به mRNA هدف است. پیشنهاد شده که ممکن است این امکان وجود داشته باشد که تنظیم ترکیبی ترجمه mRNA با تنظیم جداگانه رونویسی دو یا چند pri-miRNA مختلف صورت گیرد و باعث پردازش صورت miRNA هایی شود که بصورت ترکیبی برای مهار ترجمه mRNA هدف مورد نیاز می‌باشند.

1- RNA - induced silencing complex (RISC)

2- Argonaute

اتصال چندین کمپلکس ریسک به یک mRNA، آغاز رونویسی را با مکانیسمی که اخیراً بررسی شده است مهار می‌کند. مطالعات اخیر نشان داد که اتصال کمپلکس RISC باعث می‌شود که mRNPهای متصل به دُمین‌های سیتوپلاسمی متراکم به نام اجسام پردازش‌کننده RNA سیتوپلاسمی[1] یا به طور ساده **اجسام P**[2] مجتمع گردند. اجسام P که در زیر با جزئیات بیشتری توضیح داده خواهند شد، جایگاه تجزیه RNA بوده و ریبوزوم و فاکتورهای ترجمه نداشته و قویاً ترجمه را مهار می‌کنند. الحاق با اجسام P همچنین نشان می‌دهد که چرا بیان یک miRNA پایداری mRNA مورد نظر را اغلب کاهش می‌دهد.

همانطور که قبلاً اشاره شد، تقریباً ۱۰۰۰ miRNA مختلف انسانی دیده شده و بسیاری از آنها فقط در انواع ویژه سلولی بیان می‌شوند. شناسایی عمل این miRNAها اخیراً بخش وسیعی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است.

مثلاً یک miRNA ویژه به نام miR-133 در هنگام تمایز میوبلاست‌ها به سلول‌های ماهیچه‌ای القا می‌شود. miR-133 ترجمه PTB را مهار می‌کند. PTB یک فاکتور تنظیمی در پیرایش بوده و نقشی مشابه Sxl مگس سرکه دارد. این پروتئین به جایگاه پیرایشی '۳ در mRNA اولیه بسیاری از ژن‌ها متصل شده و منجر به نادیده گرفته شدن اگزون و یا استفاده از جایگاههای پیرایش متناوب '۳ می‌شود. هنگامیکه miR-133 در میوبلاست‌های در حال تمایز بیان می‌شود غلظت PTB بدون اینکه تغییر چشمگیری در غلظت

mRNA مربوط به PTB صورت گیرد، کاهش می‌یابد. در نتیجه ایزوفرم‌های متناوب چندین پروتئین مهم برای عملکرد سلول ماهیچه‌ای در سلول‌های تمایزیافته بیان می‌شوند.

موارد دیگر تنظیم miRNA در موجودات مختلف به سرعت شناسایی شده‌اند. حذف کامل ژن دایسر تولید miRNA را در پستانداران کاهش می‌دهد. این امر باعث مرگ جنین در مراحل ابتدای تکوین می‌شود. با این حال زمانی که دایسر فقط در جوانه انگشتان حذف می‌شود تأثیر miRNA را در تکوین انگشتان اضافی می‌توان مشاهده کرد(شکل ۲۷-۸). گرچه همه سلول‌های اصلی تمایزیافته و نمای کلی انگشتان حفظ شده اما تکوین غیرطبیعی است و این امر نشان‌دهنده اهمیت miRNA در تنظیم سطح مناسبی از ترجمه mRNAهای مختلف است. از بین ۱۰۰۰ تا miRNA انسانی، ۵۳ تا به نظر می‌رسد که منحصر به نخستی‌ها می‌باشند و احتمالاً miRNAهای جدید در طی تکامل در اثر مضاعف شدن ژن‌های miRNA اولیه و سپس جهش بازهای رمزدهی‌کننده miRNA بالغ ایجاد می‌شوند. miRNAها به ویژه در گیاهان فراوان بوده و بیش از ۱/۵ میلیون miRNA مختلف در *Arabidopsis thaliana* شناسایی شده است.

RNA مداخله‌گر باعث تجزیه mRNA های کاملاً مکمل با خود می‌شود.

RNA **مداخله‌گر** (RNAi) به صورت غیرمنتظره در حین انجام دستکاریهای بیان ژن کشف شده است. محققین سعی کردند بیان ژنی را در کرم حلقوی الگانس با ریز تزریق[3] یک RNA تک‌رشته‌ای مکمل با RNA مهار نمایند، این RNA مکمل با mRNA رمزدهی شده هیبرید گشته و ترجمه آن را مهار می‌کند. این روش مهار آنتی‌سنس[4] نامیده می‌شود. اما در آزمایشات کنترل، RNAهای دورشته‌ای کاملاً جفت شده، با چند صد جفت باز، جهت مهار بیان ژن بسیار کارآمدتر از آنتی سنس تک‌رشته‌ای به تنهایی بودند. مهار مشابهی از بیان ژن‌ها بوسیله RNA دو رشته‌ای در گیاهان مشاهده شده است. در هر مورد، RNA دو رشته‌ایکه باعث تجزیه همه RNAهای سلولی می‌شود، حاوی توالی دقیقاً مشابه با یکی از رشته‌های RNA دورشته‌ای است. بدلیل اختصاصی بودن RNA مداخله‌گر در هدف قراردادن mRNAها جهت تخریب، RNAi یک ابزار قدرتمند آزمایشگاهی در مطالعه عملکرد ژن‌هاست.

مطالعات بیوشیمیایی بعدی صورت گرفته با عصاره جنین دروزوفیلا نشان داد یک RNA دورشته‌ای بلند که حداوسط RNA مداخله‌گر است، ابتدا به صورت RNA دورشته‌ای کوچک مداخله‌گر (siRNA) پردازش می‌یابد. رشته‌های siRNA حاوی ۲۳-۲۱ نوکلئوتید با یکدیگر هیبرید تشکیل می‌دهند به طوریکه دو باز انتهای '۳ هر دو رشته به صورت تک‌رشته باقی می‌مانند. مطالعات بیشتر نشان داد، ریبونوکلئاز سیتوپلاسمی ویژه RNA دورشته‌ای که RNAهای دورشته‌ای بلند را به صورت siRNA درمی‌آورد همان آنزیم دایسری است که در پردازش miRNAهای اولیه بعد از خارج شدن از هسته و ورود به سیتوپلاسم نقش دارد. در هر دو مورد RNA تک رشته‌ای بالغ و کوتاه یعنی siRNA بالغ و هم miRNA بالغ بصورت دو کمپلکس ریسک تجمع می‌یابند که در آن RNAهای

1- Cytoplasmic RNA - processing bodies
2- P bodies
3- Microinjection
4- Antesence inhibition

کوتاه به یک پروتئین آرگوناوت متصل می‌شوند. وجه تمایز یک کمپلکس ریسک حاوی siRNA از یک کمپلکس ریسک حاوی miRNA اینست که siRNA منحصراً با RNA هدف خود جفت می‌شود و باعث القا برش در آن می‌گردد در حالیکه کمپلکس حاوی miRNA، mRNA هدف خود را از طریق جفت شدن ناقص تشخیص داده و منجر به مهار ترجمه می‌شود.

به نظر می‌رسد پروتئین آرگوناوت مسئول برش در mRNA هدف باشد. یک دمین پروتئین آرگوناوت همولوگ و مشابه آنزیم RNase H بوده و RNA موجود در هیبرید RNA-DNA را تجزیه می‌کند (شکل ۱۴-۶). زمانیکه انتهای ′۵ مربوط به RNA کوتاه یک کمپلکس ریسک به صورت دقیق با mRNA مورد نظر به فاصله یک دور از مارپیچ RNA (۱۲-۱۰ نوکلئوئید) جفت می‌شود، دمین آرگوناوت پیوند فسفودی استر RNA هدف را در بین نوکلئوتیدهای ۱۰ و ۱۱ از siRNA می‌برد. RNA های بریده شده، آزاد شده و بلافاصله توسط اگزوزوم سیتوپلاسمی و ′۵- ریبونوکلئاز تجزیه می‌شوند. اگر جفت شدن بازها کاملاً دقیق نباشد دمین آرگوناوت نمی‌تواند mRNA هدف را بریده و یا رها نماید. در عوض اگر چندین کمپلکس ریسک miRNA به mRNA هدف متصل شوند، ترجمه آن مهار می‌شود و mRNA با اجسام P تجمع یافته و در آنجا همانطور که قبلاً اشاره شد احتمالاً با یک مکانیسم متفاوت و ملایم‌تری نسبت به مسیر تجزیه‌ای که با برش ریسک در RNA هدف مکمل شروع می‌شود، صورت می‌گیرد.

هنگامیکه RNA دورشته‌ای بداخل سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی وارد گردید، این RNA وارد مسیر تجمعی siRNA در کمپلکس ریسک می‌شود زیرا توسط آنزیم سیتوپلاسمی دایسر و پروتئین متصل شونده به RNA دورشته‌ای، یعنی TRBP که miRNA اولیه را پردازش می‌کند، شناسایی می‌شود. عقیده بر این است که فرآیند RNA مداخله‌گر یک دفاع سلولی باستانی در برابر انواع ویروس‌های خاص و عناصر ژنتیکی متحرک در گیاهان و جانوران باشد. گیاهانی که در ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین‌های ریسک و دایسر جهش‌یافته‌اند، حساسیت بیشتری نسبت به عفونت با ویروس‌های RNA دار و همچنین افزایش جابجایی **ترانسپوزون‌ها** در ژنوم‌شان دارند. RNA دورشته‌ای حد واسط در طی همانندسازی ویروس‌های RNA دار به وجود آمده و توسط ریبونوکلئاز دایسر شناسایی شده و پاسخ RNAi را القا می‌کند که سرانجام این امر باعث تجزیه mRNA های ویروسی می‌شود. در طی جابجایی، ترانسپوزون‌ها با جهت‌گیری‌های تصادفی بداخل ژن‌های سلولی وارد شده و رونویسی آنها از پروموترهای مختلف، باعث تولید RNA های مکملی می‌شود که می‌توانند با یکدیگر هیبرید تشکیل دهند و سیستم RNAi را ایجاد نمایند. این سیستم با بیان پروتئین‌های ترانسپوزون مورد نیاز برای جابجایی‌های دیگری، تداخل ایجاد می‌کند.

در گیاهان و کرم حلقوی الگانس پاسخ RNAi را می‌توان در همه سلول‌های موجود زنده با وارد کردن یک RNA دورشته‌ای به درون تعداد اندکی از سلول‌ها القا کرد. چنین القایی در موجود زنده نیازمند تولید یک پروتئین هومولوگ با RNA ریلیکاز در ویروس‌های RNA دار است. این یافته‌ها بیان می‌کند، siRNA های دورشته‌ای، همانندسازی شده و به درون سایر سلول‌های این موجود منتقل می‌شود. در گیاهان انتقال siRNA احتمالاً از طریق **پلاسمودسماتا**[1] صورت می‌گیرد. پلاسمودسماتا اتصال سیتوپلاسمی بین سلول‌های گیاهی بوده و از دیواره‌های بین آنها عبور می‌کند. القای RNA مداخله‌گر در موجود زنده در دروزوفیلا یا پستانداران صورت نمی‌گیرد زیرا ژنوم این موجودات، پروتئین همولوگ با RNA ریلیکاز را رمزدهی نمی‌کند.

در سلول‌های پستانداران ورود مولکول‌های دوگانه و طویل RNA-RNA به درون سیتوپلاسم از طریق مسیر PKR، منجر به مهار کلی سنتز پروتئین می‌شود. همین امر کاربرد RNA های دورشته‌ای بلند را به منظور القای آزمایشی پاسخ RNAi بر علیه یک mRNA ویژه را به شدت محدود می‌کند. خوشبختانه محققین کشف کردند، رشته‌های siRNA دورشته‌ای به طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید که دارای دو باز به صورت تک‌رشته در دو انتهای ′۳ است باعث ایجاد کمپلکس ریسک RNA بالغ بدون القای مهار عمومی سنتز پروتئین می‌شود. این به محققین امکان می‌دهد siRNA های دورشته‌ای سنتزی را برای بیان ژن‌های ویژه در سلول‌های انسانی و نیز در سایر پستانداران به کار برند. این روش **خاموش کردن siRNA**[2] نامیده می‌شود و امروزه به طور گسترده در مطالعه فرآیندهای مختلف مثل مسیر RNAi به کار برده می‌شود.

مهار رونویسی RNAi. در گیاهان و مخمر اسکیزوساکارومایسیس پمبه ، RNA دورشته‌ای نیز باعث القای تشکیل هتروکروماتین بر روی ژن‌های با توالی مشابه با RNA دورشته‌ای می‌گردد و رونویسی آنها را مهار می‌کند. پروتئین‌های

1- Plasmidesmata 2- siRNA knockdown

هسته‌ای همولوگ با پروتئین‌های سیتوپلاسمی آرگوناوت و دایسر، کمپلکس siRNA هسته‌ای را تشکیل می‌دهند. این کمپلکس پروتئین‌های متفاوت از پروتئین‌های کمپلکس ریبسک سیتوپلاسمی دارند. عقیده بر این است، کمپلکس siRNA هسته‌ای ژن‌های ویژه‌ای را از طریق جفت‌شدن با mRNA های اولیه نوظهور در طی رونویسی آنها مورد هدف قرار می‌دهد. این میانکنش باعث القای متیلاسیون هیستون H_3 در لیزین شماره ۹ شده و جایگاه اتصال برای پروتئین HP1 ایجاد کرده و سپس، تجمع هتروکروماتین صورت می‌گیرد. در گیاهان DNA در این نواحی هتروکروماتینی، متیله شده و در تشکیل هتروکروماتین شرکت می‌کند. اجزای تشکیل‌دهنده سیستم RNAi همچنین در تشکیل هتروکروماتین سانترومر و عمل صحیح سانترومرها در اسکیزوساکارومایسیس پمبه، گیاهان و سلول‌های جانوری کشت داده شده دخالت می‌کنند. سانترومرها در اکثر موجودات حاوی توالی بسیار تکرارپذیر DNA هستند. در نتیجه سیستم RNAi که باعث هتروکروماتینه شدن ژن‌های تکراری در گیاهان و اسکیزوساکارومایسیس پمبه می‌شود احتمالاً بطور معمول توسط اکثر یوکاریوت‌ها برای تشکیل صحیح کمپلکس پروتئین - DNA کینه‌توکور در سانترومر مورد استفاده قرار گرفته و برای تقسیم سلولی ضروری است.

پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی باعث ترجمه بعضی از mRNA ها می‌شود

علاوه بر مهار ترجمه توسط miRNA ها، سایر کنترل‌های ترجمه‌ای که توسط پروتئین‌ها انجام می‌گیرد به تنظیم بیان برخی از ژن‌ها کمک می‌کند. توالی‌ها یا عناصر تنظیمی در mRNA ها که به منظور کنترل ترجمه با پروتئین‌های ویژه میانکنش می‌دهند، عموماً در ناحیه غیرقابل ترجمه (UTR) در انتهای ′۳ یا ′۵ mRNA قرار دارند. در اینجا نوعی از کنترل ترجمه به واسطه پروتئین را توضیح می‌دهیم که عناصر تنظیمی ناحیه ′۳ در آن درگیرند. مکانیسم دیگری که پروتئین متصل شونده به RNA با عنصر تنظیمی ′۵ واکنش می‌دهد، بعداً توضیح داده می‌شود.

ترجمه mRNA بسیاری از یوکاریوت‌ها بوسیله پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA در توالی ویژه صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها به صورت متعاون به کنار جایگاه غیرقابل ترجمه در ′۳ متصل می‌شوند. این اتصال متعاون به آنها امکان می‌دهد مشابه با اتصال متعاون فاکتورهای رونویسی به جایگاه‌های تنظیمی در یک ناحیه تشدیدکننده یا پروموتر، متصل شوند. در بیشتر موارد مطالعه شده، ترجمه با اتصال پروتئین به عنصر تنظیمی ناحیه ′۳ مهار می‌شود و تنظیم در نتیجه برداشته شدن مهار در زمان یا مکان مناسب در یک سلول و یا جنین در حال تکوین می‌باشد. مکانیسم این مهار در mRNA هایی که قبل از ترجمه در سیتوپلاسم پلی‌آدنیله می‌شوند، بخوبی شناخته شده است.

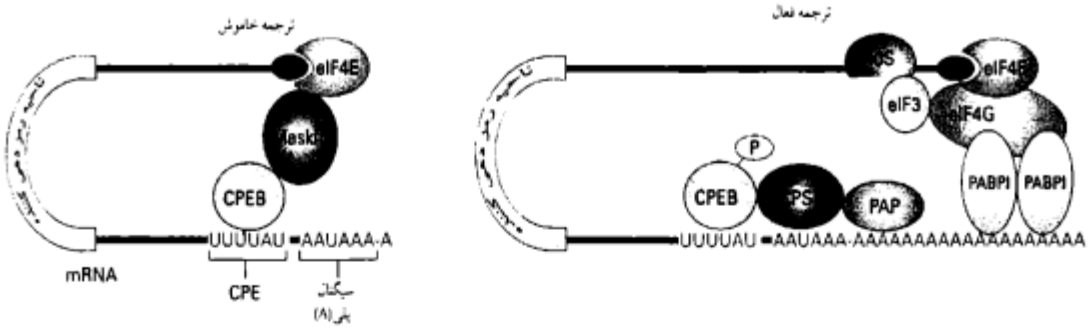
پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی مرحله اساسی از بیان ژن در مراحل اولیه جنینی جانوران است. در سلول‌های تخم (اووسیت) جانوران چندسلولی mRNA های زیادی وجود دارد که پروتئین‌های مختلفی را رمزدهی می‌کنند و تا هنگامیکه سلول تخم با سلول اسپرم لقاح نیافته باشد، ترجمه نمی‌شوند. بعضی از این mRNA های «ذخیره‌شده» دارای یک دم پلی (A) کوتاه بوده و حدود ۴۰-۲۰ واحد آدنینی دارند که فقط تعداد اندکی از مولکول‌های پروتئینی سیتوپلاسمی متصل شونده به پلی (A) می‌توانند به آن اتصال یابند. همانطور که در فصل ۴ گفته شد، چندین مولکول PABI به دم بلند پلی (A) یک mRNA متصل شده و با فاکتور آغازین eIF4G میانکنش داده بنابراین میانکنش کلاهک ′۵ را با فاکتور eIF4G پایدار می‌کنند. این واکنش برای آغاز ترجمه لازم است (شکل b ۲۸-۴). چون این پایدار شدن با mRNA هایی با دم پلی (A) کوتاه نمی‌تواند صورت گیرد بنابراین چنین mRNA های ذخیره‌ای اووسیت‌ها به صورت کارآمد ترجمه نمی‌شوند. در زمان مناسب طی بلوغ اووسیت یا بعد از لقاح سلول تخم معمولاً در پاسخ به پیام‌های خارجی، حدود ۱۵۰ واحد آدنینی به دم کوتاه پلی (A) این mRNA های سیتوپلاسمی افزوده شده و باعث تحریک ترجمه آنها می‌شود.

مطالعات اخیر که با mRNA های ذخیره‌ای اووسیت زنوپوس انجام گرفت به شناسایی این نوع کنترل ترجمه کمک کرد. در آزمایشی mRNA هایی با دم کوتاه به درون اووسیت‌ها تزریق و مشخص شد که دو توالی درناحیه UTR به آنها جهت پلی‌آدنیلاسیون در سیتوپلاسم لازم است: یکی سیگنال AAVAAA poly(A) که برای پلی‌آدنیلاسیون mRNA اولیه در داخل هسته نیز مورد نیاز است و دیگر یک یا چند نسخه از **عنصر پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی**[1] (CPE) که غنی از U است. این عنصر تنظیمی به **پروتئین متصل شونده به CPE**[2] (CPEB) که بشدت حفظ شده است متصل می‌شود. این پروتئین دارای یک دمین RRM و یک دمین انگشت - روی است.

بر اساس مدل حاضر، در غیاب سیگنال تحریکی، CPEB

1- Cytoplasmic polgadenylation element

2- CPE - binding protein



▲ **شکل ۲۸-۸ مدل کنترل پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی و آغاز ترجمه.** (چپ) در اووسیت نابالغ mRNA دارای یک ناحیه غنی از U بنام عنصر پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی (CPE) بوده و دارای دم کوتاه پلی (A) می‌باشد. پروتئین متصل‌شونده به CPE (CPEB) مهار ترجمه را از طریق ممانعت از تجمع کمپلکس آغاز ترجمه در انتهای ′۵ mRNA میانجیگری می‌کند. (راست) تحریک هورمونی اووسیت پروتئین کینازی را که CPEB را فسفریله می‌کند، فعال کرده و باعث رهاسازی ماسکین می‌شود. فاکتور CPSE به جایگاه پلی (A) متصل شده و با CPEB و پلی A پلیمراز سیتوپلاسمی (PAP) میانکنش می‌دهد. بعد از طویل شدن دم پلی A، نسخه‌های متعددی از پروتئین متصل شونده به دم پلی A (PABPI) می‌توانند به آن متصل شده و با eIF4G میانکنش دهند. eIF4G می‌تواند با سایر فاکتورهای آغازین به زیرواحد ۴۰s متصل شده و ترجمه را آغاز نماید.

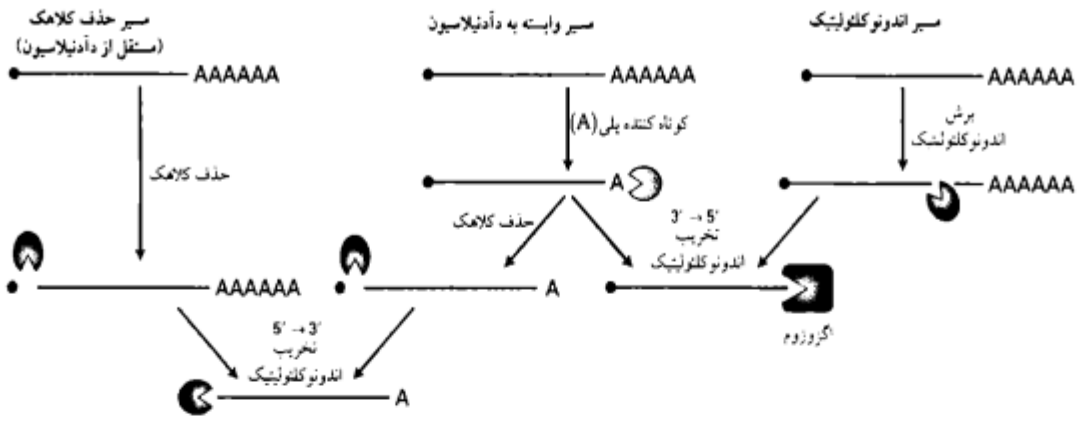
متصل به CPE غنی از U با پروتئین ماسکین [1] میانکنش می‌دهد (ماسکین در طرف دیگر به فاکتور eIF4E متصل به کلاهک ′۵ mRNA متصل می‌شود)(شکل چپ ۲۷-۸). در نتیجه eIF4E نمی‌تواند با سایر فاکتورهای آغازین و زیرواحد ۴۰s ریبوزومی میانکنش داده و بنابراین آغاز ترجمه متوقف می‌شود. در طی بلوغ‌اووسیت یک سرین ویژه در CPEB فسفریله شده و باعث جدایی ماسکین از کمپلکس می‌گردد. این امر امکان می‌دهد تا فاکتور سیتوپلاسمی ویژه برش و پلی‌آدنیلاسیون (CPSE) و آنزیم پلی (A) پلیمراز به صورت متعاون با CPEB به mRNA متصل شوند. به محض افزوده شدن رزیدوهای آدنین توسط پلی (A) پلیمراز، PABPI می‌تواند به دم پلی (A) طویل شده متصل گشته و منجر به پایداری میانکنش فاکتورهای دخیل در آغاز ترجمه گردد (شکل ۲۸-۸، راست. همچنین شکل ۲۸-۴، را نیز ملاحظه کنید). در مثال بلوغ اووسیت زنوپوس پروتئین کینازی که CPEB را فسفریله می‌کند در پاسخ به هورمون پروژسترون فعال می‌شود. بنابراین زمان ترجمه mRNA های ذخیره‌ای رمزدهی‌کننده پروتئین‌های مورد نیاز برای بلوغ اووسیت با این پیام خارجی تنظیم می‌شود.

شواهد قابل توجهی نشان می‌دهد، که مکانیسم مشابهی از کنترل ترجمه در یادگیری و حافظه نقش دارد. در سیستم عصبی مرکزی، اکسونهای یک هزار نورون و یا بیشتر می‌توانند از طریق دندریت‌های یک نورون مجزای پس سیناپسی با یکدیگر ارتباط (سیناپس) داشته باشند (شکل ۲۳-۲۳). هنگامیکه یکی از اکسونها تحریک می‌شود نورون پس‌سیناپسی به یاد می‌سپارد که کدامیک از این هزاران سیناپس تحریک شده است. در دفعه بعد که سیناپس تحریک شود، قدرت پاسخ ایجاد شده در سلول پس‌سیناپسی متفاوت از مرحله اول خواهد بود. این تغییرات در پاسخ تا حد زیادی در نتیجه فعال شدن ترجمه mRNA های ذخیره‌ای در این ناحیه از سیناپس است که منجر به سنتز موضعی پروتئین‌های جدید شده و اندازه سیناپس را افزایش داده و همینطور خصوصیات نوروفیزیولوژی سیناپس را تغییر می‌دهند. کشف وجود CPEP در دندریت‌های نورونی باعث شد این نظریه به وجود آید که پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی ترجمه mRNA های ویژه را در دندریت مثل حالتی که در اووسیت دیده شد، تحریک می‌کند. احتمالاً در این مورد، فعالیت سیناپسی (به جای یک هورمون) سیگنال القاء کننده فسفریلاسیون CPEB بوده و در نتیجه باعث فعال شدن ترجمه می‌گردد.

تجزیه mRNA ها در سیتوپلاسم با چندین مکانیسم صورت می‌گیرد

غلظت mRNA تابع سرعت سنتز و سرعت تجزیه آن است. به همین دلیل اگر دو ژن با سرعت یکسانی رونویسی شوند غلظت حالت پایای mRNA مربوط به ژنی که پایدارتر است نسبت به دیگر بیشتر خواهد بود. پایداری یک mRNA همچنین مشخص می‌کند که چگونه سنتز سریع پروتئین‌های رمزدهی‌شده را می‌توان خاموش کرد. در mRNA پایدار، سنتز پروتئین رمزدهی‌شده مدت زیادی بعد

1- Maskin



▲ **شکل ۲۹-۸ مسیرهای تجزیه mRNA های یوکاریوتی در مسیر وابسته به آدنیلاسیون.** (وسط)، دم پلی A به آرامی توسط آدنیلاز بریده می‌شود تا زمانیکه طولش به ۲۰ رزیدوی آدنینی و یا کمتر برسد. در این حالت میانکنش دم پلی با PABP1 ناپایدار شده و منجر به تضعیف میانکنش بین کلاهک ′۵ و فاکتورهای آغاز ترجمه می‌شود. سپس mRNA های دآدنیله‌شده (۱) ممکنست کلاهک‌شان برداشته شده و توسط اگزونوکلئاز ′۳ → ′۵ تجزیه می‌شود (۲) و یا با اگزونوکلئاز ′۵ → ′۳ موجود در اگزوزوم سیتوپلاسمی تجزیه شود. بعضی از mRNA ها (راست) از درون توسط یک اندونوکلئاز بریده می‌شود و قطعات آن توسط اگزوزوم تجزیه می‌شود. سایر mRNA ها (چپ) قبل از آدنیلاسیون کلاهک‌شان برداشته شده و سپس با اگزونوکلئاز ′۳ → ′۵ تجزیه می‌شوند.

از اینکه ژن مهار شد، صورت می‌گیرد. اکثر mRNA های باکتریایی ناپایدار بوده و به صورت نمایی و با توجه به نیمه عمرشان در عرض چند دقیقه تخریب می‌شوند. به همین دلیل سلول باکتریایی به سرعت می‌تواند سنتز پروتئینی خود را در اثر تغییر در محیط سلولی وفق دهد. از طرف دیگر اکثر سلول‌های موجودات پرسلولی، در شرایط محیطی نسبتاً ثابتی قرار داشته و مجموعه ویژه‌ای از وظایف را طی یک روز، ماه و حتی طول عمر یک موجود زنده انجام می‌دهند(مثل سلول‌های عصبی). بر این اساس اکثر mRNA های یوکاریوت‌های عالی چندین ساعت نیمه عمر دارند.

با این حال، بعضی از پروتئین‌ها در سلول‌های یوکاریوتی فقط برای مدت کوتاهی نیاز بوده و بایستی به صورت انفجاری تولید شوند. به عنوان مثال همانطور که قبلاً در فصل مقدمه اشاره شد مولکول‌های ویژه پیام‌رسان به نام **سیتوکین‌ها** که در پاسخ ایمنی پستانداران دخالت می‌کنند، به صورت انفجاری و کوتاه‌مدت سنتز و ترشح می‌شوند. به طور مشابه، بسیاری از فاکتورهای رونویسی که آغاز مرحله S چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند مثل C-fos و C-Jun فقط در دوره کوتاهی سنتز می‌شوند. بیان چنین پروتئین‌های به صورت انفجاری و کوتاه رخ می‌دهد زیرا رونویسی ژن‌های آنها سریعاً روشن و خاموش شده و mRNA های آن به طور غیرمعمول دارای نیمه عمر کوتاه تا ۳۰ دقیقه یا کمتر هستند.

mRNA های سیتوپلاسمی با یکی از سه مسیر نشان داده شده در شکل ۲۹-۸ تجزیه می‌شوند. اکثر mRNA ها در مسیر **وابسته به دآدنیلاسیون**[1] و به صورت ذیل تجزیه می‌شوند: طول دم پلی (A) بتدریج و به مرور زمان در اثر عمل نوکلئاز دآدنیله کننده کاهش می‌یابد. هنگامیکه دم پلی (A) به حد کافی کوتاه شد، مولکول‌های PABPI نمی‌توانند به مدت طولانی به آن متصل شده و واکنش کلاهک ′۵ را با فاکتورهای آغازین ترجمه پایدار کنند. در نتیجه کلاهک در معرض آنزیم حذف کننده کلاهک قرار گرفته و حذف می‌شود. (در ساکارومایسس سرویزیه DCP1/DCP2) در این حالت mRNA ایی که کلاهکش برداشته شده توسط اندونوکلئاز ′۳ - ′۵ (XrnI در ساکارومایسس سرویزیه) تجزیه می‌شود. حذف دم پلی (A) حساسیت mRNA را نسبت به تجزیه با اگزوزوم سیتوپلاسمی که دارای اندونوکلئازهای ′۵ → ′۳ است افزایش می‌دهد. اگزونوکلئازهای ′۳ → ′۵ در مخمر و اگزوزوم ′۳ → ′۵ در پستانداران غالب هستند. آنزیم‌های حذف‌کننده کلاهک و اندونوکلئاز ′۳ → ′۵ در اجسام P متراکم شده‌اند. اجسام P نواحی از سیتوپلاسم می‌باشند که به صورت غیرمعمول به شدت متراکم شده‌اند. (شکل ۳۱-۸).

بعضی از mRNA ها ابتدا با مسیر حذف کلاهک مستقل از دآنیلاسیون تجزیه می‌شوند (شکل ۲۹-۸). این حالت بدلیل وجود توالی ویژه در انتهای ′۵ mRNA بوده و به نظر می‌رسد کلاهک را نسبت به آنزیم حذف‌کننده کلاهک حساس می‌سازد. در این

1- Deadenylation - dependent pathway

mRNAها سرعت برداشته شدن کلاهک سرعت تجزیه mRNA را کنترل می‌کند. زیرا بعد از اینکه کلاهک ′۵ برداشته شد، RNA سریعاً توسط اگزونوکلئاز ′۳ → ′۵ هیدرولیز می‌شود.

سرعت دآدنیلاسیون mRNA با فرکانس آغاز ترجمه در یک mRNA رابطه معکوسی دارد یعنی هر اندازه فرکانس آغاز ترجمه بیشتر باشد به همان اندازه سرعت دآدنیلاسیون کم‌تر می‌شود. این رابطه احتمالاً بدلیل میانکنش‌های متقابل بین فاکتورهای آغاز متصل به کلاهک ′۵ و PABPI متصل به دم پلی (A) می‌باشد. در mRNAایی که باسرعت بالا ترجمه می‌شود فاکتورهای آغازین متصل به کلاهک مدت‌زمان بیشتری به آن متصل بوده و اتصال PABPI را پایدار کرده و بنابراین دم پلی (A) را از دسترس نوکلئازهای آدنیله‌کننده حفظ می‌کنند.

بسیاری از mRNAها با نیمه عمر کوتاه در پستانداران دارای نسخه‌های متعدد و بعضی مواقع همپوشان از توالی AUUUA در ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ هستند. پروتئین‌های ویژه متصل‌شونده به RNA شناسایی شده‌اند که هم به توالی غنی از AU متصل می‌شوند و هم با آنزیم دآدنیله‌کننده و با اگزوزوم واکنش می‌دهند. این عمل باعث دآدنیلاسیون سریع و در مرحله بعد تجزیه این mRNAها در جهت ′۵ → ′۳ می‌گردد. در این مکانیسم سرعت تجزیه mRNA جدای از فرکانس ترجمه می‌باشد. پس mRNA دارای توالی AUUUA می‌تواند با فرکانس بالا ترجمه و نیز سریعاً تجزیه شده و باعث می‌گردد که پروتئین‌های رمزدهی شده به صورت انفجاری و در مدت زمان کوتاه بیان گردند.

همانگونه که در شکل ۲۹-۸ نشان داده‌شده بعضی از mRNAها طی **مسیر اندونوکلئولیتیک**[1] تجزیه می‌شوند و در آن هیچ حذف کلاهک و دآدنیلاسیون چشمگیری دخالت نمی‌کند. یک مثال از این نوع مسیر، مسیر RNAi است که در بالا بحث شد، هر کمپلکس ریسک siRNA می‌تواند هزاران مولکول RNA مورد نظر را تجزیه کند. سپس قطعات ایجاد شده در اثر برش درونی با اندونوکلئازها تجزیه می‌شوند.

اجسام P. همانطور که در بالا اشاره شد، اجسام P جایگاههای مهار ترجمه mRNAهای متصل به کمپلکس ریسک miRNA هستند. آنها همچنین جایگاههای اصلی تجزیه mRNA در سیتوپلاسم می‌باشند. این نواحی متراکم سیتوپلاسمی دارای آنزیم حذف‌کننده کلاهک (DCP۱/DCP۲ در مخمر) فعال‌کننده‌های حذف کلاهک (Lsmiv,Patt,Dhh درمخمر) اندونوکلئاز اصلی ′۳ → ′۵ (Xrn 1) و نیز mRNAهای متراکم است. اجسام P ساختارهایی پویا بوده و از لحاظ اندازه و بسته به مقدار تجمع mRNPها در آنها، میزان تجزیه mRNAها و میزان خروج mRNPها و ورود دوباره mRNPهای ترجمه نشده، رشد کرده و یا کوچک می‌شوند.

سنتز پروتئین می‌تواند به طور کلی تنظیم شود

فاکتورهای آغاز ترجمه و پروتئین‌های ریبوزومی همانند پروتئین‌هایی که در سایر فرآیندها دخالت دارند می‌توانند با تغییرات پس ترجمه‌ای مثل فسفریلاسیون تنظیم شوند. چنین مکانیسم‌هایی بر سرعت ترجمه اکثر mRNAها اثر گذاشته و از اینرو بر سرعت کلی سنتز پروتئین سلولی اثر می‌گذارند.

مسیر TOR. مسیر TOR با مطالعه بر روی مکانیسم عمل راپامایسین (آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط باکتری استرپتومایسیس) کشف شد. راپامایسین برای سرکوب پاسخ ایمنی در بیماران پیوند عضوی مفید است. **هدف راپامایسین**[2] (TOR) با جداکردن جهش‌یافته‌های مخمر مقاوم به مهار توسط رشد سلولی راپامایسین شناسایی شد. TOR یک پروتئین کیناز بزرگ (حدود ۲۴۰۰ اسید آمینه) بوده و چندین فرآیند سلولی را در سلول‌های مخمر و در پاسخ به شرایط غذایی تنظیم می‌کند. در یوکاریوت‌های پرسلولی، TOR متازوآ (mTOR) نیز به پیام‌های ایجادشده از پروتئین‌های پیام‌رسان سطح سلولی پاسخ می‌دهد تا رشد سلولی را همزمان با برنامه تکوینی و نیز شرایط غذایی تنظیم کند.

یافته‌های اخیر در مورد مسیر mTOR در شکل ۳۰-۸ خلاصه شده است. mTOR فعال سرعت کلی سنتز پروتئین را با فسفریلاسیون دو پروتئین ضروری که به طور مستقیم ترجمه را تنظیم می‌کند، تحریک می‌کند. mTOR همچنین فاکتورهای رونویسی (که بیان اجزای سازنده ریبوزوم را کنترل می‌کنند)، tRNAها و فاکتورهای ترجمه را فعال کرده و سنتز پروتئین و رشد سلولی را بیشتر فعال می‌کند.

به‌یاد آورید که مرحله اول ترجمه mRNA یوکاریوتی شامل اتصال کمپلکس آغازین eIF4 به کلاهک ′۵ از طریق eIF4E زیرواحد اتصالی به کلاهک است (شکل ۲۴-۴). غلظت eIF4E فعال توسط خانواده کوچکی از پروتئین‌های اتصالی (4E-BPs) eIF4E تنظیم می‌شود که میانکنش eIF4E را با کلاهک ′۵

1- Endonucleolytic pathway

2- Target of rapamycin

mRNA مهار می‌کند. 4E-BPها اهداف مستقیم mTORها بوده و زمانیکه توسط mTOR فسفریله شوند 4E-BP، eIF4E را آزاد کرده و آغاز ترجمه را تحریک می‌کند. mTOR همچنین سایر پروتئین کینازها را فسفریله و فعال می‌کند. این پروتئین کینازها هم به نوبه خود پروتئین S_6 (S_6k) از زیرواحد کوچک ریبوزوم و احتمالاً سوبستراهای دیگری را فسفریله کرده و باعث افزایش بیشتر در سرعت سنتز پروتئین می‌شود.

ترجمه زیر مجموعه ویژه‌ای از mRNAها که رشته‌ای از پیریمیدین‌ها را در ناحیه ′۵ غیر قابل ترجمه خود دارند TOP (mRNA قطعه الیگوپیریمیدین نامیده می‌شوند) که بشدت توسط mTOR تحریک می‌گردند. mRNA ToPهای ′۵ پروتئین‌های ریبوزومی و فاکتورهای ادامه ترجمه را رمزدهی می‌کنند. mTOR همچنین فاکتور رونویسی RNA پلیمراز I یعنی TIFIA و رونویسی پیش‌ساز بزرگ rRNA را تحریک می‌کند. mTOR همچنین رونویسی توسط RNA پلیمراز III را تحریک می‌نماید اما مکانیسم آن هنوز شناخته شده نیست. علاوه بر این، mTOR دو تا از فعال‌کننده‌های RNA پلیمراز II را که باعث تحریک رونویسی ژن‌های پروتئین ریبوزومی و فاکتور ترجمه می‌شود را فعال می‌کند. درنهایت، mTOR پردازش پیش‌ساز rRNA را تحریک می‌کند. بدنبال فسفریلاسیون این سوبستراهای مختلف mTOR، سنتز و تجمع ریبوزوم و همچنین سنتز فاکتورهای ترجمه و tRNAها به شدت افزایش می‌یابد. بعبارت دیگر زمانیکه فعالیت mTOR کیناز مهار می‌شود این سوبستراها دفسفریله شده و سرعت سنتز پروتئین و تولید ریبوزوم و فاکتورهای ترجمه و tRNAها به شدت کاهش یافته و رشد سلولی متوقف می‌شود.

فعالیت mTOR توسط یک G**پروتئین مونومری کوچک**[1] از خانواده پروتئین Ras به نام Rheb تنظیم می‌شود. مانند سایر G پروتئین‌های کوچک، Rheb در حالت کنفورماسیونی فعال خود به GTP متصل است. Rheb.GTP به کمپلکس mTOR متصل شده و احتمالاً از طریق القای تغییر کنفورماسیون در دمین کینازی mTOR فعالیت کینازی آن را فعال می‌کند. در عوض Rheb توسط یک هترودیمر متشکل از زیرواحدهای TSC1 و TSC2 تنظیم می‌شود. این دو زیر واحد بدلیل دخالت‌شان در سندرم کمپلکس توبروز اسکلروزیس[2] بدین اسم نامیده می‌شوند. در حالت کنفورماسیونی فعال، هترودیمر TSC1/TSC2 به عنوان پروتئین فعال‌کننده GTpاز برای Rheb (Rheb-GAP) عمل کرده و باعث هیدرولیز GTP متصل به Rheb، به GDP می‌شود. این هیدرولیز باعث تبدیل Rheb به حالت کنفورماسیونی متصل به GDP می‌گردد که در این حالت به کمپلکس ToR متصل شده و فعالیت کینازی آن را مهار می‌کند. در نهایت فعالیت TSC1/TSC2 Rheb-GAP با چندین مولکول تنظیم شده و به سلول اجازه می‌دهند تا مسیرهای مختلف پیام‌رسانی سلولی را جهت کنترل سرعت کلی سنتز پروتئین به کار گیرد. پیام ایجاد شده از گیرنده‌های فاکتور رشد سطح سلولی منجر به فسفریلاسیون TSC1/TSC2 در جایگاههای مهار شده و باعث افزایش Rheb-GTP و فعال‌شدن فعالیت کینازی mTOR می‌گردد. این نوع تنظیم از طریق گیرنده‌های سطح سلولی کنترل رشد سلولی را به فرآیندهای تکوینی کنترل شده با میانکنش‌های سلول به سلول مرتبط می‌سازد.

فعالیت mTOR همچنین در پاسخ به شرایط غذایی تنظیم می‌شود. هنگامیکه انرژی حاصل از غذا برای رشد سلولی کافی نباشد نسبت غلظت ATP به AMP افت کرده و این افت به وسیله AMP کیناز تشخیص داده می‌شود. AMP کیناز فعال TSC1/TSC2 را در جایگاههای فعال‌کننده، فسفریله و فعالیت Rheb-GAP را تحریک می‌کند و در نتیجه فعالیت کینازی mTOR و سرعت کلی ترجمه را مهار می‌گردد. هیپوکسی [کمبود اکسیژن] و سایر استرس‌های سلولی نیز TSC1/TSC2 Rheb-GAP را فعال می‌کنند. در نهایت غلظت مواد غذایی در فضای خارج سلولی نیز Rheb را از طریق مکانیسم ناشناخته‌ای تنظیم می‌کنند که نیازی به کمپلکس TSC1/TSC2 ندارد.

علاوه بر تنظیم سرعت کلی سنتز پروتئین سلولی و تولید ریبوزوم، tRNAها و فاکتورهای ترجمه، mTOR حداقل یک فرآیند دیگر را در پاسخ به مقدار کم مواد غذایی یعنی ماکرواتوفاژی را تنظیم می‌کند. سلول‌های گرسنه، اجزای سیتوپلاسمی مثل اندامک‌ها را تجزیه می‌کنند تا انرژی و پیش‌سازهای مورد نیاز برای فرآیندهای سلولی را تأمین کنند. در طی این فرآیند ساختاری با غشای دوگانه ناحیه‌ای از سیتوپلاسم را در بر گرفته و اتوفاگوزوم را تشکیل می‌دهد. اتوفاگوزوم سپس با لیزوزوم ادغام شده و در آنجا پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر ماکرومولکول‌های بدام افتاده را تجزیه کرده و فرآیند ماکرواتوفاژی را کامل می‌کنند. mTOR فعال، ماکرواتوفاژی را در سلول‌های در حال رشد هنگامیکه مواد غذایی به فراوانی وجود دارند، را مهار می‌کند. ماکرواتوفاژی هنگامیکه فعالیت

1- Monomeric small G protein

2- Tuberous sclerosis complex

mTOR در سلول‌های محروم از مواد غذایی افت می‌کند، تحریک می‌شود.

ژن‌های رمزدهی کننده اجزای سازنده مسیر mTOR در بسیاری از سرطان‌های انسانی جهش یافته و منجر به رشد سلولی در غیاب سیگنال‌های طبیعی رشد می‌گردد. TSC2 و TSC1 (شکل ۳۰-۸) ابتدا شناخته شده‌اند زیرا یکی از این دو پروتئین در بیماری ژنتیکی کمپلکس توبروز اسکلروزیس جهش می‌یابند. بیمارانی که این ناهنجاری را دارند تومورهای خوش خیمی را در بافت‌های متعددی تشکیل می‌دهند. عوارض بیماری بدلیل غیرفعال شدن TSC1 یا TSC2 است که فعالیت Rheb-GAP را در هترودیمر TSC1/TSC2 کاهش داده و باعث افزایش غیرطبیعی و تنظیم نشده مقدار Rheb.GTP شده و در نتیجه فعالیت mTOR به صورت کنترل نشده افزایش می‌یابد. جهش در اجزای سازنده مسیر انتقال پیام گیرنده سطح سلولی منجر به مهار فعالیت TSC1/TSC2 Rheb.GAP می‌گردد که معمولاً در تومورهای انسانی نیز دیده می‌شود و در رشد سلولی و همانندسازی در غیاب پیام طبیعی برای رشد و تکثیر دخالت دارند.

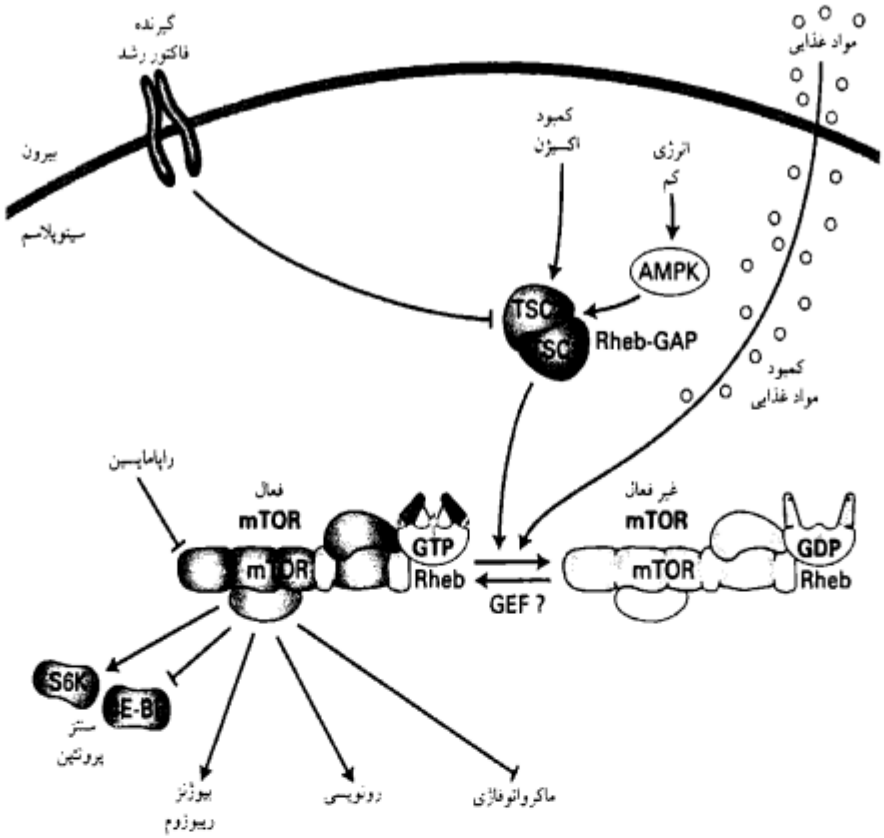
فعالیت کینازی بالای پروتئین mTOR در تومورها با علایم بالینی کمی همراه است. در نتیجه مهارکننده‌های mTOR در حال حاضر، در آزمایشات بالینی برای آزمودن مؤثر بودن این ترکیبات در درمانهای سرطان همراه با درمان‌های دیگر به کار برده می‌شود. راپامایسین و سایر مهارکننده‌های mTOR مرتبط، مهارکننده‌های قوی پاسخ ایمنی هستند زیرا می‌توانند فعال شدن و همانندسازی لنفوسیت‌های T را در پاسخ به آنتی‌ژن‌های خارجی مهار کنند (فصل ۲۴). ویروس‌های مختلفی، پروتئین‌هایی را رمزدهی می‌کنند که mTOR را در مراحل اولیه وبعد از عفونت ویروسی فعال می‌کنند. تحریک ترجمه مزیت انتخابی چشمگیر برای این انگل‌های داخل سلولی به حساب می‌آید.

کینازهای eIF2. eIF2 کینازها نیز سرعت کلی سنتز پروتئین را تنظیم می‌کنند. در شکل ۲۴-۴ مراحل آغاز ترجمه به طور خلاصه آورده شده است. فاکتور آغاز ترجمه eIF2، tRNA آغازگر را به جایگاه P زیرواحد کوچک ریبوزومی می‌آورد. eIF2 یک G پروتئین سه زیرواحدی بوده و به صورت کنفورماسیونهای متصل به GTP یا GDP وجود دارد و تنها حالت متصل به GTP آن قادر است به tRNA آغازگر باردار [دارای اسیدآمینه] متصل شده و به زیرواحد کوچک ریبوزومی ملحق شود. زیرواحد کوچک ریبوزومی متصل به فاکتورهای آغازین و tRNA آغازگر باردار با کمپلکس eIF4 متصل به کلاهک ′۵ mRNA از طریق زیرواحد eIF4E واکنش می‌دهد. سپس زیرواحد کوچک ریبوزومی، mRNA را در جهت ′۳ بازرسی می‌کند تا به رمز آغاز AUG رسیده و بتواند با tRNA آغازگر در جایگاه P جفت گردد. هنگامیکه این پدیده رخ داد، GTP متصل به eIF2 به GDP هیدرولیز و باعث می‌شود کمپلکس eIF2.GDP آزاد گردد. هیدرولیز GTP یک مرحله غلط‌گیری[1] برگشت‌ناپذیر بوده و زیرواحد کوچک ریبوزومی را برای اتصال به زیرواحد بزرگ ریبوزومی را هنگامیکه tRNA آغازگر در جایگاه P قرار گرفته و به درستی با AUG آغازی جفت باز تشکیل داده باشد، آماده می‌کند. قبل از مشارکت eIF2 در آغاز ترجمه دیگر، GDP متصل به آن بایستی با GTP جابجا شود. این فرآیند به وسیله فاکتور آغاز ترجمه eIF2B انجام می‌شود. eIF2 فاکتور تعویض کننده نوکلئوئید گوانین (GEF) مختص eIF2 می‌باشد.

مکانیسم مهار عمومی سنتز پروتئین در سلول‌هایی که تحت شرایط استرس قرار گرفته‌اند، شامل فسفریلاسیون زیرواحد α-eIF2 در یک سرین ویژه می‌باشد. فسفریلاسیون در این جایگاه مستقیماً با عمل eIF2 در سنتز پروتئین تداخلی ایجاد نمی‌کند. eIF2 فسفریله تمایل بسیار زیادی به فاکتور تعویض‌کننده نوکلئوتید گوانین ویژه eIF2 (eIF2B) دارد به طوری که نمی‌تواند eIF2 فسفریله را رها کند و در نتیجه کاتالیز تعویض GTP در فاکتورهای eIF2 دیگر بلوکه می‌شود. از آنجایی که مقدار eIF2 بیشتر از eIF2B است، فسفریلاسیون بخشی از eIF2ها باعث مهار همه eIF2B سلولی می‌گردد. بقیه eIF2ها به صورت متصل به GDP تجمع یافته و در سنتز پروتئین نمی‌تواند دخالت کنند و بنابراین تقریباً کل سنتز پروتئین سلولی مهار می‌گردد. با وجود این بعضی از mRNAها، نواحی ′۵ دارند که اجازه می‌دهد، ترجمه در غلظت کم eIF2-GTP (در نتیجه فسفریلاسیون eIF2) آغاز گردد. این mRNAها دسته‌ای از پروتئین‌های چاپرون (که وظیفه آنها تاخوردگی مجدد پروتئین‌های دناتوره شده سلول در اثر استرس سلولی است)، پروتئین‌های دیگری که به سلول کمک می‌کند تا به شرایط استرسی سازگار گردد و نیز فاکتورهای رونویسی فعال کننده رونویسی از ژن‌های رمزدهی‌کننده این پروتئین‌های القاشده در اثر استرس را رمزدهی می‌کنند.

سلول‌های انسانی دارای چهار کیناز eIF2 بوده و سرین

1- proofreading



▲ **شکل ۸-۳۰ مسیر mTOR.** mTOR پروتئین کینازی است که در اثر اتصال به کمپلکس Rheb و GTP متصل به آن فعال می‌شوند (سمت چپ پایین). برعکس mTOR در اثر اتصال به کمپلکس Rheb متصل به GDP غیرفعال می‌شود (راست پایین). در حالت فعال پروتئین فعال‌کننده Rheb-GTPase TSC1/TSC2 (Rheb-GAP) باعث هیدرولیز GTP متصل به Rheb به GDP می‌شود و در نتیجه mTOR غیرفعال می‌شود. TSC1/TSC2 Rheb-GAP در هنگام کاهش ذخیره انرژی سلولی زیاد و در شرایط استرسی دیگر با AMP کیناز فسفریله و فعال می‌شود. مسیر انتقال پیام که با گیرنده‌های فاکتور رشد سطح سلولی فعال می‌شود، باعث فسفریلاسیون جایگاههای غیرفعال‌کننده بر روی TSC1/TSC2 شده و فعالیت GAP آنها را مهار می‌کند. در نتیجه بخش عظیمی از Rheb سلولی در حالت کنفورماسیونی GTP باقی مانده و فعالیت پروتئین کینازی mTOR را فعال می‌کند. غلظت اندک مواد غذایی فعالیت GTPآزی Rheb را تنظیم می‌کنند، این تنظیم از طریق مکانیسمی انجام می‌شود که به TSC1/TSC2 نیازی ندارد. mTOR فعال 4E-BP را فسفریله کرده و باعث آزاد شدن eIF4E از آن و تحریک آغاز ترجمه می‌شود. همچنین کیناز S6K(S6) را فسفریله و فعال می‌کند. کیناز S_6 نیز پروتئین‌های ریبوزومی را فسفریله و ترجمه را تحریک می‌کند. mTOR فعال نیز فاکتورهای رونویسی RNA پلیمراز I و II و III را فعال کرده و باعث سنتز و تجمع ریبوزوم و tRNA و فاکتورهای رونویسی می‌گردد. در غیاب فعالیت mTOR همه این فرآیندها مهار می‌شود، در مقابل mTOR فعال فعالیت ماکروآتوفاژی را که در سلول‌های حاوی mTOR غیرفعال وجود دارد، مهار می‌کند.

مهاری مشابهی را در eIF2α فسفریله می‌کنند. هر یک از این کینازها با انواع مختلفی از استرس سلولی تنظیم شده، سنتز پروتئین را مهار کرده و به سلول اجازه می‌دهند بخش عظیمی از منابع سلولی خود را در سلول‌های در حال رشد به سنتز پروتئین اختصاص دهد تا در پاسخ به شرایط استرسی به کار برده شود.

کیناز GCN2 (کنترل عمومی غیرقابل سرکوب ۲[1]) eIF2 در اثر اتصال به tRNA بی‌بار [بدون اسید آمینه] فعال می‌شود. غلظت tRNA بدون بار زمانیکه سلول در فقر اسیدآمینه به سر می‌برد افزایش یافته، فعالیت کینازی GCN2-eIF2 تحریک شده و شدیداً سنتز پروتئین مهار می‌شود.

PEK (کیناز eIF2 پانکراسی)[2] زمانی فعال می‌شود که پروتئین‌های انتقال یافته به درون شبکه اندوپلاسمی (ER) به علت شرایط نامناسب لومن ER بدرستی تا نخورند. القاگرها شامل غلظت غیرطبیعی کربوهیدرات (زیرا غلظت غیرطبیعی کربوهیدرات گلیکوزیله شدن بسیاری از پروتئین‌های ER را مهار می‌کند) و

1- General control non-derepressible 2

2- Pancreatic eIF2α kinase

جهش‌های غیرفعال‌کننده در یک چاپرون ER (که برای تاخوردن صحیح بسیاری از پروتئین‌ها در ER مورد نیاز است) می‌باشند.

مهارکننده تنظیمی باهم[1] (HRI) هنگامیکه ذخیره گروه پروستیک به قدری کم است که نمی‌تواند با سرعت سنتز پروتئین گلوبین هماهنگ شود، در گلبولهای قرمز خون در حال تکوین فعال می‌شود. این حلقه پس‌نورد منفی سرعت سنتز پروتئین گلوبین را تا رسیدن به سرعت سنتز هم کاهش می‌دهد. HRI همچنین در انواع سلولی دیگر و در پاسخ به شرایط استرس اکسیداتیو و شوک حرارتی فعال می‌شود.

در نهایت، پروتئین کیناز فعال شده با RNA (PKR) با RNA های دو رشته‌ای که طولشان بیشتر از ۳۰ جفت باز است، فعال می‌شود. در شرایط طبیعی، در سلول‌های پستانداران این RNA های دورشته‌ای فقط در طی عفونت ویروسی تولید می‌شوند، نواحی طویل از RNA دورشته‌ای در حدواسطهای همانندسازی ویروس‌های RNA دار و یا در اثر هیبرید شدن نواحی مکملی RNA رونویسی شده از هر دو رشتهٔ ژنوم ویروس‌های DNA دار تولید می‌شود. مهار سنتز پروتئین از تولید ویروس‌های جدید جلوگیری کرده و سلول‌های مجاور را از آلودگی توسط ویروس حفاظت می‌کند. نکته جالب اینست که آدنوویروس یک مکانیسم دفاعی علیه PKR دارد. این ویروس‌ها مقادیر زیادی از RNA با طول تقریباً ۱۶۰ نوکلئوتید متصل به ویروس (VA) را که دارای RNA دورشته‌ای با نواحی سنجاق سری می‌باشد را تولید می‌کنند. VA RNA توسط RNA پلیمراز III رونویسی شده و توسط اکسپورتین ۵ (همان ناقل miRNA اولیه، شکل ۸ـ۲۷) از هسته خارج می‌شود. VA RNA به PKR با تمایل بالا متصل شده و فعالیت پروتئین کینازی آن را مهار و از مهار سنتز پروتئین در سلول‌های آلوده به آدنوویروس‌های جهش یافته که ژن VA در آنها حذف شده است، جلوگیری می‌کند.

پروتئین‌های توالی ویژه متصل شونده به RNA ترجمه mRNA ویژه را کنترل می‌کنند

برخلاف تنظیم عمومی mRNA، مکانیسم‌هایی برای کنترل ترجمه mRNA های ویژه به وجود آمده‌اند. این مکانیسم‌ها معمولاً توسط پروتئین‌های توالی ویژه متصل شونده به RNA انجام می‌گیرد که به توالی یا ساختار خاص در mRNA متصل می‌شوند. هنگامیکه اتصال در ناحیه غیر قابل ترجمه ′۵ (′۵ – UTR) یک mRNA باشد، توانایی ریبوزوم برای بازرسی اولین کدون آغاز بلوکه شده و آغاز ترجمه مهار می‌شود. اتصال در سایر نواحی می‌تواند باعث مهار یا پیشرفت تجزیه mRNA گردد.

کنترل غلظت درون سلولی آهن توسط **پروتئین اتصالی به عنصر پاسخ‌دهنده به آهن**[2] (IRE- BP) مثال خوب از پروتئینی است که ترجمه یک mRNA و تجزیه mRNA دیگر را تنظیم می‌کند. تنظیم دقیق غلظت یونی آهن درون سلولی برای سلول ضروری است. آنزیم‌ها و پروتئین‌های زیادی آهن را به صورت کوفاکتور دارند، مثلاً آنزیم‌های چرخه کربس و پروتئین‌های ناقل الکترون که در تولید ATP در میتوکندری و کلروپلاست دخالت دارند (فصل ۱۲). بعبارت دیگر مقادیر اضافی Fe^{2+} رادیکال آزاد تولید می‌کند. این رادیکال آزاد با ماکرومولکول‌های سلولی واکنش داده و به آنها صدمه می‌رساند. هنگامیکه ذخایر درون سلولی آهن کم است، سیستم کنترل دوگانه وارد عمل شده و میزان آهن درون سلولی را افزایش می‌دهد. مواقعی که مقدار آهن زیاد است. این سیستم وارد عمل شده واز تجمع مقادیر سمی آهن آزاد جلوگیری می‌کند.

قسمتی از این سیستم تنظیم تولید فریتین (یک پروتئین درون سلولی متصل‌شونده به آهن) است که به آهن متصل شده و مقادیر اضافی آهن را ذخیره می‌کند. ناحیه ′۵ غیرقابل ترجمه mRNA فریتین دارای عناصر پاسخ‌دهنده به آهن (IREs) با ساختار ساقه – حلقه است. پروتئین اتصالی IRE (IRE-BP) پنج باز ویژه را در ناحیه لوپ IRE و ساختار دوگانه ساقه شناسایی می‌کند. در غلظت کم آهن، IRE-BP در کنفورماسیون فعال قرار داشته و به IRE متصل می‌شود (شکل ۸–۳۱a). اتصال IRE-BP مانع از بازرسی زیرواحد کوچک ریبوزومی در پیداکردن کدون AUG آغازین می‌شود (شکل ۴ـ۲۴ را ملاحظه کنید). بنابراین آغاز ترجمه را مهار می‌کند. در نتیجه غلظت فریتین کاهش یافته و آهن کمتری با فریتین کمپلکس تشکیل داده و آهن برای استفاده آنزیم‌های نیازمند به آهن در دسترس قرار می‌گیرد. در غلظت بالای آهن، IRE-BP در حالت کنفورماسیونی غیرفعال قرار داشته و نمی‌تواند به ′۵–IREs متصل شود. در نتیجه آغاز ترجمه می‌تواند انجام شود. فریتین تازه سنتز شده سپس به یونهای آزاد آهن متصل و مانع از تجمع میزان زیان‌آور آن می‌گردد.

قسمت دیگری از این سیستم تنظیمی، ورود آهن را به درون سلول کنترل می‌کند. در مهره‌داران آهن وارد شده از طریق غذا جذب شده و از طریق سیستم گردش خون به صورت متصل به پروتئین

1- Heme - regulated inhibitor

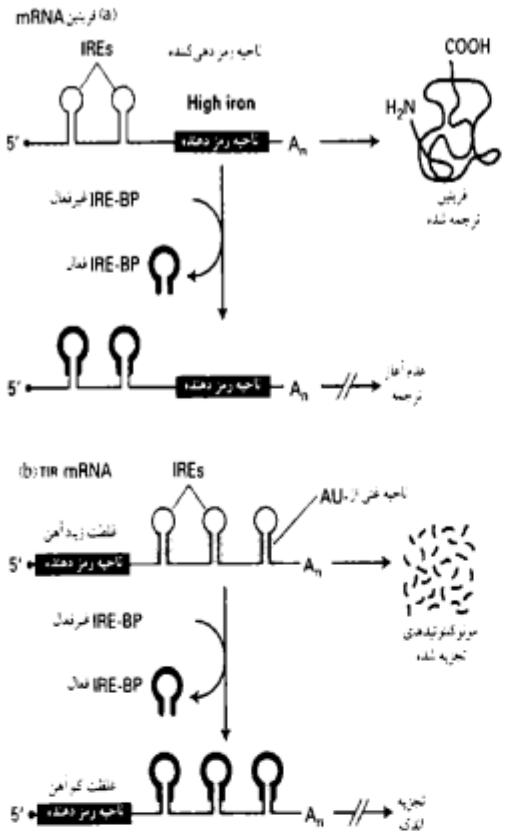
2- Iron response element - binding protein

ترانسفرین منتقل می‌شود. بعد از اتصال به گیرنده ترانسفرین[۱] (TFR) در غشای پلاسمایی، کمپلکس ترانسفرین آهن از طریق اندوسیتوز وابسته به رسپتور وارد سلول می‌شود. ناحیه ′۳ غیرقابل ترجمه mRNA مربوط به TFR دارای IRE هایی با نواحی ساقه غنی از توالی ناپایدارکننده AU است (شکل ۳۱b-۸). در غلظت‌های بالای آهن، هنگامیکه IRE-BP به صورت غیرفعال است (کونفورماسیون غیراتصالی) این توالی‌های غنی از AU، از طریق مکانیسمی مشابه با مکانیسم تجزیه سریع mRNA های با نیمه عمر کوتاه باعث تجزیه TFR-mRNA می‌شوند. در نتیجه افت سنتز گیرنده ترانسفرین، ورود آهن سریعاً کاهش یافته و بنابراین سلول را از اثرات مضر مقادیر اضافی آهن حفاظت می‌کند. با این حال، در غلظت‌های کم آهن، IRE-BP می‌تواند به ناحیه IRE-′۳ در TFR-mRNA متصل شود. IRE-BP متصل شده مانع شناسایی توالی ناپایدارکننده غنی از AU توسط پروتئین‌هایی می‌شود که سریعاً mRNA ها را تجزیه می‌کنند. در نتیجه تولید گیرنده ترانسفرین افزایش یافته و آهن بیشتری به درون سلول وارد می‌شود.

سایر پروتئین‌های تنظیمی متصل شونده به RNA نیز ترجمه mRNA و تجزیه آن را مانند IRE-BP دو عملکردی، کنترل می‌کنند. مثلاً پروتئین متصل شونده به RNA حساس به هِم، ترجمه mRNA رمزدهی‌کننده آمینولوولینات سنتاز (ALA) که آنزیم کلیدی در سنتز هم است را کنترل می‌کند. مطالعات در آزمایشگاه نشان داد، mRNA رمزدهی‌کننده کازئین شیر توسط هورمون پرولاکتین پایدار و در غیاب آن سریعاً تجزیه می‌شود.

مکانیسم‌های نظارتی از ترجمه mRNA هایی که به درستی پردازش نیافته‌اند جلوگیری می‌کند

ترجمه mRNA بدرستی پردازش نیافته منجر به تولید پروتئین غیرطبیعی می‌گردد که با عملکرد طبیعی ژن تداخل ایجاد می‌کند. با اینکه علت‌شان متفاوت است، اما این اثر معادل با اثرات حاصل از جهش‌های منفی غالب است. (شکل ۴۴-۵). چندین مکانیسم که اصطلاحاً **نظارت mRNA**[۲] نامیده می‌شود، به سلول کمک می‌کند تا از ترجمه مولکول‌های mRNA های اولیه‌ای که به درستی پردازش نشده‌اند، جلوگیری شود. ما قبلاً دو مکانیسم نظارتی را توضیح دادیم: شناسایی mRNA های اوّلیه بدرستی پردازش نشده در هسته و تجزیه آن‌ها بوسیله اگزوزوم و محدودیت برای خروج از هسته در مورد mRNA های اولیه ناقص پیرایش یافته که با اسپلایسوزوم مجتمع هستند. مکانیسم دیگر تخریب



▲ **شکل ۳۱-۸ تنظیم وابسته به آهن.** ترجمه و تجزیه mRNA پروتئین متصل شونده به عنصر پاسخ به غلظت آهن (IRE-BP) ترجمه mRNA مربوط به فریتین راکنترل می‌کند. (a) تجزیه mRNA گیرنده ترانسفرین (b). در غلظت درون سلولی کم آهن، IRE-BP به IRE در ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ یا ′۵ این mRNA ها متصل می‌شود. در غلظت‌های زیاد آهن IRE-BP یکسری تغییرات کنفورماسیونی را متحمل شده و نمی‌تواند به mRNA متصل گردد. کنترل دوگانه با IRE-BP دقیقاً میزان یونهای آزاد آهن را در سلول کنترل می‌کند.

nonsense-mediated نامیده می‌شود و باعث تجزیه mRNA هایی می‌گردد که در آن یک یا چند اگزون نادیده گرفته می‌شوند. چنین نادیده گرفته شدن اگزونی اغلب قالب قابل خواندن ′۳mRNA را به تقاطع اگزونی نادرست تغییر داده و باعث می‌شود **جهش‌های خارج از قالب با معنی اشتباه**[۳] (جهش نقطه‌ای که‌یک نوکلئوتید جابجایی می‌شود) و در نهایت کدون پایان نادرست ایجاد گردد. تقریباً در همه mRNA هایی که به طور صحیح پیرایش یافته‌اند، رمز پایان در آخرین اگزون قرار دارد. فرآیند تخریب nonsense-mediated (NMD) منجر به تجزیه سریع

1- Transferrin recepter

2- mRNA surveillance

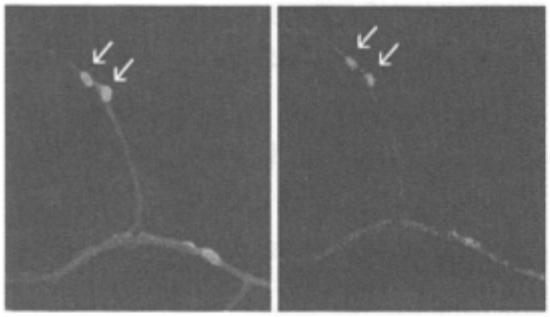
3- Out - of - frame missence mutations

mRNA ها می‌گردد که کدون پایان قبل از آخرین تقاطع پیرایشی در mRNA قرار دارد. چنین mRNA هایی در نتیجه پیرایش نادرست RNA ایجاد می‌شود.

جستجو برای پیام‌های مولکولی احتمالی که ممکنست موقعیت تقاطع پیرایشی را در mRNA پردازش یافته نشان دهد منجر به کشف کمپلکس‌های تقاطع اگزونی گردید. همانطور که قبلاً اشاره شد، این کمپلکس‌های چندپروتئینی (شامل Y14، Magoh ، eIF4IIIA ، Upf3 و REF) بدنبال پیرایش RNA تقریباً ۲۰ نوکلئوتید مانده به ′۵ در تقاطع اگزون - اگزون متصل شده و خروج mRNA ها را از هسته از طریق میانکنش با خارج‌کننده mRNA تحریک می‌کنند. بررسی جهش‌یافته‌های مخمری نشان داد یکی از پروتئین‌های کمپلکس تقاطع اگزونی (Upf3) در مسیر NMA دخالت می‌کند. در سیتوپلاسم این ترکیب کمپلکس تقاطع اگزونی با یک پروتئین (Upf1) واکنش می‌دهد که باعث می‌شود mRNA با اجسام P ترکیب شده و ترجمه mRNA را مهار کند. سپس پروتئین دیگری (Upf2) با کمپلکس mRNP همراه شده و به یک جسم P همراه با دآدنیلاز آن متصل می‌شود. این جسم P همراه با دآدنیلاز به سرعت دم پلی (A) را از mRNA جدا کرده و باعث می‌شود که کلاهک mRNA سریعاً حذف شده و تجزیه آن توسط اگزونوکلئاز ′۵ ← ′۳ موجود در اجسام P انجام گیرد(شکل ۲۹-۸). درمورد mRNA های به درستی پیرایش یافته، کمپلکس‌های تقاطع اگزونی به نظر می‌رسد از طریق اولین ریبوزوم در ترجمه mRNA از mRNA جدا شده و بنابراین mRNA را از تجزیه حفاظت می‌کند. با این حال، mRNA هایی که کدون پایان در آن‌ها قبل از آخرین تقاطع اگزونی قرار دارد یک یا چند کمپلکس تقاطع اگزونی همراه با mRNA ها باقی مانده و منجر به تخریب non-sense -mediated می‌شوند.

جای‌گیری mRNA ها اجازه تولید پروتئین‌ها را در نواحی ویژه سیتوپلاسمی می‌دهد

بسیاری از فرآیندهای سلولی وابسته به موقعیت قرارگیری پروتئین‌های ویژه در ساختارهای خاص و یا در ناحیه‌ای خاص از سلول است. در فصل‌های بعدی نحوه انتقال پروتئین پس از سنتز به جایگاه صحیح خود را مطالعه خواهیم کرد. به عبارت دیگر موقعیت قرارگیری پروتئین را می‌توان باموقعیت قرارگیری mRNA ها در نواحی ویژه سیتوپلاسم سلولی که در آن پروتئین رمزدهی‌شده دارای عملکرد است، بدست آورد. در بیشتر مواردی که تا به حال مطالعه شده‌اند، جای‌گیری mRNA توسط توالی ویژه موجود در ناحیه غیرقابل ترجمه mRNA-′۳ مشخص می‌شود.



▲ **شکل تجربی ۳۲-۸(شکل رنگی) mRNA عصبی ویژه در سیناپس‌ها جای‌گیری می‌کنند.** نورون‌های حسگر اسب دریایی *Aplysic californica* (از میان بزرگترین نورون‌های سلسله جانوری) با نورون‌های حرکتی هدف کشت داده شد به طوریکه زائده‌های نورون حسگر با زائده‌های نورون حرکتی، سیناپس تشکیل داد. میکروگراف سمت چپ زائده‌های نورون حرکتی را نشان می‌دهد که با رنگ آبی فلورسانس مشاهده می‌شود. GFP-VAMP (سبز) در نورون‌های حسگر بیان شده و جایگاه سیناپس تشکیل شده بین نورون حسگر و حرکتی را نشان می‌دهد. (پیکان‌ها) میکروگراف سمت راست رنگ قرمز فلورسانس ایجادشده در اثر هیبریداسیون در جا یک پروب mRNA آنتی سنسورین را نشان می‌دهد. سنسورین یک میانجی عصبی بوده و فقط توسط نورون حسگر بیان می‌شود. زائده‌های نورون حسگر در این نمونه نشان داده نشده است اما آنها نزدیک زائده‌های نورون حرکتی قرار می‌گیرند. هیبریداسیون در جا نشان داد، سنسورین mRNA در سیناپس قرار می‌گیرد.

همانطور که قبلاً اشاره شد، جای‌گیری mRNA های ویژه در سیناپس‌های دور از هسته جسم سلولی در یادگیری و حافظه نقش اصلی را ایفا می‌کند (شکل ۳۲-۸). بعضی از این mRNA ها با دم‌های پلی (A) کوتاه سنتز شده و امکان شروع ترجمه را ندارند.فعالیت سیناپسی می‌تواند پلی آدنیلاسیون آنها را در ناحیه سیناپس تحریک کرده و ترجمه پروتئین‌های رمزدهی‌شده توسط آن‌ها را فعال کند و اندازه سیناپس افزایش یافته و ویژگی‌های نوروفیزیولوژیکی این سیناپس را در بین صدها تا هزاران سیناپس ایجاد شده توسط نورون، تغییر دهد.

میوبلاست‌های کشت داده شده، mRNA مربوط به اکتین را در لبه سلول قرار می‌دهد به طوریکه بتا - اکتین تازه سنتز شده بتواند به صورت اکتین موجود در شبکه اسکلت سلولی پلیمریزه شده و به غشای سلولی فشار آورد تا تحت این شرایط غشا شکل گیرد. (فصل ۱۷). تیمار سلول‌های میوبلاست با سیتوکالازین D که ریزرشته‌های اکتین را تخریب می‌کند، باعث می‌شود mRNA بتا - اکتین در جایگاه خود قرار نگیرد. این نشان می‌دهد ریزرشته‌های اکتینی اسکلت سلولی در جای‌گیری mRNA اکتین نقش دارند. سایر شواهد نیز این مطلب را تأیید می‌کنند که اکتین اسکلت

سلولی در جای‌گیری mRNA نقش دارد. احتمالاً پروتئین‌های اتصالی RNA با توالی ویژه‌ای از mRNA در ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ و نیز با ترکیباتی خاص از ریزرشته‌ها مثل پروتئین‌های حرکتی که در طول ریزرشته‌ها حرکت می‌کنند واکنش می‌دهد. بهترین مثال شناخته شده این مکانیسم جای‌گیری mRNA طی تقسیم سلولی در ساکارومایسیس سرویزیه روی می‌دهد (در فصل ۲۱ توضیح داده شده است).

نکات کلیدی بخش ۴-۸

مکانیسم‌های سیتوپلاسمی کنترل بعداز رونویسی

■ رونویسی بوسیله میکروRNAها (miRNAها) مهار می‌شود. miRNAها با نواحی غیرقابل ترجمه (UTR) که در mRNAهای هدف خاص هیبرید ناقص تشکیل می‌دهند.

■ پدیده RNA مداخله‌گر که احتمالاً یک سیستم دفاعی اولیه تکامل یافته علیه ویروس‌ها و ترانسپوزن‌ها است باعث تجزیه RNAهایی می‌شود که با RNAهای مداخله‌گر کوتاه (siRNAs) هیبرید کامل تشکیل می‌دهند.

■ هم miRNAها و هم siRNAها حاوی ۲۳-۲۱ نوکلئوتید بوده، از پیش سازهای مولکولی بزرگتر ساخته شده و بصورت یک کمپلکس القاء خاموش شدن RNA چند پروتئینی (RISC) تجمع می‌یابد. این کمپلکس ترجمه mRNAهای هدف را مهار نموده و یا آنها را برش می‌دهد.

■ پلی آدنیلاسیون سیتوپلاسمی برای mRNAهای با دم پلی (A) کوتاه ضروری است. اتصال پروتئین اختصاصی به عناصر تنظیمی در UTRها، ترجمه mRNAها را مهار می‌کند. فسفریلاسیون این پروتئین متصل شونده به RNA (که توسط یک سیگنال خارجی القا می‌شود) منجر به و ترجمه طویل شدن دم پلی (A) در ′۳ و می‌شود (شکل ۲۹-۸ را ملاحظه کنید).

■ اغلب mRNAها در اثر کوتاه شدن تدریجی دم پلی (A) شان (دآنیلاسیون) و به دنبال آن تجزیه ′۵ -′۳ توسط اگزووزم با برداشت کلاهک ′۵ و تجزیه بوسیله ′۳ -′۵ اگزونوکلئاز تجزیه می‌شوند.

■ mRNAهای یوکاریوتی رمزدهی کنند پروتئین‌هایی که به صورت انفجاری کوتاه مدت بیان می‌شوند، نسخه‌های تکراری از توالی غنی از AU در انتهای ′۳UTR خود دارند. پروتئین‌های خاصی که به این عناصر متصل می‌شوند با آنزیم آدنیله کننده و اگزووزم نیز میانکنش داده و باعث تجزیه سریع RNA می‌شوند.

■ اتصال پروتئین‌های مختلف به عناصر تنظیمی در UTRهای ′۵ و ′۳ در mRNAها ترجمه و تجزیه اغلب mRNAها را در سیتوپلاسم تنظیم می‌کند.

■ ترجمه mRNA فریتین و تجزیه mRNA رسپتور فریتین (TFR) هر دو بوسیله یک پروتئین متصل شونده به RNA حساس به آهن تنظیم می‌شوند. در غلظت پائین آهن این پروتئین در کنفورماسیونی است که عناصر خاصی در mRNAها متصل شده و ترجمه mRNA فریتین یا تجزیه TfRmRNA را مهار می‌کنند (به شکل ۳۲-۸ را ملاحظه کنید). این کنترل دوطرفه بصورت دقیق سطح آهن را در درون سلول‌ها تنظیم می‌کند.

■ تخریب nonsence-mediated و سایر مکانیسم‌های نظارت mRNA از ترجمه mRNAهای اشتباه پردازش شده که پروتئین‌های غیر طبیعی تولید می‌کند جلوگیری می‌نمایند. این پروتئین‌های غیرطبیعی ممکن است در عمل پروتئین‌های طبیعی مداخله کنند.

■ بعضی mRNAها معمولاً از طریق توالی‌های موجود در ′۳UTR به موقعیت‌های زیر سلولی خاصی هدایت می‌شوند. این امر منجر به جای‌گیری پروتئین‌های رمزدهی شده توسط این mRNAها در موقعیت‌های خاص می‌شود.

۸-۵ پردازش rRNA و tRNA

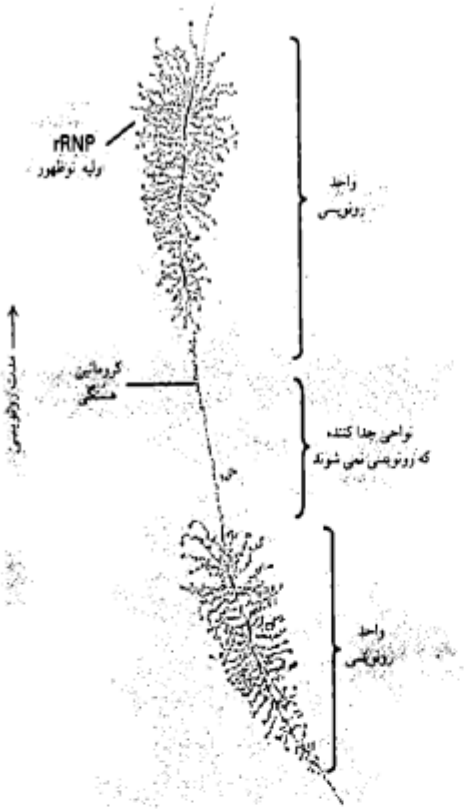
تقریباً ۸۰ درصد کل RNA سلولی در سلول‌های در حال رشد پستانداران (مثل سلول‌های کشت داده شده هلا) rRNA و ۱۵ درصد آن tRNA است و mRNAهای رمزدهی‌کننده پروتئین تنها قسمت کوچکی از کل RNAها را تشکیل می‌دهند. رونوشت‌های اولیه تولید شده از اکثر ژن‌های rRNA در ژن‌های tRNA مانند mRNAهای اولیه باید پردازش یابند تا RNA بالغ ودارای عملکرد فیزیولوژیکی بدست آید.

ریبوزوم یک ساختار بسیار پیچیده تکامل یافته است (شکل ۲۳-۴) که برای ایفای نقش سنتز پروتئین بهینه شده است. سلول‌های یوکاریوتی تعداد زیادی از پروتئین‌ها و RNAها را برای ایجاد این ماشین‌های مولکولی پیچیده اختصاص می‌دهند. تولید آنها نیازمند عمل هماهنگ هر سه RNA پلیمراز هسته‌ای است.

rRNAهای ۵/۸s و ۲۸s موجود در زیرواحد بزرگ و RNA ۱۸s در زیرواحد کوچک ریبوزم توسط RNA پلیمراز I رونویسی می‌شود. 5srRNA در زیرواحد بزرگ توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شود. mRNAهای رمزدهی‌کننده پروتئین‌های ریبوزومی توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شود. علاوه بر چهار rRNA و حدود ۷۰ پروتئین ریبوزومی حداقل ۱۵۰ RNA و پروتئین دیگر به طور موقتی با دو زیرواحدهای ریبوزوم در طی تجمع آنها ارتباط برقرار می‌کنند. علاوه بر این چندین باز و ریبوز RNAهای بالغ تغییر می‌یابند تا عملکردشان در سنتز پروتئین بهینه گردد. اگر چه اکثر مراحل سنتز و تجمع زیرواحد ریبوزومی در هستک (زیرساختار هسته‌ای که با غشا احاطه نشده است) صورت می‌گیرد ولی بعضی از مراحل آن در نوکلئوپلاسم و طی عبور از هستک به کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای انجام می‌شود. مراحل کنترل کیفی قبل از خروج هسته صورت می‌گیرد به طوریکه فقط زیرواحدهای دارای عملکرد به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند. در سیتوپلاسم مراحل نهایی بلوغ زیرواحد ریبوزومی صورت می‌گیرد. tRNAها نیز از رونوشت‌های پیش‌ساز اولیه خود در هسته پردازش و تا حدود زیادی تغییر یافته و سپس به سیتوپلاسم منتقل و در سنتز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرند. ابتدا مراحل پردازش و تغییرات tRNA و تجمع ریبوزوم و خروج آنها از هسته اشاره خواهد شد. سپس پردازش و تغییرات tRNA را مطالعه خواهیم کرد.

ژن‌های rRNA اولیه به صورت سازمان دهنده‌های هستکی عمل کرده و در همه یوکاریوت‌ها مشابه هم هستند

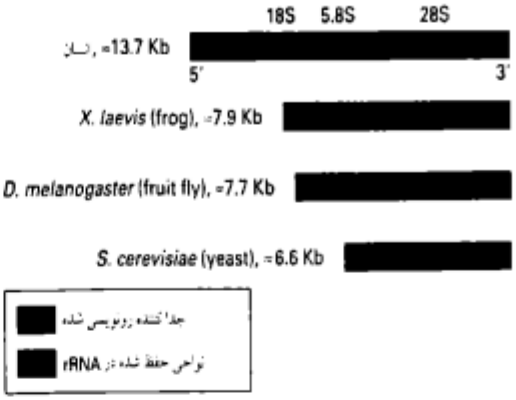
در یوکاریوت‌های عالی ۵/۸s rRNA و ۲۸s با زیرواحد بزرگ ریبوزومی (۶۰s) و ۱۸s rRNA با زیرواحد کوچک (۴۰s) (rRNAها معادل از لحاظ عملکرد در یوکاریوت‌های دیگر) مجتمع شده و بوسیله یک نوع واحد رونویسی رمزدهی می‌شوند. در سلول‌های انسانی، رونویسی توسط RNA پلیمراز I، رونوشت اولیه ۴۵s (حدود ۱۳/۷kb) را تولید می‌کند که در نهایت به rRNAهای بالغ ۵/۸s و ۱۸s و ۲۸s تبدیل می‌شود. این rRNAها در ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی یافت نمی‌شود. تعیین توالی DNA رمزدهی‌کننده rRNA اولیه از گونه‌های مختلف نشان داد این DNA دارای یکسری خصوصیات مشترک در همه یوکاریوت‌هاست. اولاً ژن‌های rRNA اولیه به صورت آرایش‌های پشت سر هم بلند بوده و توسط نواحی غیرقابل رونویسی از یکدیگر جدا می‌شوند. طول این نواحی در قورباغه تقریباً ۲۴kb و در انسان



▲ **شکل تجربی ۳۳-۸ میکروگراف الکترونی واحدهای رونویسی rRNA اولیه در هستک قورباغه.** هر بخش پرمانند چندین مولکول rRNA اولیه رانشان می‌دهد که با پروتئین در کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین اولیه (pre-RNP) تجمع یافته‌اند. این در اثر رونویسی یک واحد رونویسی ایجاد شده است. بخش گره‌مانند درانتهای ′۵ RNP اولیه نوظهور به نظر می‌رسد که پردازشگر باشد. واحدهای رونویسی rRNA اولیه به صورت پشت سر هم آرایش یافته و بوسیله نواحی غیرقابل رونویسی از هم جدا شده‌اند.

۳۰kb است. (شکل ۳۳-۸). ثانیاً نواحی ژنومی مربوط به سه rRNA بالغ، همیشه در جهت ′۳ ← ′۵ به صورت ۱۸s و ۵/۸s و ۱۸s آرایش یافته‌اند و ثالثاً در همه سلول‌های یوکاریوتی (و حتی در باکتریها) ژن rRNA نواحی را رمزدهی می‌کند که در طی پردازش حذف‌شده و سریعاً تجزیه می‌گردند. این نواحی احتمالاً برای تا خوردن صحیح rRNA هالازمند اما احتمالاً بعد از تاخوردگی دیگر لازم نیستند. ساختار عمومی rRNAهای اولیه در شکل ۳۴-۸ نشان داده است.

سنتز و اغلب مراحل پردازش rRNA اولیه در هستک صورت می‌گیرد. وقتی برای اولین بار ژن‌های rRNA اولیه در هسته از طریق هیبریداسیون در جا شناسایی شدند، هنوز مشخص نبود که آیا DNA دیگری نیز برای تشکیل هستک لازم است یا نه؟ آزمایشات بعدی با سویه‌های تراریخت دروزوفیلا نشان داد یک واحد رونویسی کامل rRNA



▲ **شکل ۳۴-۸ ساختار عمومی واحدهای رونویسی rRNA اولیه یوکاریوتی.** سه ناحیه رمزدهی کننده وجود دارد که ۲۸s rRNA و ۵/۸s و ۱۸s را رمزدهی می‌کنند. این rRNA در ریبوزوم سلول‌های یوکاریوتی پیشرفته و معادل آنها در سایر گونه‌ها وجود دارد. ترتیب این نواحی رمزدهی کننده در ژنوم همیشه در جهت ′۳ ← ′۵ است. تغییر در طول نواحی جداکننده قابل رونویسی به دلیل تفاوتهایی است که در طول واحدهای رونویسی rRNA اولیه در موجودات مختلف وجود دارد.

اولیه باعث القاء تشکیل یک هستک کوچک می‌شود. پس یک ژن rRNA اولیه برای ایجاد **سازمان دهنده هستکی**[1] کافی بوده و سایر اجزای ریبوزومی به طرف rRNA اولیه تازه سنتز شده حرکت می‌کنند. ساختار هستک از مراحل پردازش rRNA اولیه تا تجمع زیرواحدهای ریبوزومی با میکروسکوپ نوری و الکترونی مشاهده شده است.

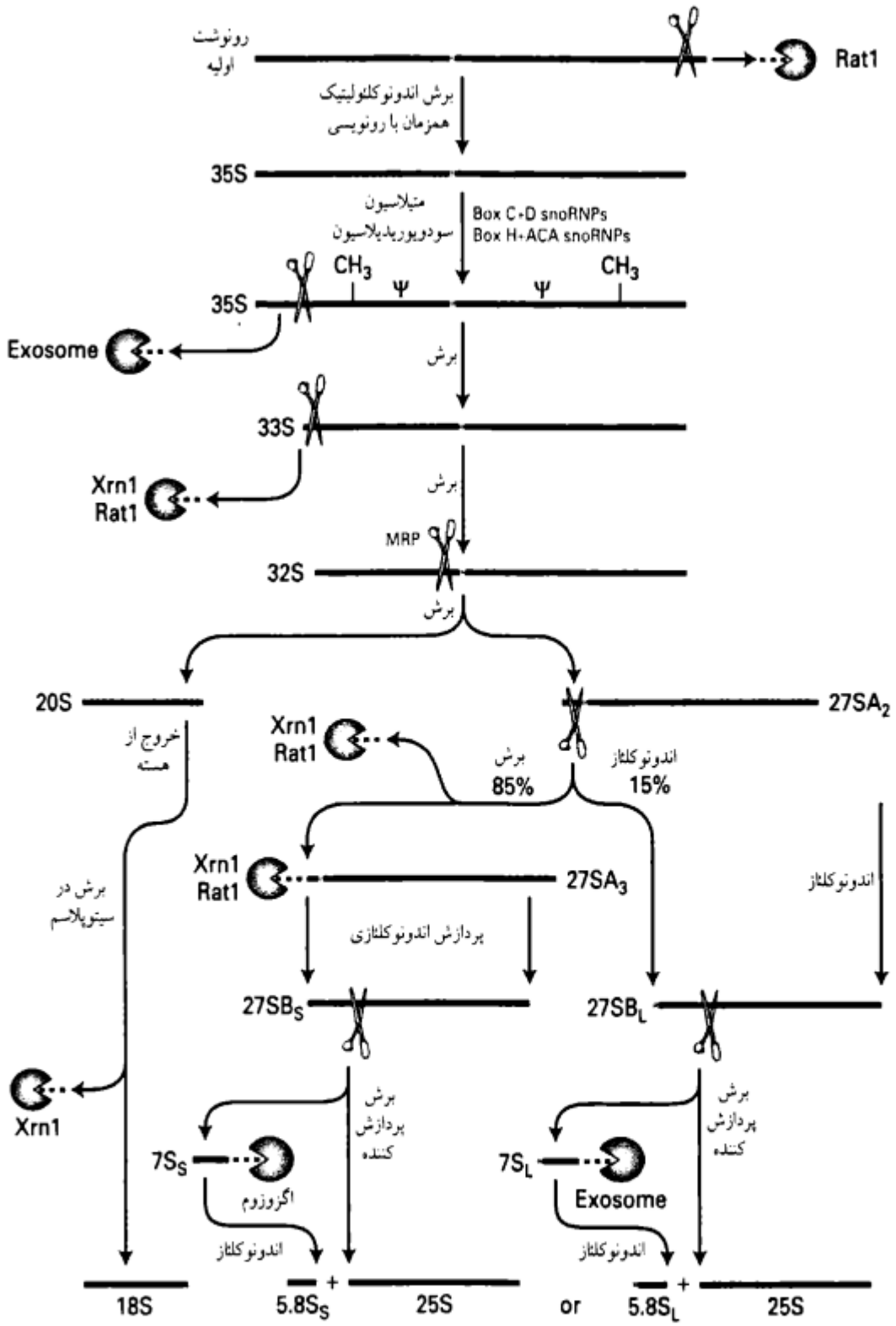
RNA های کوچک هستکی در پردازش rRNA های اولیه مشارکت دارند

گردهمایی تجمع زیرواحدهای ریبوزومی و بلوغ و خروج آنها به سیتوپلاسم به خوبی در ساکارومایسس سرویزیه شناخته شده است. با این حال در یوکاریوت‌های پرسلولی تقریباً همه پروتئین‌ها و RNA های درگیر به شدت حفاظت شده‌اند. بنابراین احتمالاً نمای اصلی بیوسنتز ریبوزوم مشابه است. مانند mRNA اولیه، رونوشت نوظهور rRNA اولیه سریعاً به پروتئین‌ها متصل شده و ذرات ریبونوکلئوپروتئین پیش‌ریبوزومی (pre-RNP) را تشکیل می‌دهد. به دلایل نامعلوم، برش rRNA اولیه تا زمانیکه رونویسی rRNA اولیه کامل نشود، صورت نمی‌گیرد. درمخمر، رونویسی rRNA اولیه تقریباً شش دقیقه طول می‌کشد. وقتی رونویسی کامل شد، rRNA بریده شده و بازها و ریبوزها در عرض ۱۰ ثانیه تغییر می‌یابند. در سلول مخمر با رشد سریع، در هر ثانیه حدود ۴۰ جفت زیرواحد ریبوزومی سنتز، پردازش، و به سیتوپلاسم انتقال داده می‌شود. این سرعت بسیار بالای سنتز ریبوزوم در برابر دوره به ظاهر طولانی رونویسی rRNA اولیه امکانپذیر است زیرا ژن‌های rRNA اولیه با مولکول‌های RNA پلیمراز I که به طور همزمان‌یک ژن را رونویسی می‌کنند، پوشاننده می‌شود (شکل ۳۳-۸) و همچنین ۲۰۰-۱۰۰ تا از این ژن‌ها بر روی کروموزومهای XII سازمان‌دهنده هستکی مخمر وجود دارد.

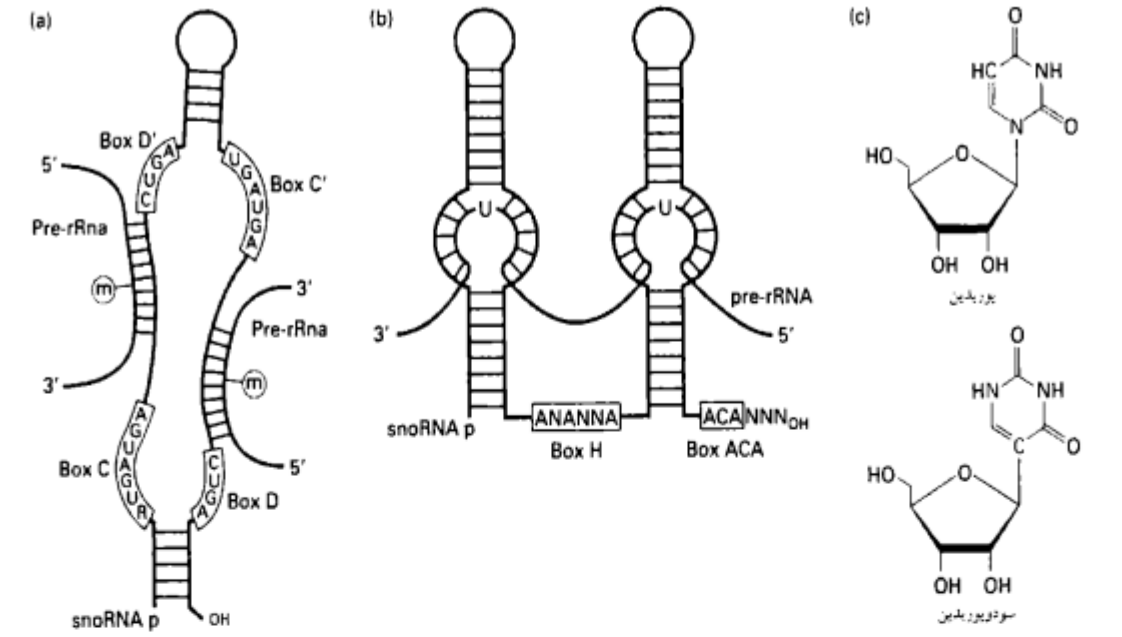
رونوشت اولیه ۷kb در مراحل مختلف برش اگزونوکلئولیتیک بریده شده و سرانجام rRNA های بالغ موجود در ریبوزومها را به وجود می‌آورند (شکل ۳۵-۸). در طی پردازش، rRNA اولیه به شدت تغییر می‌یابد این تغییرات اکثراً متیلاسیون گروه ′۲ - هیدروکسیل ریبوزومهای ویژه و تبدیل واحد یوراسیل ویژه به سودویوریدین است. این تغییرات بعد از رونویسی rRNA احتمالاً برای سنتز پروتئین اهمیت دارند زیرا این تغییرات به شدت حفاظت شده‌اند.

تقریباً این تغییرات در ساختار مرکزی حفاظت شده ریبوزوم صورت می‌گیرد که مستقیماً در سنتز پروتئین دخالت می‌کند. موقعیت جایگاههای ویژه ′۲ - o - متیلاسیون و سودویوریدین تقریباً با ۱۵۰ گونه RNA کوچک محدود به هستک به نام RNA **های کوچک هستکی**[2] (snoRNA) شناسایی شده‌اند. این RNA ها به طور موقت با RNA های اولیه هیبرید تشکیل می‌دهند. مثل snRNA ها که در پردازش mRNA های اولیه دخالت می‌کنند snoRNA ها با پروتئین‌ها مجتمع شده و ذرات ریبونوکلئوپروتئینی بنام snoRNP را تشکیل می‌دهند. یک کلاس از ۴۰ کلاس snoRNPs ها (snoRNA D + جعبه C) آنزیم متیل ترانسفراز را نزدیک جایگاه متیلاسیون mRNA اولیه قرار می‌دهد. snoRNA های جعبه C+D مختلف متیلاسیون را به جایگاههای مختلف از طریق مکانیسم مشابه هدایت می‌کنند. آنها معمولاً ویژگی‌های ساختاری و توالی مشترکی را شناسایی کرده و به مجموعه‌ای مشترک از پروتئین متصل می‌شوند. یک یا دو ناحیه از هر یک از این snoRNA ها دقیقاً مکمل جایگاه‌هایی در RNP اولیه بوده و استیل ترانسفراز را به طرف ریبوزومهای ویژه در ناحیه هیبریدی هدایت می‌کنند(شکل a ۳۶-۸). گروه اصلی دوم snoRNP ها (snoRNA ACA+ جعبه H) آنزیم تبدیل‌کننده یوریدین به سودویوریدین را پیدا می‌کنند. تبدیل یوریدین به سودویوریدین شامل چرخش حلقه پیریمیدنی بوده

1- Nucleolar organizer 2- Small nucleolar RNAs



▲ **شکل ۳۵-۸ پردازش rRNA** . اندوریبونوکلئاز در داخل rRNA برش ایجاد می‌کنند (با قیچی نشان داده شده) اگزوریبونوکلئازها که از یک انتها مولکول را تجزیه می‌کنند (′۵ یا ′۳) با Ψpac-men نمایش داده شده است. اکثر متیلاسیون ′۲-O-ریبوز و تولید سودویوریدین در rRNA ها بدنبال برش در ناحیه ′۳ قبل از برش در انتهای ′۵، روی می‌دهد. پروتئین‌ها و snoRNPهای شرکت‌کننده در این مراحل مشخص شده‌اند.



▲ **شکل ۳۶-۸ تغییرات pre-rRNP از طریق snoRNP.** (a) snoRNAای به نام boxC+D در متیلاسیون ′۲-o-ریبوز دخالت می‌کند. توالی‌های این snoRNA با دو ناحیه مختلف در rRNA اولیه هیبرید تشکیل داده و متیلاسیون را به جایگاههای مشخص هدایت می‌کنند. (b) snoRNA ACA + جعبه H به صورت دو حلقه و ساقه با برآمدگی‌های درونی تک رشته‌ای در ساقه تا می‌خورد. rRNA اولیه با برآمدگی‌های تک‌رشته‌ای هیبرید تشکیل داده و جایگاه سودویوریدیله شدن را مشخص می‌کند. (c) تبدیل یوریدین به سودویوریدین توسط snoRNA ACA+ جعبه H قسمت (b) جهت‌دهی می‌شود.

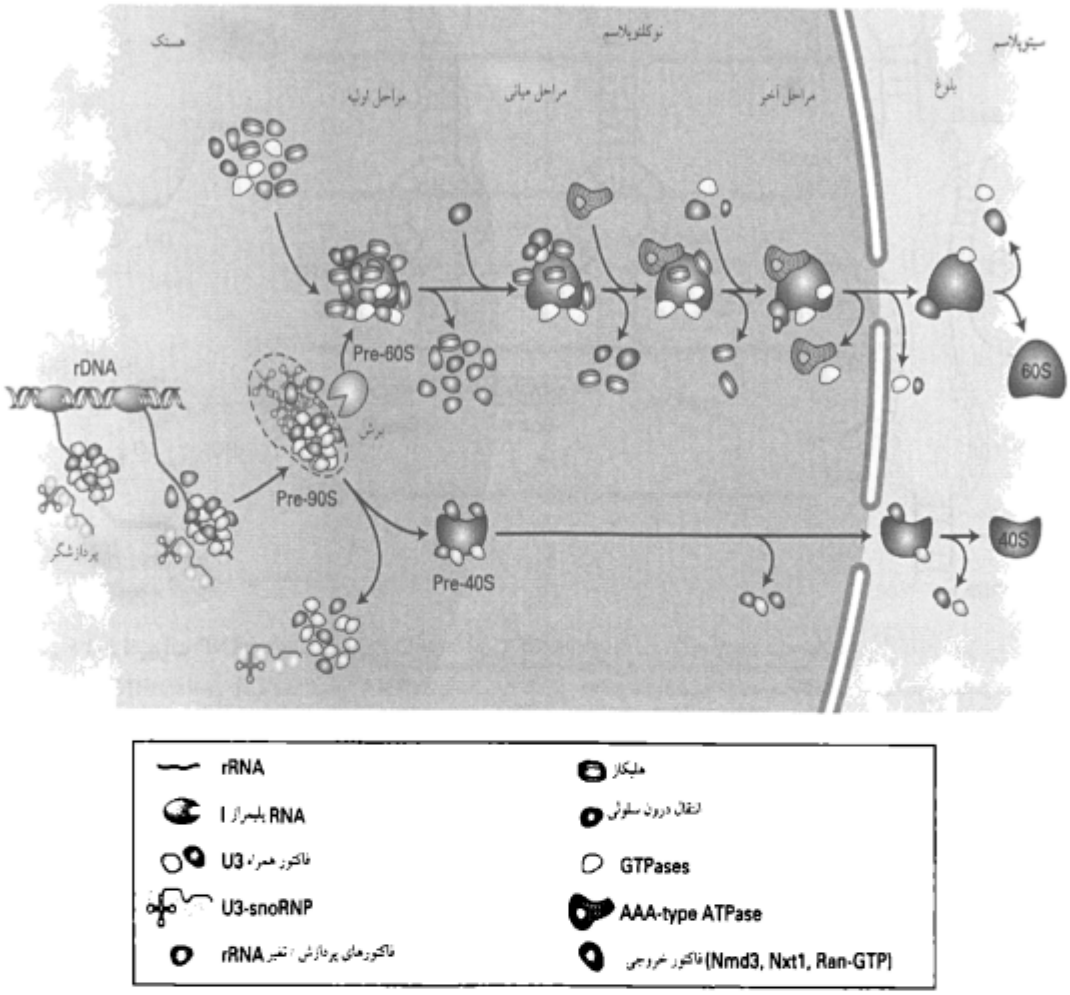
(۸-۳۶c) و بازهای اطراف یوریدین تغییر یافته در rRNA اولیه، با بازهای قسمت برآمده ساقه در snoRNAها H+ACA جفت باز تشکیل می‌دهد. باز یوریدین تغییریافته از ناحیه دورشته مارپیچی همانند باز آدنین در نقطه انشعاب mRNA اولیه در حال پیرایش با اسپلایسوزوم به صورت یک برآمدگی بیرون می‌افتد. مانند نقطه انشعاب mRNA اولیه در حال پیرایش اسپلایسوزوم، تغییرات‌دیگری در نوکلئوتیدهای rRNA اولیه مثل دی‌متیلاسیون آدنین توسط پروتئین‌های ویژه بدون دخالت و راهنمایی snoRNA صورت می‌گیرد.

U3snoRNA به صورت یک SnoRNP بزرگ تقریباً با ۲۵ پروتئین بنام پردازشگر[1] مجتمع شده و به طور اختصاصی در جایگاه A_0 برش ایجاد می‌کند (اولین برش در نزدیک انتهای ′۵ rRNA اولیه) (شکل ۸.۳۵). U3snoRNA با ناحیه فرادست rRNA اولیه جفت باز تشکیل می‌دهد تا موقعیت برش را اختصاصی کند. به نظر می‌رسد که پردازشگر یک گره ′۵ را تشکیل می‌دهد که در میکروگراف‌های الکترونی mRNP قابل مشاهده است. (شکل ۸-۳۳) جفت شدن بازهای snRNPهای دیگر نواحی برش دیگری را مشخص می‌کند که باعث حذف نواحی جداکننده رونویسی می‌شود. اولین برش جهت شروع پردازش rRNA، ۵/۸s و ۲۵s زیرواحد بزرگ با rRNA از MRP انجام می‌شود rRNA از MRP کمپلکسی از ۹ پروتئین به همراه یک RNA است. وقتی اولین برش در rRNAهای اولیه ایجاد شد، این توالی‌ها توسط اگزونوکلئازهای هسته‌ای ′۵ → ′۳ مشابه همراه با اگزوزوم، اینترون‌های جداشده از mRNA اولیه را تجزیه می‌کند. اگزوریبونوکلئاز هسته‌ای ′۳ → ′۵ (Rat 1;Xrn1) نیز بعضی از نواحی جداکننده ′۵ را حذف می‌کند.

بعضی از snRNA در اثر رونویسی از پروموترشان توسط RNA پلیمراز II و III ایجاد می‌شوند. با این حال تعداد زیادی از snoRNAها در اثر پردازش اینترون‌های پیرایش یافته ژن‌های رمزدهی‌کننده mRNAهای دخیل در سنتز پروتئین ریبوزوم یا ترجمه به وجود می‌آیند. بعضی از snoRNAها نیز از اینترون‌های پیرایش یافته mRNAهای به ظاهر غیرعملکردی ایجاد می‌شوند. ژن‌های رمزدهی کننده این mRNAها به نظر می‌رسد فقط برای بیان snoRNAها از اینترون‌های جداشده، آنها بوجود می‌آیند.

برخلاف ژن‌های rRNA اولیه، ژن‌های ۵S rRNA توسط RNA پلیمراز III در خارج از هستک و در نوکلئوپلاسم رونویسی می‌شوند. فقط با اندکی پردازش و حذف نوکلئوتیدها در انتهای ′۳،

1- Processome

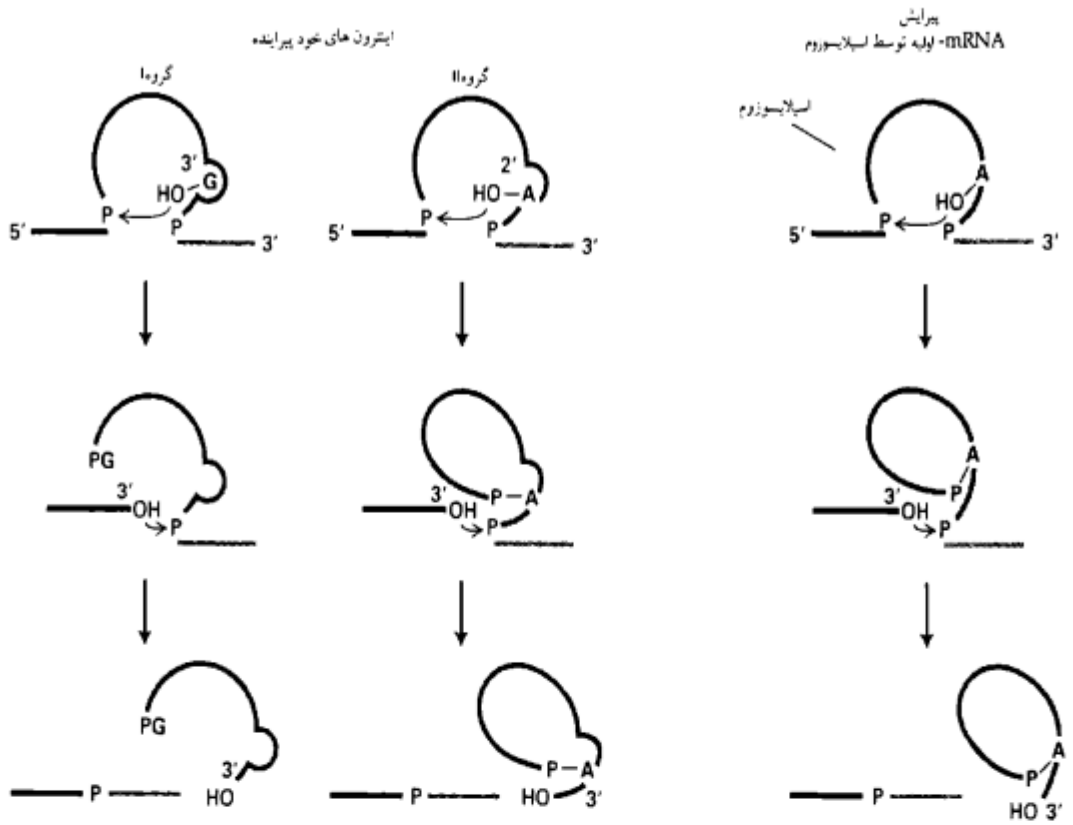


▲ **شکل ۳۷-۸ (شکل رنگی) تجمع زیرواحد ریبوزومی.** پروتئین‌ها و RNAهای ریبوزومی درزیرواحدهای کوچک و بزرگ ریبوزومی به صورت آبی مشخص شده‌اند و شکلی مشابه با شکل زیرواحدهای بالغ در سیتوپلاسم دارند. سایر فاکتورهایی که به طور موقت با زیرواحدهای در حال بلوغ تجمع می‌یابند با رنگهای مختلف نشان داده شده‌اند.

5srRNA به هسته منتشر شده و با پیش‌ساز rRNAها تجمع یافته و همراه ناحیه‌ای که برای ایجاد پیش‌ساز زیرواحد بزرگ ریبوزوم بریده می‌شود باقی می‌ماند.

اکثر پروتئین‌های ریبوزومی زیرواحد کوچک ۴۰S ریبوزومی با mRNA اولیه در هنگام رونویسی تجمع می‌یابند. (شکل ۳۷-۸). برش طول کامل rRNA اولیه در پیش‌ساز 90 sRNP باعث رهاشدن پیش ذره ۴۰S می‌گردد که فقط به چند مرحله بازآرایی قبل از ورود به سیتوپلاسم نیاز دارند. وقتی اولین پیش‌ذره ۴۰S، هسته را ترک، و سریعاً از نوکلئوپلاسم عبور کرده و از طریق کمپلکس منفذ هسته‌ای خارج می‌شود، بلوغ نهایی زیرواحد کوچک ریبوزومی در سیتوپلاسم روی می‌دهد. پردازش اگزونوکلئولیتیک 20srRNA به صورت 18srRNA بالغ زیرواحد کوچک توسط اگزوریبونوکلئاز ۵′ → ۳′ سیتوپلاسمی xrn1 و دی متیلاسیون دو آدنین مجاور و نزدیک انتهای ۳′ 18sRNA توسط آنزیم سیتوپلاسمی Dix1 انجام می‌گیرد.

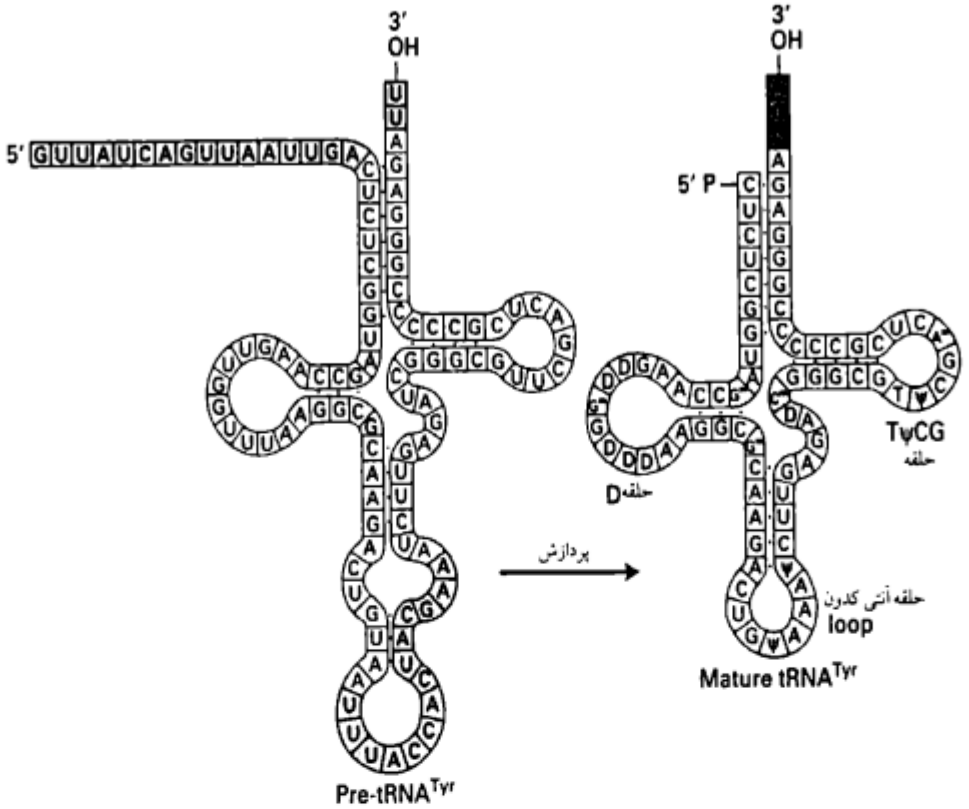
برخلاف ذره ۴۰S اولیه پیش‌ساز زیرواحد بزرگ قبل از بلوغ کامل و ورود به سیتوپلاسم از طریق میانکنش‌های گذرا با پروتئین‌های غیرریبوزومی به بازآرایی‌های زیادی نیاز دارد. بنابراین دوره زمانی طولانی‌تر برای بلوغ زیرواحد ۶۰S نسبت به ۴۰S لازمست (۳۰ دقیقه در مقابل ۵ دقیقه برای خروج زیرواحد کوچک در سلول‌های کشت شده انسان) تا اینکه در هسته ظاهر شود. چند RNA هلیکاز و G پروتئین‌های کوچک با زیرواحدهای ۶۰s اولیه در حال بلوغ تجمع می‌یابند. بعضی از RNA هلیکازها برای برداشتن snoRNA هایی که به طور کامل در بیش از ۳۰ جفت باز با



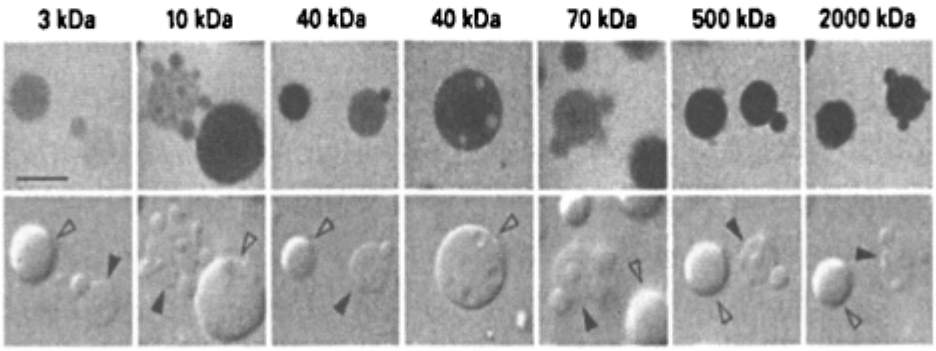
▲ **شکل ۳۸-۸ (شکل رنگی) مکانیسم‌های پیرایشی در اینترون‌های خودپیراینده گروه I و II و پیرایش کاتالیز شده با اسپلایسوزوم در mRNA اولیه.** اینترون به رنگ خاکستری نشان داده شده است. اگزون‌هایی که باید به هم متصل شوند قرمز رنگ هستند. در اینترون‌های گروه I فاکتور گوانوزینی (G) که بخشی از زنجیره RNA نیست به جایگاه فعال وارد می‌شود. گروه هیدروکسیل ′۳- این گوانوزین در واکنش ترانس استریفیکاسیون با فسفات انتهای ′۵ اینترون شرکت می‌کند. این واکنش مشابه واکنش گروه هیدروکسیل ′۲ آدنین‌های محل انشعاب در اینترون‌های گروه II و اینترون‌های پیرایش‌یافته mRNP اولیه اسپلایسوزوم است. واکنش بعدی ترانس استریفیکاسیون که اگزون ′۵ و ′۳ را به یکدیگر پیوند می‌دهد در هر سه مکانیسم پیرایشی مشابه است. توجه کنید اینترون‌های گروه I جدا شده که در اثر پیرایش برخلاف اینترون‌های شاخه‌دار جدا شده در دو مورد دیگر ساختارهای خطی دارند.

rRNA اولیه هیبرید شده‌اند، لازم است. سایر RNA هلیکازها احتمالاً در از بین رفتن میانکنش‌های RNA - پروتئین دخالت می‌کنند. نیازمند به بسیاری از GTP آزها این نکته را بیان می‌کند که نقاط کلیدی کنترل کیفی زیادی در تجمع و بازآرایی RNP زیرواحد بزرگ ریبوزوم وجود دارد. بطوریکه یک مرحله باید قبل از فعال شدن GTP آز کامل گردد تا امکان پیشرفت مرحله بعد ایجاد شود. اعضای خانواده ATP آز AAA نیز به طور موقت متصل می‌شوند. این گروه پروتئین‌ها غالباً در حرکت‌های مولکولی بزرگ دخالت نموده و احتمالاً برای تاخوردن کمپلکس rRNA بزرگ به کنفورماسیون صحیح مورد نیاز هستند. بعضی از مراحل بلوغ زیرواحد ۶۰S در نوکلئوپلاسم طی عبور از هستک به کمپلکس منافذ هسته‌ای صورت می‌گیرد (شکل ۳۷-۸) سایر فرآیندهای جذاب و ضروری بازآرایی که در طی تشکیل زیرواحدهای ریبوزومی روی می‌دهد باید شناسایی گردند.

زیرواحد بزرگ ریبوزومی یکی از بزرگترین ساختارهایی است که از کمپلکس منفذ هسته‌ای باید عبور کند. بلوغ زیرواحد بزرگ در نوکلئوپلاسم باعث ایجاد جایگاههای اتصالی برای مولکول سازگارکننده خروج از هسته بنام Nmd3 می‌شود. Nmd3 به ناقل هسته‌ای اکسپورتین ۱ (Crm1 نیز نامیده می‌شود) متصل می‌شود. این یک مرحله دیگر کنترل کیفی است زیرا فقط زیرواحدهای صحیح تجمع یافته می‌توانند به Nmd3 متصل و خارج شوند. زیرواحد کوچک خارج‌کننده mRNP(Nxt1) نیز به زیرواحد بزرگ تقریباً بالغ متصل می‌شود. این ناقلین هسته‌ای با دمین‌های FG در نوکلئوپورین‌های FG میانکنش می‌دهند. این مکانیسم امکان نفوذ پذیری را به شبکه مولکولی سازنده کانال مرکزی NPC می‌دهد. چندین نوکلئوپورین ویژه بدون دمین FG نیز در خروج زیرواحدهای



▲ **شکل ۳۹-۸ (شکل رنگی) تغییرات روی تیروزین tRNA در طی پردازش.** اینترون ۱۴ نوکلئوتیدی (آبی) موجود در حلقه آنتی کدون با پیرایش حذف می‌شود. توالی ۱۶ نوکلئوتیدی (سبز) در انتهای ′۵ توسط RNase P بریده می‌شود. در انتهای ′۳ توالی CCA به جای رزیدوهای یوراسیلی جایگزین می‌شود و در همه tRNA های بالغ یافت می‌شود. تعداد زیادی از بازهای ساقه حلقه به بازهای تغییریافته خاصی تبدیل می‌شوند. همه tRNA های اولیه دارای اینترون نمی‌باشند که در اثر پردازش برداشته شوند ولی همه آنها یکی از انواع تغییرات نشان داده شده در اینجا را پشت سر می‌گذارند. D = دی هیدروپوریدین، Ψ = سودوپوریدین.



▲ **شکل ۴۰-۸ اجسام هسته‌ای به صورت متفاوت نسبت به مولکولهای موجود در توده نوکلئوپلاسمی نفوذپذیر می‌باشند.** هر جفت از مربع‌ها یک ناحیه مجزا در هسته اووسیت زنوپوس را نشان می‌دهد که قبلاً دکستران فلورسانت با وزن مولکولی مشخص (KD ۲۰۰۰-۳) تزریق شده است. هر قسمت از مربع فوقانی تصویر مرکزی است که در آن شدت فلورسانت مقیاس غلظت دکستران است. (نواحی تاریکتر نواحی را نشان می‌دهد که دکستران خارج شده است) هر کدام از مربع‌های زیرین تصویر مقایسه‌ای از یک زمینه است، پیکان توخالی هستک را نشان می‌دهد. پیکانهای توپُر اجسام کاژال (CBs) را مشخص می‌کند که به خال‌های هسته‌ای متصل بوده و در اووسیت زنوپوس نسبت به اکثر سلول‌های سوماتیک بزرگتر هستند. دکستران با وزن مولکولی کم (۳ KD) تقریباً به طور کامل بدرون CBs نفوذ می‌کند اما از هستک و خالهای هسته‌ای رانده می‌شود. ممانعت از ورود دکستران با افزایش وزن مولکولی افزایش می‌یابد.

ریبوزومی مورد نیاز است و احتمالاً وظایف ویژه دیگری برای انجام این عمل دارد. ابعاد زیرواحدهای ریبوزومی (قطری حدود ۳۰-۲۵ نانومتر) و کانال مرکزی NPC قابل مقایسه‌اند به‌طوریکه عبور از کانال هیچ تخریبی را در کانال یا زیرواحد ریبوزومی ایجاد نمی‌کند. بلوغ نهایی زیرواحد بزرگ در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد و شامل حذف این فاکتورهای خارج کننده است. برای انتقال اکثر ماکرومولکول‌ها از هسته مثل tRNA و miRNA اولیه (نه اکثر mRNPها) زیرواحد ریبوزومی نیازمند عمل G پروتئینی کوچک بنام Ran است که در فصل ۱۳ توضیح داده می‌شود.

اینترون‌های خود پیراینده گروه I اولین مثال RNA از کاتالیزی هستند

طی سالهای ۱۹۷۰ کشف شد که ژن‌های rRNA اولیه پروتوزوای تتراهیمنا ترموفیلا دارای یک اینترون هستند. تحقیقات دقیق نشان داد حتی یک ژن rRNA اولیه بدون توالی اضافی وجود ندارد و این نشان می‌داد که پیرایش برای تولید rRNA بالغ در این موجودات لازم است. در ۱۹۸۲ مطالعات در آزمایشگاه نشان داد rRNA اولیه در غیاب هر گونه پروتئینی در جایگاه صحیح خود پیرایش می‌یابد و برای اولین بار نشان داد که RNA می‌تواند به عنوان یک مولکول کاتالیزی مثل آنزیم عمل کند.

بعداً کل توالی خودپیراینده در RNA های اولیه سایر موجودات تک‌سلولی در rRNA اولیه میتوکندری و کلروپلاست، در چند mRNA اولیه حاصل از باکتریوفاژهای خاص *E. coli* و در بعضی از رونوشت‌های اولیه tRNA باکتریایی یافت شد. این توالی خودپیراینده در همه پیش‌سازها به عنوان اینترون گروه I شناخته شده و از گوانوزین به عنوان کوفاکتور استفاده کرده و می‌تواند با تشکیل جفت باز درون مولکولی، دو اگزونی که باید بهم متصل شوند به هم نزدیک کرده و تا بخورد. همانطوریکه قبلاً بحث شد mRNA های اولیه کلروپلاست و میتوکندری و tRNA ها دارای نوع دومی از اینترون‌های خودپیراینده بنام اینترون گروه II هستند.

مکانیسم‌های پیرایش به کار برده شده توسط اینترون‌های گروه I، اینترون‌های گروه II و اسپلایسوزوم‌ها عموماً مشابه بوده و شامل دو واکنش ترانس استریفیکاسیون است که نیازی به انرژی ندارد. (شکل ۳۸-۸). مطالعات ساختاری اینترون‌های گروه rRNA I اولیه در تتراهمینا به همراه آزمایشات جهش‌زایی و بیوشیمیایی نشان داد که RNA به صورت ساختارهای سه‌بعدی دقیق مانند آنزیم‌ها تا خورده و دارای شیارهای عمیق برای اتصال سوبسترا و نیز نواحی غیرقابل دسترس به حلال که در کاتالیز دخالت می‌کند، است. اینترون‌های گروه I مانند متالوآنزیم اتم‌های شرکت کننده در دو واکنش ترانس استریفیکاسیون را نزدیک یونهای Mg^{2+} کاتالیزی بطور دقیق جهت‌دهی می‌کنند. امروزه شواهد قابل‌توجهی نشان می‌دهد که پیرایش با اینترون‌های گروه II و توسط snRNA ها موجود در اسپلایسوزوم نیز یونهای Mg^{2+} کاتالیتیک را دارند. در هر دو گروه اینترون‌های خودپیراینده و احتمالاً در اسپلایسوزوم، RNA به عنوان **ریبوزیم** یک توالی RNA که قدرت کاتالیزی دارد عمل می‌کند.

tRNA های اولیه متحمل تغییرات زیادی در هسته می‌شود

tRNA های بالغ میتوزی که به طور میانگین ۸۰-۷۵ نوکلئوتید طول دارند از پیش‌ساز بزرگتر (tRNA اولیه) توسط RNA پلیمراز III در نوکلئوپلاسم سنتز می‌شوند. tRNA های بالغ همچنین تعداد زیادی باز تغییر یافته دارند که در رونوشت اولیه tRNA وجود ندارند. برش و تغییرات بازها در طول پردازش همه tRNA های اولیه صورت می‌گیرد بعضی از tRNA ها طی پردازش، پیرایش می‌یابند. همه این رویدادهای پردازشی و تغییرات، در هسته اتفاق می‌افتد.

توالی ′۵ با طول متغیر که در tRNA های بالغ وجود ندارد در همه tRNA های اولیه موجود است (شکل ۳۹-۸). این پدیده بعلت آنست که برش اگزونوکلئولیتیک انتهای ′۵ در tRNA بالغ به جای جایگاه شروع رونویسی به وسیله ساختار سه‌بعدی tRNA مشخص می‌شود. نوکلئوتیدهای اضافی توسط ریبونوکلئاز P (RNase P) که یک ریبونوکلئوپروتئین اندونوکلئاز است، حذف می‌شوند. مطالعاتی که با RNase P حاصل از *E. coli* صورت گرفت نشان داد، در غلظت بالای Mg^{2+}، RNA به تنهایی می‌تواند tRNA های اولیه را شناسایی کرده و ببرد. پلی پپتید RNase P سرعت برش را توسط RNA افزایش داده و باعث پیشروی واکنش در غلظت فیزیولوژیکی Mg^{2+} می‌گردد. RNase P مشابهی نیز در یوکاریوت‌ها عمل می‌کند.

تقریباً ۱۰ درصد بازهای موجود در tRNA های اولیه توسط آنزیم‌ها در طی پردازش تغییر می‌یابند. سه کلاس از تغییر باز وجود دارد: (۱) رزیدوهای U در انتهای ′۳ اولیه با توالی CCA جایگزین می‌شوند. توالی CCA در انتهای ′۳ همه tRNA ها یافت می‌شود و برای انتقال اسیدآمینه به tRNA توسط آمینواسیل tRNA سنتتاز در هنگام سنتز پروتئین لازم است. این مرحله در سنتز پروتئین احتمالاً به عنوان یک نقطه کنترل کیفی عمل می‌کند زیرا فقط

tRNAهای درست تاخورده توسط آنزیم افزاینده CCA شناسایی می‌شوند. (۲) افزودن گروه متیل و ایزوپنتیل به حلقه هتروسیکلیک بازهای پورین و متیلاسیون گروه OH-۲′ در ریبوز هر رزیدو (۳) تبدیل یوریدین‌های خاص به دی‌هیدرویوریدین، سودویوریدین یا ریبوتیمیدین. وظایف این بازها و قندهای تغییریافته به خوبی شناخته نشده است، اما آنها به شدت حفاظت شده‌اند و احتمالاً تأثیر مثبتی در سنتز پروتئین دارند.

همانطور که در شکل ۳۹-۸ نشان داده شده، tRNA اولیه بیان شده ناقل تیروزین ($tRNA^{Tyr}$) دارای یک اینترون ۱۴ بازی است که در tRNA بالغ وجود ندارد. سایر ژن‌های tRNA یوکاریوتی و بعضی از ژن‌های tRNA در آرکئاها نیز دارای اینترون هستند. اینترون‌های موجود در tRNAهای اولیه هسته‌ای، کوتاهتر از mRNPهای اولیه بوده و فاقد توالی‌های مورد توافق جایگاه پیرایشی موجود در mRNAهای اولیه هستند اینترون‌های tRNA اولیه به طور واضح از اینترون‌های خودپیراینده گروه I و II موجود در tRNAهای اولیه میتوکندری و کلروپلاست متفاوتند .

مکانیسم پیرایش tRNA اولیه در سه نکته اساسی از روش پیرایشی اینترون‌های خودپیراینده و اسپلایسوزوم تفاوت دارد (شکل ۸.۳۸ را ملاحظه کنید). اولاً پیرایش tRNA اولیه توسط پروتئین انجام می‌شود نه RNAها. ثانیاً اینترون tRNA اولیه در مرحله اول جدا می‌شود که مستلزم برش همزمان در دو انتهای اینترون است. نهایتاً هیدرولیز GTP و ATP برای اتصال دو نیمه tRNA ایجادشده در اثر برش در طرفین اینترون لازم است.

بعداز اینکه tRNAهای اولیه در توکلئوپلاسم پردازش یافتند، tRNAهای بالغ از طریق کمپلکس منفذ هسته‌ای و بوسیله اکسپورتین - t به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند. در سیتوپلاسم tRNAها بین آمینواسیل - tRNA سنتتاز، فاکتورهای ادامه ترجمه و ریبوزوم طی سنتز پروتئین جابجا می‌شوند (فصل ۴). پس tRNAها عموماً با پروتئین‌ها مجتمع شده و مدت زمان کمی به صورت آزاد در سلول هستند. این حالت در مورد mRNA و rRNAها هم دیده می‌شود.

اجسام هسته‌ای دُمین‌های هسته‌ای تخصص یافته از لحاظ عملکردی هستند

مشاهده هسته سلول‌های جانوری و گیاهی با میکروسکوپ الکترونی و با قدرت تفکیک بالا و سپس رنگ‌آمیزی آن با آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با مواد فلورسانس نشان داد در هسته علاوه بر مناطق کروموزومی و هستکی، دمین‌هایی نیز وجود دارند این دمین‌های ویژه هسته **اجسام هسته‌ای**[1] نامیده شده و با غشا احاطه نمی‌گردند بلکه نواحی با غلظت بالای پروتئین‌های ویژه و RNAها بوده و ساختارهای متمایز و کروی ناصاف در هسته تشکیل می‌دهند. برجسته‌ترین اجسام هسته‌ای هستک‌ها هستند که جایگاه سنتز زیرواحدهای ریبوزومی و تجمع آنها می‌باشند. چندین نوع دیگر از اجسام هسته‌ای در مطالعات ساختاری توضیح داده شده‌اند. آزمایشاتی که با پروتئین‌های هسته‌ای نشاندار با مواد فلورسانس انجام شد نشان داد، هسته یک محیط کاملاً پویا بوده و مولکول‌های پروتئینی سریعاً از نوکلئوپلاسم عبور می‌کنند. پروتئین‌های متصل به اجسام هسته‌ای اغلب در غلظت‌های پایینتر در نوکلئوپلاسم بیرون اجسام هسته‌ای دیده می‌شوند. مطالعات فلورسانس نشان داد این پروتئین‌ها بین درون و خارج اجسام هسته‌ای حرکت می‌کنند. بر اساس اندازه‌گیری حرکت مولکولی درسلول‌های زنده، اجسام هسته‌ای را می‌توان با مدل‌های ریاضی در حالت پایا پیش‌بینی شده برای انتشار پروتئین‌ها مدلسازی کرد. این پروتئین‌ها با تمایل کافی جهت تشکیل نواحی خود سازمان‌یافته از غلظت‌های زیاد پروتئین‌های ویژه میانکنش می‌دهند اما تمایل پایینی به یکدیگر داشته و به همین دلیل قادرند به بیرون و درون ساختار انتشار یابند. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد ظاهراً بن ساختارها ناهمگن بوده و شبکه‌ای اسفنج مانند از ترکیبات میانکنش دهنده هستند. در اینجا تعدادی کمی از این اجسام هسته‌ای به عنوان مثال‌هایی از دُمین‌های هسته‌ای را توضیح می‌دهیم.

اجسام کاژال[2] ساختارهای کروی ۰/۲-۱μm بوده و بیش از یک قرن پیش در هسته‌های بزرگ مشاهده شدند. (شکل ۴۰-۸). تحقیقات اخیر نشان داد همانند هستک، اجسام کاژال نیز مرکز تجمع کمپلکس RNP برای snRNPهای اسپلایسوزوم و سایر RNPهاست. مشابه rRNAها، snRNAها نیز یکسری تغییرات ویژه‌ای مثل تبدیل رزیدوهای یوریدینی خاص به سودویوریدین و افزایش گروه متیل به ′۲ - گروه‌های هیدروکسیل ریبوزهای ویژه را پشت سر می‌گذارند. این تغییرات پس ترجمه‌ای برای تجمع و عملکرد صحیح snRNAها در پیرایش mRNA اولیه مهم هستند. این تغییرات در اجسام کاژال صورت می‌گیرد که در آنجا آنها توسط یک گروه از مولکول‌های RNA راهنما شبیه به

1- Nuclear bodies 2-Cajal bodies

snRNA بنام *scaRNA*[1] هدایت می‌شود. همچنین شواهدی وجود دارد که جسم کاژال جایگاه تجمع مجدد کمپلکس‌های سه‌گانه U4/U6/U5 snRNP است. این کمپلکس‌ها برای پیرایش mRNA اولیه از U6/U5/U4 snRNP آزاد که طی حذف هر اینترون رها می‌شوند، لازم هستند (شکل ۸-۱۱ ملاحظه شود). اجسام کاژال دارای غلظت بالایی از U7snRNP هستند. این snRNP در پردازش انتهای ′۳ تخصص یافته RNA های هیستون اصلی دخالت دارد و احتمالاً این فرآیند نیز در اجسام کاژال به همراه تجمع RNP تلومراز انجام می‌گیرد.

خال‌های هسته‌ای[2] با استفاده آنتی‌بادی‌های نشاندار با مواد فلورسانس علیه پروتئین‌های snRNP و سایر پروتئین‌های درگیر در پیرایش mRNA اولیه بصورت ۵۰-۲۵ ساختار بی‌شکل و نامنظم، با قطر ۲μm-۰/۵ دیده می‌شوند که در نوکلئوپلاسم سلول‌های مهره‌داران پخش می‌شوند. چون خالهای هسته‌ای در نقاطی که رونویسی و پیرایش mRNA اولیه همزمان صورت می‌گیرد قرار ندارند تقریباً از نزدیک با کروماتین در ارتباط بوده و به نظر می‌رسد نواحی ذخیره snRNPها در پروتئین‌های درگیر در پیرایش mRNA اولیه بوده و در صورت نیاز به درون سیتوپلاسم آزاد می‌گردند.

اجسام هسته‌ای لوکمی پرومیلوسیت[3] **(PML)**. ژن PML برای اولین بار هنگامیکه انتقال کروموزومی درون ژن در سلول‌های لوکمی بیماران مبتلا به بیماری نادر لوکمی پرمیلوسیت (PML) مشاهده شد، شناسایی گردید. وقتی در مطالعات میکروسکوپی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی‌های ویژه پروتئین PML به کار برده شد مشخص گردید که این پروتئین در حدود ۱۰-۳۰ ناحیه کروی ناصاف و به قطر ۱μm-۰/۳ در هسته سلول‌های پستانداران جای گرفته است. وظایف مختلف برای اجسام هسته‌ای PML پیشنهاد شده است اما وظیفه مورد توافق همگان این است که این اجسام به عنوان جایگاه‌هایی برای تجمع و تغییر کمپلکس‌های پروتئینی درگیر در تعمیر DNA و القاء آپوپتوز عمل می‌کنند. پروتئین سرکوبگر تومور p53 در پاسخ به آسیب DNA، در اجسام هسته‌ای PML دچار تغییرات پس‌ترجمه‌ای فسفریلاسیون و استیلاسیون شده و توانایی‌اش در فعال‌کردن ژن‌های پاسخ‌دهنده به آسیب DNA، افزایش می‌یابد.

مطالعات اخیر نشان داد که اجسام هسته‌ای PML همچنین محل تغییر پس از ترجمه‌ای پروتئین باشند که طی آن یک مولکول پروتئینی کوچک شبیه یوبی‌کوئیتین بنام سامو۱[4] (SUMO1) به پروتئین اضافه شده و می‌تواند فعالیت و جای‌گیری درون سلولی پروتئین تغییریافته را کنترل کند. بسیاری از مهارکنندهای رونویسی ساموئیله بوده و جهش جایگاه ساموئیلاسیون آنها فعالیت مهاری آنها را کاهش می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد، اجسام هسته‌ای PML احتمالاً در مکانیسم مهار رونویسی دخالت می‌کرده و بایستی به خوبی مطالعه شوند.

علاوه بر اجسام هسته‌ای PML (اولین اجسام هسته‌ای که مشاهده شده) هستک احتمالاً دارای نواحی ویژه زیرساختاری است که برای عملی غیر از بیوزنز ریبوزوم اختصاص یافته است. شواهدی وجود دارد که کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئین نابالغ SRP دخیل در ترشح پروتئین و ورود در غشای ER، در هستک تجمع یافته و سپس به سیتوپلاسم منتقل می‌شود تا در آنجا به بلوغ نهایی برسند.

نکات کلیدی بخش ۵-۸

پردازش rRNA و tRNA

- یک پیش‌ساز rRNA اولیه بزرگ (در انسان، ۴۵S) بوسیله RNA پلیمراز I سنتز شده و تحت برش تخریب با اگزونوکلئازها و تغییرات باز قرار گرفته تا rRNAهای بالغ ۲۸S، ۱۸S و ۵/۸S تولید شوند، این rRNAها با پروتئین‌های ریبوزومی تجمع یافته و زیرواحدهای ریبوزومی را تشکیل می‌دهند.
- سنتز و پردازش rRNA اولیه در هستک انجام می‌گیرد اما ۵SrRNA از زیرواحد ریبوزومی بزرگ بوسیله RNA پلیمراز III در نوکلئوپلاسم سنتز می‌شود.
- حدود ۱۵۰، snoRNA با پروتئین‌ها در snoRNPها تجمع یافته بوسیله تشکیل جفت باز با جایگاه‌های خاص در RNA اولیه، متیلاسیون ریبوز، تغییر یوریدین به سود و یوریدین و برش rRNA در جایگاههای خاص طی پردازش در هستک را هدایت می‌کنند.
- اینترون‌های خود پیراینده گروه I و گروه II و احتمالاً snRNAها در اسپلایسوزومها همگی به عنوان ریبوزیم یا توالی‌های RNA فعال از لحاظ کاتالیز عمل کرده و بوسیله واکنش‌های ترانس استریفیکاسیون مشابه و نیازمند به یون‌های Mg^{2+} متصل، عمل پیرایش را انجام می‌دهند.

1- Small cajal body - associated RNAs
2- Nuclear speckles
3- Promyelocytic Leukemia
4 - Small ubiquitin - like protein

■ tRNAهـــای اولیـه بـوسیله RNA پـلیمراز III در نوکلئوپلاسم سنتز شده و با برداشت توالی انتهای ′۵ اضافه شدن CCA به انتهای ′۳ و تغییر چندین باز داخلی پردازش می‌شوند.

■ بعضی tRNAهای اولیه حاوی اینترون کوتاهی هستند که بوسیله مکانیسم کاتالیزشده با پروتئین مجزا از پیرایش mRNA اولیه و اینترون‌های خود پیراینده برداشته می‌شوند.

■ همه گونه‌های مولکول‌های RNA هم در هسته و هم بعد از ورود بـــه ســـیتوپلاسم بـــا انـواع مـختلفی از ذرات ریبونوکلئوپروتئین تجمع می‌یابند.

■ اجسام هسته‌ای نواحی تخصص یافته از لحاظ عملکرد در هسته بوده و در آنجا با پروتئین‌ها میانکنش داده و تشکیل ساختارهای خود سازمان یافته را می‌دهند. اغلب اینها مثل هستک‌ها محل تجمع کمپلکس‌های RNP هستند.

چشم‌اندازی به آینده

در این فصل و فصل قبلی دیدیم که در سلول‌های یوکاریوتی، mRNAها در هسته سنتز شده و پردازش می‌یابند و از طریق کمپلکس منفذ هسته‌ای به سیتوپلاسم منتقل شده و در بعضی از موارد قبل از آغاز ترجمه توسط ریبوزوم، در نواحی ویژه‌ای از سیتوپلاسم جای می‌گیرند. هر یک از این فرآیندهای اساسی توسط ماشین‌های کمپلکس ماکرومولکولی انجام می‌شود. این کمپلکس‌ها متشکل از پروتئین‌ها و در بسیاری از موارد RNAها نیز می‌باشد. پیچیدگی ماشین ماکرومولکولی دقت شناسایی پرموترها و جایگاههای پیرایش را در توالی بلند DNA و RNA را تضمین کرده و برای تنظیم سنتز زنجیره پلی‌پپتیدی روشهای متنوعی را ارایه می‌دهد. بسیاری از مطالب در مورد ساختار، عملکرد، و تنظیم چنین کمپلکس ماشینی مثل اسپلایسوزوم و دستگاه برش پلی‌آدنیلاسیون باید شناسایی گردد.

موارد اخیر تنظیم پیرایش RNA این سوال را ایجاد می‌کند که چگونه پیام‌های خارج سلولی این پدیده‌ها را به ویژه در سیستم عصبی مهره‌داران کنترل می‌کنند. یک مثال قابل توجه در این مورد وضعیت گوش داخلی جوجه است که ایزوفرم‌های متعددی از کانال‌های K^+ فعال شونده با Ca^{2+} بنام Slo در اثر پیرایش متناوب RNA تولید می‌شوند. میانکنش‌های سلول به سلول ظاهراً سلول‌ها را از موقعیت خویش در حلزون گوش مطلع ساخته و باعث پیرایش متناوب mRNA اولیه می‌گردد. دغدغه محققین کشف اینست که چگونه میانکنش در بین سلول‌ها، فعالیت فاکتورهای پردازش کننده RNA را تنظیم می‌کند.

مکانیسم انتقال mRNP از کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای سوالات جالبی را در ذهن ایجاد می‌کند. تحقیقات آینده احتمالاً فعالیت‌های دیگر mRNPها و پروتئین‌های هسته‌ای mRNP را نشان داده و مکانیسم عمل آنها را به روشنی مشخص خواهد کرد. مثلاً خانواده کوچک ژنی وجود دارد که پروتئین همولوگ با زیرواحد بزرگ خارج‌کننده mRNA را رمزدهی می‌کند. عمل این پروتئین‌های مرتبط چیست؟ آیا آن‌ها در انتقال مجموعه همپوشان از mRNPها شرکت می‌کنند؟ بعضی از پروتئین‌های hnRNP سیگنال باقی ماندن در هسته را داشته و هنگامیکه پروتئین‌های hnRNP همراه با سیگنال‌های خروج از هسته (NES) متصل شدند، از خروج hnRNP جلوگیری می‌کنند. چگونه این پروتئین‌های hnRNP به صورت انتخابی از mRNPهای پردازش یافته در هسته جدا شده و امکان انتقال mRNA به داخل سیتوپلاسم را می‌دهند؟

جای گیری mRNAهای خاص در موقعیت‌های ویژه زیرسلولی، اساس تکامل موجودات پرسلولی است همانگونه که در فصل ۲۲ بحث خواهد شد، در طی تکامل یک سلول غالباً به دو سلول دختری تقسیم می‌شود که متفاوت از یکدیگر عمل می‌کنند. در مفهوم زیست‌شناسی تکوینی، گفته می‌شود دو سلول دختری سرنوشت تکوینی مختلفی دارند. در بسیاری از موارد، تفاوت در سرنوشت ناشی از جای گیری یک mRNA در ناحیه ویژه‌ای از سلول قبل از سیتوز است به طوری که پس از تقسیم سلولی آن mRNA در یکی از دو سلول دختری ظاهر می‌شود. بیشتر مطالعات جالب برای فهم در مکانیسم مولکولی کنترل جای گیری mRNA در حال انجام است. این جای‌گیری برای تکوین طبیعی موجودات پرسلولی حیاتی است.

یکسری از کشفیات جالب و هیجان‌انگیز زیست‌شناسی سلولی مولکولی در سالهای اخیر مربوط به وجود و عملکرد miRNAها و پردازش RNA مداخله‌گر است. RNA مداخله‌گر (RNAi) روش قدرتمندی را برای مطالعه عمل ژن‌ها در اختیار زیست‌شناسان سلولی مولکولی قرار می‌دهد. کشف حدود miRNA۱۰۰۰ در انسان و سایر موجودات موارد متعددی از کنترل ترجمه را توسط این مکانیسم نشان می‌دهد که بایستی شناخته شوند. مطالعات اخیر در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و گیاهان RNAهای کوچک هسته‌ای را با کنترل متیلاسیون DNA و تشکیل هتروکروماتینی پیوند می‌دهد. آیا فرآیندهای مشابه، بیان ژن را در انسان و سایر موجودات از طریق

تجمع هتروکروماتین کنترل می‌کنند؟ چگونه فرآیندهای تنظیمی دیگر ممکن است توسط سایر انواع RNA های کوچک هدایت شوند؟ چون کنترل با این مکانیسم‌ها وابسته به جفت شدن بازها بین miRNA و mRNA ها یا ژن‌ها مورد نظر می‌باشد، روش‌های ژنومی و بیوانفورماتیک احتمالاً ژن‌هایی راکه توسط این مکانیسم‌ها، کنترل می‌شوند را معرفی خواهد کرد. چه فرآیندهای دیگری علاوه بر کنترل ترجمه، تجزیه mRNA و تجمع هتروکروماتینی وجود دارند که ممکن است با miRNA ها کنترل شوند.

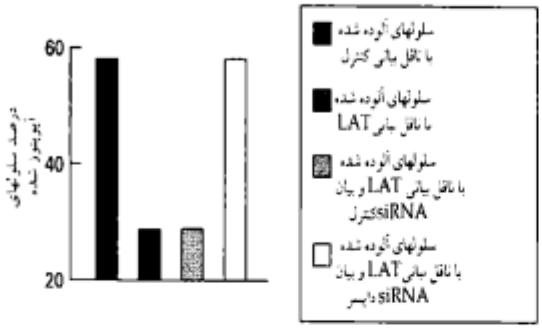
این سوالات تنها تعداد کمی از سوالات جالب در مورد پردازش RNA و کنترل پس ترجمه‌ای و انتقال هسته‌ای هستند که فکر زیست‌شناسان سلولی و مولکولی را در دهه‌های آینده به خود مشغول خواهند کرد. کشفیات ناگهانی مکانیسم‌های پیش‌بینی نشده کنترل ژنی توسط miRNA احتمالاً در آینده بیشتر ما را شگفت‌زده خواهد کرد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

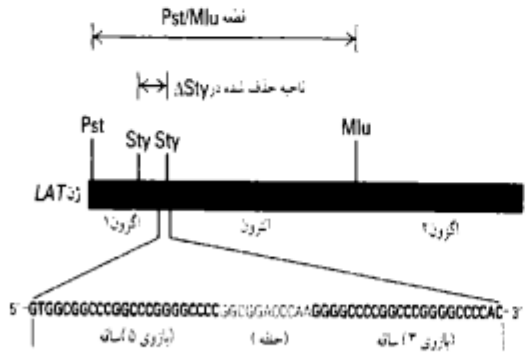
اکثر انسانها با ویروس سیمپلکس ویروس I (HSV-1) عامل ایجاد تبخال آلوده شده‌اند. ژنوم HSV-I حدود ۱۰۰ ژن را رمزدهی می‌کند که اکثر آن‌ها در سلول‌های میزبانی آلوده شده در محل زخم‌های دهانی بیان می‌شود. فرآیند عفونی شدن شامل همانندسازی DNA ویروسی، رونویسی و ترجمه ژن‌های ویروسی، تجمع ذرات ویروسی جدید و مرگ سلول میزبان است تا زاده‌های ویروسی رها گردند. برخلاف سایر انواع ویروس‌ها، هرپس ویروس‌ها دارای یک فاز نهفته نیز هستند که در آن ویروس در نورون‌ها به صورت مخفی باقی می‌ماند. این نورون‌های عفونی شده با ویروس‌های نهفته منبع فعال عفونت بوده و هنگامیکه بر حالت نهفته چیره می‌شود، تبخال ایجاد می‌گردد.

جالب اینکه فقط یک رونوشت اولیه از ژنوم در طی فاز نهفته بیان می‌شود. این رونوشت، LAT[1]، هیچ پروتئینی را رمزدهی نمی‌کند. نورون‌های عفونی شده با جهش‌یافته‌های HSV-1 فاقد ژن LAT با سرعتی دو برابر سرعت سلول‌های عفونی شده با سویه وحشی HSV-1 دچار مرگ سلولی بوسیله آپوپتوز می‌شوند. به منظور شناسایی اینکه آیا عملکرد LAT در آپوپتوز را از طریق رمزدهی کردن یک miRNA آپوپتوز را بلوکه می‌کند مطالعات بعدی انجام شد (Gupta etal , 2006,nature 442:82-85).

a - به یک رده سلولی یک ناقل بیانی بیان‌کننده قطعه Pst-Msu (شکل قسمت b) ژن LAT انتقال داده شد. درصد سلول‌های انتقال یافته که سپس دچار مرگ سلولی القا شده در اثر دارو می‌شود در مقایسه با سلول‌های کنترل، بررسی شد. آزمایش در سلول‌هایی که بیان دایسر باکمک siRNA خاموش شده بود تکرار گردید. نتایج بدست آمده در نمودار زیر نشان داده شده است. چرا دانشمندانی که این مطالعه را رهبری می‌کردند اثرات خاموشی دایسر را بررسی کردند؟ تحت چه شرایطی ژن LAT سلول‌ها را در برابر آپوپتوز حفظ می‌کند؟



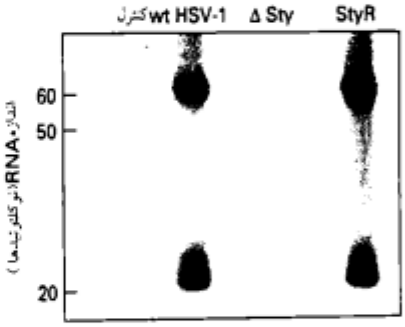
b - سلول‌هایی که با ناقل بیانی بیان‌کننده و قطعه Pst-Msu ژن LATکه در آن از ناحیه بین دو جایگاه محدود برش با آنزیم Sty حذف شده بود (شکل زیر؛ ΔSty) آلوده شدند. زمانیکه در این سلول‌ها آپوپتوز القا شد، آنها نیز به همان سرعت سلول‌های آلوده نشده دچار مرگ شدند. در مطالعات بعدی سلول‌ها با ناقل بیانی بیان‌کننده ناحیه Sty-Sty ژن LAT آلوده شدند. این سلول‌ها همان مقاومت به آپوپتوز را نشان دادند که سلول‌های آلوده شده با قطعه Pst-msu نشان داده بودند. از این یافته‌ها در مورد ناحیه ژن LAT مورد نیاز برای حفاظت در برابر آپوپتوز چه می‌توان نتیجه‌گیری کرد؟



c - پیش‌بینی می‌شود RNA رمزدهی‌شده در ناحیه Sty-Sty ساختار ساقه - حلقه تشکیل می‌دهد. بررسی‌های لکه‌گذاری نوترن روی RNA کل سلولی جداشده از سلول‌های کنترل (mock)،

1- Latency-associated transcript

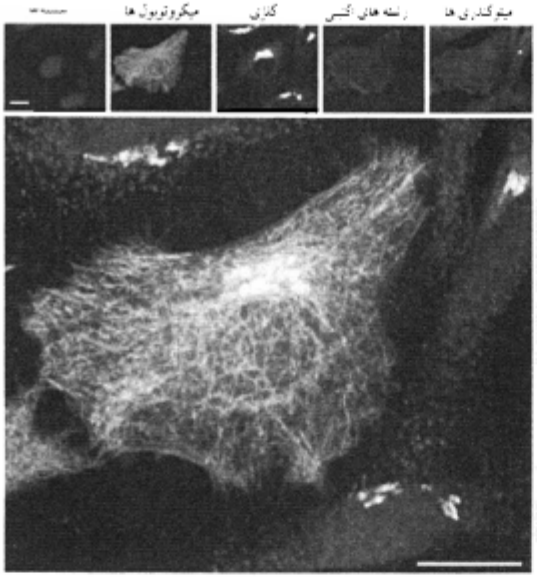
سلول‌های عفونی شده با نوع وحشی HSV1 و سلول‌های عفونی شده با جهش‌یافته HSV1 که دچار حذف ژنی از توالی بین دو جایگاه برش Sty در ژن LAT و سلول‌های عفونی شده با یک ویروس ΔSty (ویروس فاقد قطعه بین دو جایگاه برش ΔSty) انجام گرفت. پروب به کار گرفته شده برای لکه‌گذاری نوترن در ناحیه ساقه ′۳ مربوط LAT RNA در ناحیه Sty-Sty نشاندار شده بود. و در قسمت b در شکل نشان داده شده است. RNA های شناسایی شده بوسیله این پروب تقریباً ۵۵ یا ۲۰ نوکلئوتید طول داشتند (همانطور که در لکه‌گذاری نوترن در زیر نشان داده شده‌اند). چرا دو نوع RNA با اندازه مختلف شناسایی شد؟ زمانیکه پروب دوم نشاندار شده در ناحیه ′۵ ساقه توالی RNA به کار گرفته شد فقط RNA ۵۵ نوکلئوتیدی شناسایی شد. درباره پردازش بیان RNA ژن LAT چگونه می‌توان تصمیم‌گیری کرد؟ کدام آنزیم‌های احتمالی RNA به طول ۵۵ نوکلئوتید RNA به طول ۲۰ نوکلئوتید و در چه بخشی از سلول ایجاد می‌کنند؟



d – TGF- β mRNA پروتئین فاکتور تغییردهنده رشد β را رمزدهی می‌کند که رشد سلول را مهار کرده و باعث القای آپوپتوز می‌شود. ناحیه غیرقابل ترجمه ′۳ در TFF- mRNAβ می‌تواند با RNA رمزدهی شده ناحیه ′۵ ساقه دمین LAT Sty-Sty حالت دورشته‌ای ناقصی را ایجاد کند. (miR-LAT). در چنین حالتی آیا ممکن است میزان بیان TGF- در سلول‌های آلوده شده با سویه وحشی HSV-1 در مقایسه با سلول‌های آلوده نشده تفاوت داشته باشد؟ درباره عفونت نهفته HSV-1 از این مطالعات چه می‌توان برداشت کرد؟

فصل ۹

مشاهده، تفکیک و کشت سلول‌ها



(شکل رنگی) میکروسکوپ فلورسانس محل DNA و چندین پروتئین را در یک سلول نشان می‌دهد. در اینجا به کمک تکنیک‌های نشاندار کردن و رنگ‌آمیزی فلورسنتی با استفاده از مولکول‌های مختلف فلورسنت پروتئین‌های اسکلت سلولی α- توبولین (سبز) و اکتین (قرمز)، DNA (آبی)، کمپلکس گلژی (زرد)، و میتوکندری (بنفش) نشان داده شده است. تصاویر موجود در قسمت بالا، تصاویری با رنگ‌های متضاد[1] شده نادرست از هر یک از ساختارها هستندکه به طور منفرد رنگ‌آمیزی شده‌اند. در تصویر بزرگ‌تر این تصاویر مجزا به هم آمیخته شده تا بصورت یک سلول واحد نشان داده شود.

رئوس مطالب

۹ـ۱ اندامک‌های سلول یوکاریوتی

۹ـ۲ میکروسکوپ نوری مشاهده ساختار سلول و مکان‌یابی پروتئین‌ها در سلول‌ها

۹ـ۳ میکرسکوپ الکترونی روش‌ها و کاربردها

۹ـ۴ تخلیص اندامک‌های سلولی

۹ـ۵ استخراج، کشت و تمایز سلول‌های موجودات چندسلولی[2] یامتازوان

تقریباً ۲۰۰ سال پیش ماتیاس شلایدن[3] و تئودر شوان[4] از یک میکروسکوپ نوری اولیه استفاده کردند و نشان دادند که سلول‌های منفرد واحد اصلی حیات را تشکیل می‌دهد و تا به امروز میکروسکوپ نوری به‌طور فزاینده‌ای یک ابزار مهم تحقیقاتی برای زیست‌شناسان گردیده است. میکروسکوپ‌های نوری پیشرفته‌ای که در دو دهه اخیر ابداع شده‌اند، امروزه زیست‌شناسان سلولی را قادر می‌سازند تا هزاران حرکت سلولی را از جابه‌جایی کروموزوم‌ها و وزیکول‌ها گرفته تا حرکت‌های خزشی سلولی و غوطه‌ور شدن آنها را مشاهده کنند.

میکروسکوپ الکترونی نسبت به میکروسکوپ نوری فراساختارهای سلولی را با حد تفکیک بالاتری نشان می‌دهد، اما تکنولوژی آن نیاز به این دارد که سلول تثبیت و برش‌گیری گردد و بنابراین تمام حرکات سلولی در یک لحظه منجمد می‌شود. میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تمامی سلول‌های یوکاریوتی ـ با منشاء قارچی، گیاهی یا جانوری به چندین بخش که توسط غشاء احاطه شده‌اند و **اندامک** نامیده می‌شوند، تقسیم می‌گردند. در بخش اول این فصل، ساختارها و عملکردهای پایه اندامک‌های اصلی را در سلول‌های جانوری و گیاهی توضیح می‌دهیم.

در بخش‌های دوم و سوم این فصل، بسیاری از تکنیک‌های مدرن میکروسکوپ نوری و الکترونی را که در تشخیص و تصویربرداری از ویژگی‌های ساختاری سلول مناسب می‌باشند، مورد بحث قرار خواهیم داد.

پیشرفت‌های موجود در میکروسکوپ نوری و الکترونی، به همراه پیشرفت‌های موجود در تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، زیست‌شناسان سلولی امروزی را قادر ساخته تا پروتئین‌های ویژه‌ای را در سلول‌های تثبیت شده شناسایی کنند. بنابراین یک تصویر ثابت از محل آنها در سلول، مثل تصویر آغازین این فصل فراهم می‌کند. چنین مطالعاتی منجر به درک مهمی گردید که غشاها و فضاهای زیرین هر نوع اندامک دارای گروه واحدی از پروتئین می‌باشد که برای انجام عملکرد واحد آن ضروری می‌باشد. به علاوه ما می‌بینیم که چگونه **پروتئین‌های کیمر**[5] که از پروتئین مورد نظر که به‌طور

1- False-colored
2- Metazoan
3- Matthias Schleiden
4- Theodore Schwann
5- Chimeric Proteins

کوالان به یک پروتئین دارای فلورسنت طبیعی متصل شده است، تشکیل شده است، زیست‌شناسان را قادر می‌سازد تا حرکات پروتئین‌های منفرد را در سلول‌های زنده به تصویر بکشند. هم‌چنین به کار بردن سیستم‌های دیجیتالی منجر به بهبود کیفیت تصاویر میکروسکوپی به علاوه نگهداری و بازیابی آنها گردیده است. الگوریتم‌های دیجیتالی هم‌چنین اجازه بازسازی سه بُعدی اجزای سلول از تصاویر دو بُعدی و نیز مشاهده و کمّی‌سازی پروتئین‌های ویژه و سایر مولکول‌ها را در سلول‌ها می‌دهد.

پیشرفت‌های موازی در جداسازی اجزای تحت سلولی به زیست‌شناسان سلولی اجازه می‌دهد که اندامک‌های واحد سلولی را با درجه خلوص بالایی استخراج کنند. این تکنیک‌ها، که با جزئیات بیشتر در بخش چهار این فصل آورده شده‌اند، اطلاعات مهم‌تری درباره ترکیب پروتئینی و عملکرد بیوشیمیایی اندامک‌ها فراهم می‌کنند. برای مثال، استفاده از روش‌های پروتئومیکسی شامل اسپکترومتری جرمی در تعیین هویت تمام پروتئین‌های اصلی در میتوکندری‌های تخلیص شده، عملکردهای جدید زیادی برای این اندامک آشکار ساخته است.

به دلیل وجود بسیاری از محدودیت‌های تکنیکی مطالعه بر روی سلول‌های جانوری و گیاهی با مشکل مواجه شده است. یک روش جایگزین این است که از اندام‌هایی استفاده شود که به‌طور سالم از جانوران جدا می‌شود و به منظور حفظ یکپارچگی فیزیولوژیکی و عملکرد تحت تیمار قرار می‌گیرند. با وجود این، سازمان‌یابی اندام‌ها، حتی آن اندامی که جدا شده است، به قدری پیچیده هستند که مشکلات متعددی برای تحقیقات ایجاد می‌کنند. بنابراین، زیست‌شناسان سلولی مولکولی اغلب مطالعات تجربی خود را بر روی سلول‌های استخراج شده از یک موجود زنده متمایل می‌کنند. در بخش پنجم این فصل می‌آموزیم که چگونه انواع معینی از سلول‌ها را با خلوص بیشتر از مخلوط پیچیده‌ای از سلول‌ها جداسازی کنیم.

در بسیاری از موارد، سلول‌های استخراج شده را می‌توان در آزمایشگاه تحت شرایطی که باعث رشد و بقا آنها می‌گردد، نگهداری کرد، این روش **کشت دادن**[1] نامیده می‌شود. در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی سلول‌های کشت داده شده چندین مزیت نسبت به موجودات دارد. سلول‌های یک نوع ویژه می‌تواند در محیط کشت رشد کنند، شرایط آزمایش می‌تواند بهتر کنترل شود و در بسیاری از موارد یک سلول واحد را می‌توان به آسانی به صورت کلونی از سلول‌های مشخص کشت داد. سوش‌های[2] سلولی حاصله که از نظر ژنتیکی هموژن هستند، **کلون** نامیده می‌شود. در کشت، رده‌های مشخصی از سلول‌های تمایز نیافته پستانداران زمانی که در یک محیط کشت دیگری قرار بگیرند، می‌توانند القا شوند و طی یک مدت زمان مشخصی به یک نوع سلول ویژه مثل عضله یا عصب تمایز پیدا کنند. همان‌طور که در بخش آخر این فصل می‌آموزیم، چنین رده‌های سلولی ابزار قدرتمندی در درک این‌که چگونه انواع ویژه‌ای از سلول‌های تمایز یافته در بدن شکل می‌گیرند، می‌باشند.

۱ـ۹ اندامک‌های سلولی یوکاریوتی

اندامک‌های مهم سلول‌های جانوری و گیاهی در شکل ۹ـ۱ به تصویر کشیده شده است. پروتئین‌های ویژه‌ای که در بخش داخلی و غشایی هر اندامک موجود است و ویژگی‌های عملکردی آن را تعیین می‌کنند، با جزئیات بیشتری در بخش‌های آخر بررسی شده‌اند. ابتدا آن دسته از اندامک‌هایی که با یک غشاء واحد احاطه شده‌اند، بررسی می‌شود. سپس سه نوع اندامک که غشای دولایه دارند، هسته، میتوکندری و کلروپلاست بررسی می‌شوند. سازمان درونی اندامک‌ها و ساختار غشای پلاسمایی توسط اسکلت سلولی رشته‌ای سازماندهی شده‌اند؛ در فصول ۱۷ و ۱۸ این رشته‌ها با جزئیات بیشتر بحث می‌شوند.

غشای پلاسمایی عملکردهای مشترک زیادی در تمامی سلول‌ها دارد

اگرچه اجزای لیپیدی یک غشاء غالباً ویژگی‌های فیزیکی آن را تعیین می‌کند، ولی پروتئین‌های آن مسئول خصوصیات عملکردی غشاها می‌باشد. در تمامی سلول‌ها غشای پلاسمایی به عنوان یک مانع نفوذپذیری عمل می‌کند که از ورود مواد ناخواسته از محیط خارج سلول و خروج متابولیت‌های ضروری ممانعت می‌کند. **پروتئین‌های ناقل غشایی** ویژه در غشای پلاسمایی اجازه عبور مواد تغذیه‌ای به داخل سلول و خروج مواد زائد از آن را می‌دهند؛ سایر پروتئین‌ها ترکیب یونی مناسب و pH (۷/۲≃) **سیتوزول**، بخش‌هائی محلول سیتوپلاسم منهای اندامک‌ها، غشاها و اجزای اسکلت سلولی نامحلول را حفظ می‌کنند. ساختار و عملکرد پروتئین‌هایی که غشای پلاسمایی را می‌سازند و به طور انتخابی به مولکول‌های مختلف نفوذپذیر هستند در فصل ۱۰ و ۱۱ بحث گردیده است.

بر خلاف سلول‌های جانوری، بیشتر باکتری‌ها و تمامی سلول‌های قارچی و گیاهی توسط یک دیواره سلولی سخت احاطه

1- Culturing 2- Strain

شده‌اند و فاقد ماتریکس خارج سلولی موجود در بافت‌های جانوری هستند. غشای پلاسمایی شدیداً در تشکیل دیواره‌های سلولی که در گیاهان اساساً از **سلولز** ساخته شده‌اند درگیر می‌باشد. دیواره سلولی از تورم و چروکیدگی سلول زمانی که سلول به ترتیب در یک محیطی با غلظت کمتر (**هیپوتونیک**) یا غلظت بیشتر (**هیپرتونیک**) از داخل سلول قرار گیرد، ممانعت می‌کند. به همین دلیل، سلول‌هایی که به وسیله یک دیواره احاطه شده‌اند می‌توانند در محیطی که قدرت اسمزی کمتر از سیتوزول دارند، رشد کنند. ویژگی‌ها، عملکرد و تشکیل دیواره سلول گیاهی در فصل ۱۹ آورده شده است.

علاوه بر این عملکردهای عمومی، غشای پلاسمایی نقش‌های اساسی دیگری نیز در موجودات پر سلولی دارد. تعداد کمی از سلول‌های موجود در گیاهان و حیوانات پر سلولی به صورت هستی‌های مجزا یافت می‌شوند، در حالیکه گروه بیشتری از سلول‌ها با تخصص‌یافتگی ویژه بافت تشکیل می‌دهند. در سلول‌های جانوری، نواحی تخصص‌یافته‌ای از غشای پلاسمایی، که **اتصالات سلولی**[1] نامیده می‌شوند و شامل پروتئین‌ها و گلیکولیپیدها می‌باشند ساختارهای ویژه‌ای بین سلول‌ها تشکیل می‌دهند. این اتصالات به بافت‌ها استحکام می‌بخشند و به متابولیت اجازه تبادل بین سلول‌ها را می‌دهد. پروتئین‌های خاصی از غشای پلاسمایی سلول‌ها را به اجزای **ماتریکس خارج سلولی**، مخلوطی از پروتئین‌های رشته‌ای و پلی‌ساکاریدها که یک بستری را فراهم می‌کند تا صفحات سلول‌های اپی‌تلیال یا غدد کوچک بر روی آن قرار گیرند، متصل می‌کنند. ما این دو عملکرد غشای پلاسمایی را در فصل ۱۹ بررسی می‌کنیم. سایر پروتئین‌های موجود در غشاء پلاسمایی به عنوان لنگرگاهی برای بسیاری از رشته‌های اسکلت سلولی که در شکل‌دهی و مستحکم‌تر کردن سلول‌ها عمل می‌کنند (فصول ۱۷ و ۱۸).

غشاهای پلاسمایی بسیاری از انواع سلول‌های یوکاریوتی هم‌چنین دارای پروتئین‌هایی هستند که با اتصال به مولکول‌های پیام ویژه‌ای، مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و انتقال‌دهنده‌های عصبی، به عنوان **گیرنده** عمل می‌کنند و باعث پاسخ‌های متنوع سلولی می‌گردند. این پروتئین‌ها که برای تکوین و عملکرد سلولی حیاتی هستند، در چند فصل بعدی توضیح داده شده‌اند. سرانجام پروتئین‌های محیطی سیتوزولی که به سطح غشاء فرا خوانده می‌شوند، به عنوان آنزیم، انتقال‌دهنده پیام داخل سلولی و پروتئین‌های ساختاری که غشاء را پایدار می‌کنند، عمل می‌کنند.

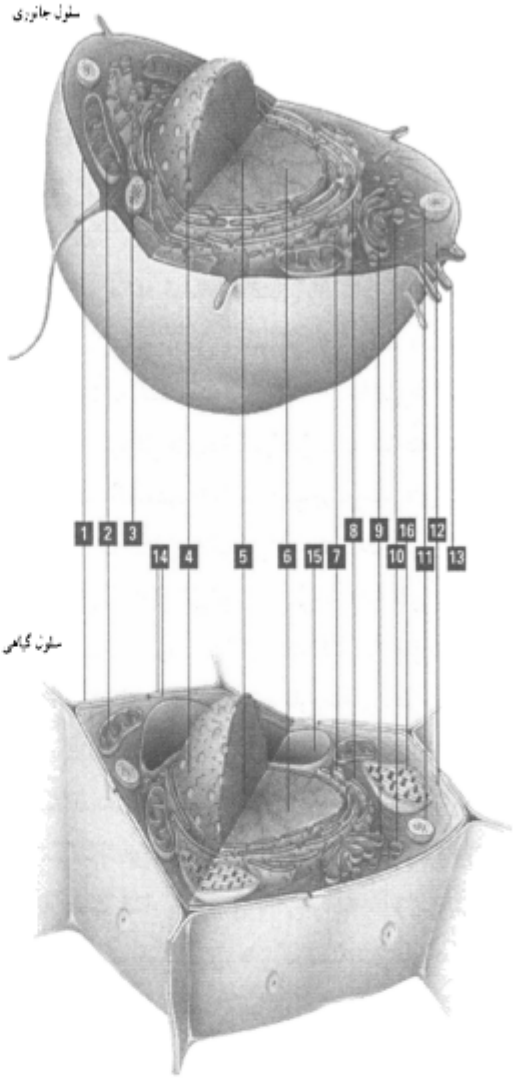
اندوزوم‌ها ماکرومولکول‌های محلول را از محیط خارج سلول جذب می‌کنند

اگرچه پروتئین‌های ناقل موجود در غشای پلاسمایی حرکت یون‌ها و مولکول‌های کوچک را به داخل و خارج از سلول میانجیگری می‌کنند ولی پروتئین‌ها و بعضی از ماکرومولکول‌های محلول موجود در فضای خارج سلولی توسط **اندوسیتوز** به داخل سلول کشیده می‌شود. در این فرایند، قطعه‌ای از غشای پلاسمایی به صورت «حفره پوشش‌دار[2]» که بخش سیتوزولی آن توسط یک دسته از پروتئین‌ها پوشیده شده است، درمی‌آید. انواع مختلفی از اندوسیتوز، که در هر کدام پروتئین‌های مختلفی نقش دارند، شناخته شده است. برای مثال در **اندوسیتوز با واسطه رسپتور** پروتئین‌های گیرنده‌ای خاص موجود در غشای پلاسمایی در بخش خارجی سلول به ماکرومولکول‌ها متصل می‌شود و سپس با حفره‌های پوشش‌دار فرورفته ترکیب می‌شوند. حفره از غشاء جدا و به صورت وزیکول کوچک محصور با غشاء که دارای مواد خارج سلولی ـ هم محلول و هم متصل به گیرنده‌ها ـ می‌باشد، درمی‌آید و به سمت یک اندوزوم اولیه، یک ایستگاه دسته‌بندی توبول‌ها و وزیکول‌های محصور با غشاء حرکت می‌کند (شکل ۲a,b ـ ۹). از این قسمت، بعضی از پروتئین‌های غشاء به سمت غشاء پلاسمایی بازمی‌گردند؛ سایر پروتئین‌های غشایی به یک اندوزم تأخیری، جایی که دسته‌بندی‌های دیگری رخ می‌دهد، انتقال داده می‌شود. مسیر اندوسیتوز در زمانی که اندوزوم تأخیری محتوای غشایی و درونی خود را ـ شامل موادی از محلول خارج سلولی ـ به منظور تجزیه به لیزوزوم‌ها برساند، پایان می‌پذیرد. کل مسیر اندوسیتوز با جزئیات بیشتر در فصل ۱۴ توضیح داده شده است.

لیزوزوم‌ها اندامک‌های اسیدی می‌باشند که دارای مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌ای هستند

لیزوزوم‌ها یک مثال عالی از توانایی غشاهای داخل سلولی در تشکیل محفظه‌های بسته می‌باشند که در آن اجزای **لومن** (قسمت ائی و داخل این محفظه) ذاتاً از سیتوزول احاطه‌کننده آن متفاوت است. **لیزوزوم‌ها** مخصوصاً در سلول‌های جانوری یافت شده‌اند و مسئول تجزیه بخش‌هایی هستند که برای سلول یا موجود زنده کارایی ندارد (واکوئل‌های موجود در سلول‌های گیاهی و قارچی عملکرد بسیار مشابهی با لیزوزم‌های جانوری دارند). فرایندی که طی

1- Cell Junction 2- Coated pit



▲ **شکل ۱ـ۹ شمای کلی سلول جانوری (بالا) و سلول گیاهی (پایین) معمولی و زیرساختارهای مهم آنها.** همه اندامک‌ها، گرانول‌ها و فیبرها در همه سلولها وجود ندارند.

❶ غشای پلاسمایی حرکت سلول‌ها را به داخل و خارج از سلول کنترل می‌کند و در پیام‌رسانی سلول به سلول و چسبندگی سلولی نقش دارد.

❷ میتوکندری‌ها که توسط یک غشاء دوگانه احاطه شده‌اند، با اکسیداسیون گلوکز و اسیدهای چرب ATP تولید می‌کند.

❸ لیزوزوم‌ها، که یک محتوی اسیدی دارند، موادی را که توسط سلول بلعیده می‌شوند، غشاها و اندامک‌های سلولی فرسوده را هضم می‌کند.

❹ پاکت هسته‌ای، غشای دوگانه، محتوای هسته را در برمی‌گیرد. غشای خارجی هسته امتداد ER خشن می‌باشد.

❺ هستک یک زیرجزء هسته‌ای می‌باشد که در آن بیشتر rRNAهای سلولی سنتز می‌شود.

❻ هسته توسط کروماتین که از DNA و پروتئین‌هایی تشکیل شده است پر می‌شود؛ و مکان سنتز RNA و tRNA می‌باشد.

❼ شبکه آندوپلاسمی (ER) صاف لیپیدها را سنتز می‌کند و بعضی از ترکیبات هیدروفوب را سم‌زدایی می‌کند.

❽ شبکه آندوپلاسمی (ER) خشن در سنتز، پردازش و دسته‌بندی پروتئین‌های ترشحی، پروتئین‌های لیزوزومی و سایر پروتئین‌های غشایی نقش دارد.

❾ کمپلکس گلژی پروتئین‌های ترشحی، لیزوزومی و پروتئین‌های غشایی سنتز شده بر روی ER خشن را پردازش و دسته‌بندی می‌کند.

❿ وزیکول‌های ترشحی پروتئین‌های ترشحی را ذخیره می‌کنند و با اتصال به غشاء پلاسمایی محتویات خودشان را آزاد می‌سازند.

⓫ پراکسیزوم‌ها مولکول‌های مختلف را سم‌زدایی می‌کنند و همچنین به منظور فرایندهای بیوسنتزی از تجزیه اسیدهای چرب گروه‌های استیل تولید می‌کنند.

⓬ رشته‌های اسکلت سلولی شبکه‌ها و دسته‌هایی را تشکیل می‌دهند که از غشاهای سلولی حفاظت می‌کند، به سازمان‌یابی اندامک‌ها کمک می‌کند و در حرکت سلولی مشارکت می‌کند.

⓭ میکروویلی‌ها سطح را افزایش می‌دهند تا جذب مواد غذایی از محیط افزایش یابد.

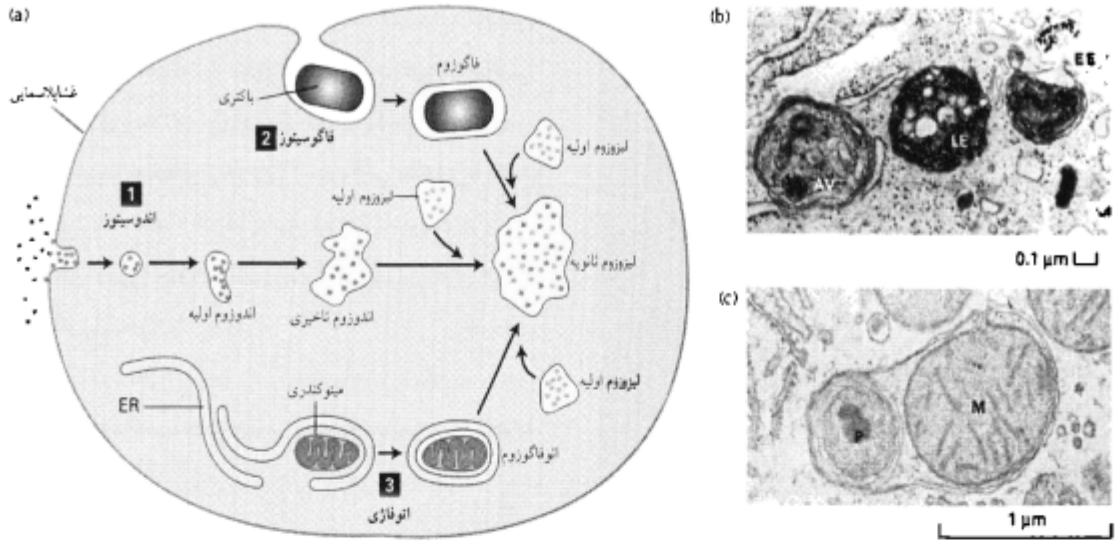
⓮ دیواره سلولی که بیشتر از سلولز تشکیل شده است، به حفظ شکل سلول کمک می‌کند و در برابر استرس‌های مکانیکی سلول را محافظت می‌کند.

⓯ واکوئل، آب، یون‌ها و مواد غذایی را ذخیره می‌کند، ماکرومولکول‌ها را تجزیه می‌کند و در هنگام رشد در طویل شدن سلول نقش دارد.

⓰ کلروپلاست‌ها که فتوسنتز انجام می‌دهند، توسط یک غشای دوتایی احاطه می‌شوند و دارای شبکه‌ای از کیسه‌های داخلی متصل‌شونده به غشا می‌باشند.

آن یک اندامک پیر در لیزوزوم هضم و تجزیه می‌گردد **اتوفاژی**(خودخوری) نامیده می‌شود. مواد نه تنها به طریق اندوسیتوز بلکه به طریقه **فاگوسیتوز** نیز به داخل سلول جذب می‌شوند. فاگوسیتوز فرایندی است که در آن ذرات بزرگ و نامحلول مثل باکتری‌ها توسط غشای پلاسمایی احاطه می‌شود و سپس به داخل سلول کشیده می‌شوند (شکل a ۲ـ۹ را ملاحظه کنید). در هر دو مورد مواد وارد شده به سلول ممکن است در لیزوزوم‌ها تجزیه گردد.

لیزوزوم‌ها دارای گروهی از آنزیم‌ها می‌باشد که پلیمرها را تجزیه می‌کنند و زیر واحدهای مونومری آنها را آزاد می‌کنند. برای مثال، نوکلئازها RNA و DNA را به مونونوکلئوتیدها تجزیه می‌کنند؛



▲ **شکل ۲ـ۹ ساختارهای سلولی که در رساندن مواد به لیزوزم‌ها مشارکت می‌کنند.** a) مرور شماتیکی سه مسیری که به وسیله آن مواد به سمت لیزوزوم‌ها حرکت می‌کنند. ماکرومولکول‌های محلول توسط فرورفتگی حفره‌های پوشش‌دار در غشای پلاسمایی جذب سلول می‌شوند و از طریق مسیر اندوسیتوز به سمت لیزوزوم هدایت می‌شوند (❶). کل سلول و سایر ذرات بزرگ و نامحلول از طریق مسیر فاگوسیتوز از سطح سلول به لیزوزم‌ها حرکت می‌کنند (❷). اندامک‌های پیر و توده سیتوپلاسمی از طریق مسیر اتوفاژی به سمت لیزوزوم کشیده می‌شوند (❸). در لومن اسیدی لیزوزوم‌ها، آنزیم‌های هیدرولیزی پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول‌های بزرگ را تجزیه می‌کنند. (b) میکروگراف الکترونی مقطعی از یک سلول پستاندار که ذرات ریز طلای پوشیده شده با پروتئین اوآلبومین تخم‌مرغ را جذب کرده است. اوآلبومین نشاندار شده با طلا (لکه‌های سیاه) در لیزوزوم اولیه (EE) و اندوزوم تأخیری (LE) یافت شده است اما به مقدار خیلی کم در اتوفاگوزوم (AV) یافت می‌شود. (c) میکروگراف الکترونی از مقطع یک سلول کبدی رَت که لیزوزوم ثانویه دارای قطعاتی از یک میتوکندری (M) و پراکسیزوم (P) می‌باشد را نشان می‌دهد.

پروتئازها انواع پروتئین‌ها و پپتیدها را به اسیدهای آمینه تجزیه‌می‌کنند؛ فسفاتازها گروه‌های فسفات را از مونوکلئوتیدها، فسفولیپیدها، و سایر ترکیبات بر می‌دارند؛ سایر آنزیم‌ها پلی‌ساکاریدهای پیچیده و گلیکولیپیدها را به واحدهای کوچک‌تر تجزیه می‌کنند. تمام آنزیم‌های لیزوزومی به‌طور مؤثر در pH اسیدی کار می‌کنند و روی هم‌رفته **هیدرولازهای اسیدی** نامیده می‌شوند. دو نوع پروتئین انتقال‌دهنده در غشای لیزوزومی با یکدیگر همکاری می‌کنند تا یون‌های H^+ و Cl^- (HCl) را از سیتوزول به داخل لیزوزوم پمپ کنند، بنابراین لومن را اسیدی می‌کنند (شکل ۱۳ـ۱۱ را ملاحظه کنید). pH اسیدی به دناتوره شدن پروتئین‌ها کمک می‌کند و آنها را در دسترس آنزیم‌های هیدرولازی، که خودشان به دناتوراسیون اسیدی مقاوم هستند، قرار می‌دهد. آنزیم‌های لیزوزومی در pH خنثی سلول و بیشتر مایعات خارج سلولی فعالیت بسیار کم‌تری دارند. بنابراین، اگر لیزوزومی آنزیم‌های خودش را به داخل سیتوزول، که در آنجا pH بین ۷ و ۷/۳ می‌باشد، آزاد کند آنزیم‌ها باعث تجزیه خیلی جزئی ترکیبات سیتوزولی می‌شوند.

پروتئین‌های سیتوزولی و هسته‌ای عموماً در لیزوزوم تجزیه نمی‌شوند بلکه در پروتئوزوم، کمپلکس پروتئینی بزرگ در سیتوزول، تجزیه می‌شوند (شکل ۲۹ـ۳ را ملاحظه کنید).

لیزوزوم‌ها از نظر شکل و اندازه متنوع هستند، و صدها لیزوزوم ممکن است در یک سلول جانوری معمولی وجود داشته باشد (شکل ۳ـ۹). در واقع آنها محل‌هایی هستند که موادی که قرار است تجزیه گردد در آنجا جمع می‌شوند. لیزوزوم‌های اولیه تقریباً کروی هستند و دارای ذرات مشخص یا پس‌مانده‌های غشایی نیستند. لیزوزوم‌های ثانویه، که بزرگ‌تر هستند و شکل منظمی ندارند، از الحاق لیزوزوم‌های اولیه با لیزوزوم‌ها تاخیری و سایر اندامک‌ها احاطه شده با غشای وزیکول بوجود می‌آیند. آنها در طی فرآیند هضم شدن دارای ذرات یا غشاها می‌باشند (شکل c ۲ـ۹).

بیماری‌های انسانی متعددی از نقص در آنزیم‌های ویژه لیزوزومی ناشی می‌شود زیرا سوبستراهای آنها در درون اندامک تجمع می‌یابند. برای مثال، بیماری تی ـ ساکس[1] در اثر

1- Tay-sachs

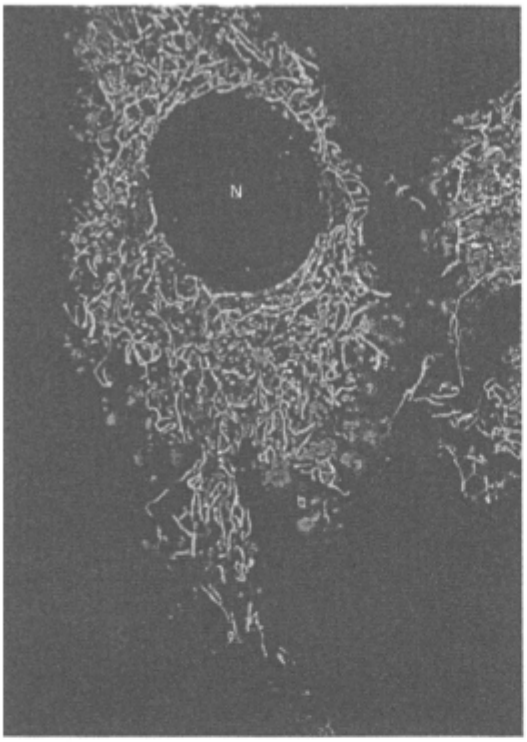
نقص در یکی از آنزیم‌های کاتالیزکننده یکی از مراحل تجزیه لیزوزومی گانگلیوزیدها به وجود آمده است. تجمع این گلیکولیپیدها، مخصوصاً در سلول‌های عصبی، عواقب مخربی دارد. علائم این بیماری ارثی معمولاً قبل از یک سالگی مشخص می‌شود. عموماً بچه‌های بیمار قبل از دو سالگی به کوری و جنون مبتلا می‌شوند و قبل از این‌که به سن سه سالگی برسند می‌میرند. سلول‌های عصبی چنین نوزادانی به دلیل لیزوزوم‌های متورم سرشار از لیپید، بزرگ می‌شود.

پراکسیزوم‌ها اسیدهای چرب و ترکیبات سمی را تجزیه می‌کنند

تمامی سلول‌های جانوری (به جز اریتروسیت‌ها) و بسیاری از سلول‌های گیاهی دارای **پراکسیزوم‌ها**، دسته‌ای از اندامک‌های نسبتاً کروی که ۰/۲ تا ۱ میکرومتر قطر دارند، می‌باشند (شکل ۴ـ۹). پراکسیزوم‌ها دارای چندین اکسیداز می‌باشند. اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که از اکسیژن مولکولی به منظور اکسیدکردن مواد آلی استفاده می‌کنند. در طی این فرآیند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مادهٔ خورنده، تولید می‌شود. هم‌چنین پراکسیزوم‌ها دارای مقدار فراوانی از آنزیم کاتالاز می‌باشد که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{کاتالاز}} 2H_2O_2 + O_2$$

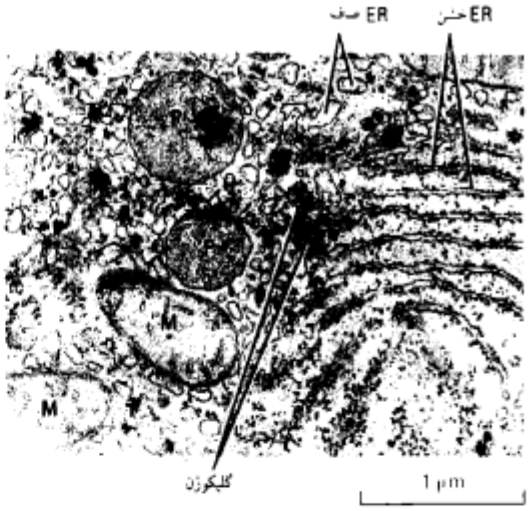
بر خلاف اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری، که CO_2 و ATP تولید می‌شود، اکسیداسیون پراکسیزومی اسیدهای چرب گروه‌های استیل تولید می‌کند و هیچ ارتباطی با تشکیل ATP ندارد (شکل ۱۲ـ۱۲ را ملاحظه کنید). انرژی که در هنگام اکسیداسیون پراکسیزومی تولید می‌شود به گرما تبدیل می‌شود، و گروه‌های استیل به سیتوزول انتقال داده می‌شود و در آنجا در سنتز کلسترول و سایر متابولیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بسیاری از سلول‌های یوکاریوتی، پراکسیزوم مهم‌ترین اندامکی است که در آن اسیدهای چرب اکسید می‌شوند، بنابراین تولید پیش‌سازهای مسیرهای مهم بیوسنتزی در این اندامک رخ می‌دهد. در سلول‌های کبدی و کلیه، مولکول‌های سمی که به جریان خون وارد می‌گردند نیز در پراکسیزوم‌ها تجزیه می‌گردند و فرآورده‌های بی‌ضرر تولید می‌شود. دانه‌های گیاهان دارای گلی‌اکسیزوم می‌باشند، گلی‌اکسیزوم‌ها اندامک‌های کوچکی هستند که لیپیدهای ذخیره‌ای را به منظور تأمین منبع کربن و انرژی برای رشد اکسید می‌کنند. آنها مشابه پراکسیزوم‌ها هستند و دارای بعضی از آنزیم‌های یکسان به علاوه آنزیم‌های دیگری که اسیدهای چرب را به پیش‌سازی گلوکز تبدیل می‌کنند، می‌باشند.



▲ **شکل ۳ـ۹ (شکل رنگی) مکان لیزوزوم‌ها و میتوکندری‌ها در یک سلول زنده اندوتلیال سرخرگ شش گاوی.** سلول با رنگ فلورسانس سبز که به‌طور ویژه به میتوکندری‌ها متصل می‌شود، و رنگ فلورسانس قرمز که به‌طور ویژه وارد لیزوزم‌ها می‌شود رنگ‌آمیزی شده است. تصویر با استفاده از برنامه کامپیوتری ساده که در آخر فصل بحث شده است پررنگ شده است. N = هسته

شبکه آندوپلاسمی شبکه‌ای از غشاهای داخلی متصل به همدیگر می‌باشد

عموماً، بزرگ‌ترین غشاء در یک سلول یوکاریوتی **شبکه آندوپلاسمی** (ER) را احاطه کرده است ER شبکه‌ای از کیسه‌های بسته و صاف احاطه شده با غشاء می‌باشد که **سیسترنا** نامیده می‌شود (شکل ۱ـ۹ را ملاحظه کنید). شبکه اندوپلاسمی عملکردهای مهمی در سلول دارد اما عملکرد ویژه آن در سنتز لیپیدها، پروتئین‌های غشایی و پروتئین‌های ترشحی می‌باشد. شبکه آندوپلاسمی صاف به این دلیل صاف است که فاقد ریبوزوم می‌باشد. در مقابل، بخش



▲ **شکل ۴-۹ میکروگراف الکترونی اندامک‌های مختلف را در یک سلول کبدی موش نشان می‌دهد.** دو پراکسیزوم (P) در نزدیک میتوکندری (M) و شبکه اندوپلاسمی (ER) خشن و صاف قرار گرفته است. هم‌چنین تجمعات گلیکوژن، پلی‌ساکاریدی که مولکول اولیه ذخیره‌کننده گلوکز در جانوران می‌باشد، نیز قابل مشاهده می‌باشد.

سیتوزولی شبکه آندوپلاسمی خشن به وسیله ریبوزوم‌ها پر شده است.

شبکه اندوپلاسمی صاف سنتز اسیدهای چرب و فسفولیپیدها در ER صاف رخ می‌دهد. اگرچه بسیاری از سلول‌ها ER بسیار کم‌تری دارند، این اندامک‌ها در هپاتوسیت‌ها به وفور یافت می‌شود. آنزیم‌های موجود در ER صاف کبد هم‌چنین با تبدیل مواد شیمیایی هیدروفوب مثل آفت‌کش‌ها و کارسینوژن‌ها به مواد محلول در آب، فرآورده‌های کونژوگه که می‌توانند از بدن دفع شوند، آنها را سم‌زدایی می‌کنند. مقادیر بالای چنین ترکیباتی باعث ازدیاد ER صاف در سلول‌های کبدی می‌شوند.

شبکه اندوپلاسمی خشن ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی متصل به ER خشن پروتئین‌های غشایی و اندامک‌ها و در واقع تمام پروتئین‌هایی که از سلول ترشح می‌شوند را سنتز می‌کنند (فصل ۱۳). توالی‌های موجود در زنجیره پلی‌پپتیدی که بر روی ریبوزوم سنتز می‌شود متعاقباً به پروتئین‌های موجود در غشاء ER خشن متصل می‌شود و در نتیجه ریبوزوم را در ER متمرکز می‌کند. وقتی که پلی‌پپتید در حال رشد از ریبوزوم بیرون می‌آید، به کمک پروتئین‌های انتقال‌دهنده ویژه غشایی از غشاء ER صاف عبور کرده و به فضای داخلی یا لومن می‌رود. در آنجا پروتئین به کمک کاتالیست‌های تاکننده که **چاپرون** نامیده می‌شوند تا می‌شود. پروتئین‌های ترشحی به طرق مختلف به وسیله آنزیم‌های موجود در لومن ER تغییر می‌یابند، این تغییرات شامل اضافه شدن قندها (گلیکوزیلاسیون) و تشکیل باند دی‌سولفیدی می‌باشد. پروتئین‌های غشایی به صورت متصل به غشاء ER خشن باقی می‌مانند، و پروتئین‌هایی که قرار است ترشح شوند در لومن اندامک تجمع می‌یابند.

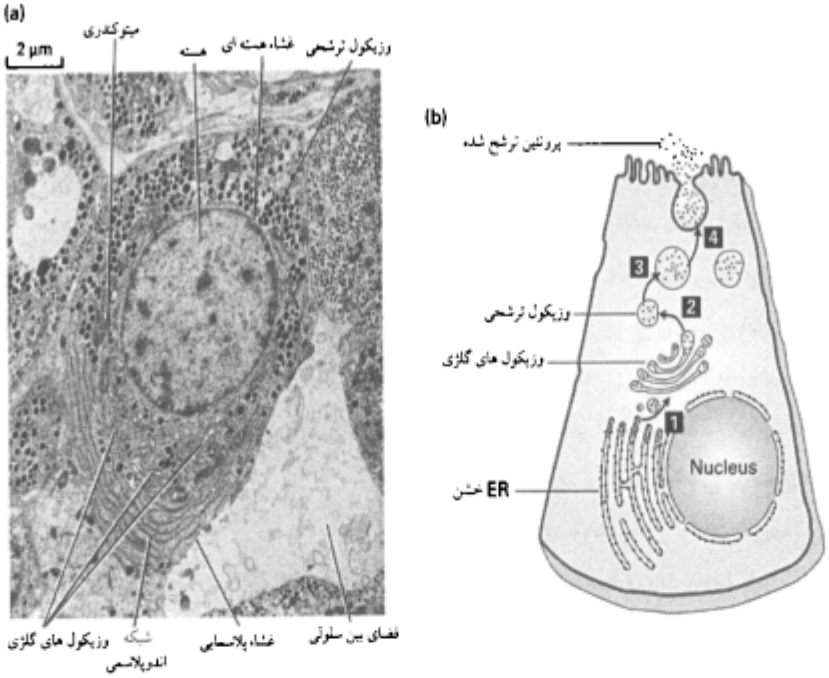
تمامی سلول‌های یوکاریوتی دارای مقدار قابل مشخصی ER خشن می‌باشند زیرا آن برای سنتز پروتئین‌های غشای پلاسمایی و پروتئین‌های ترشحی که سازندهٔ ماتریکس خارج سلولی هستند ضروری می‌باشد. فسفولیپیدها نیز در ارتباط با ER خشن سنتز می‌شوند. به‌طور ویژه ER خشن در سلول‌های تخصص‌یافته که مقدار بیشتری پروتئین‌های ترشحی می‌سازند فراوان هستند. برای مثال، پلاسماسل‌ها آنتی‌بادی تولید می‌کنند، سلول‌های آسینار لوزالمعده آنزیم‌های گوارشی را سنتز می‌کنند و سلول‌های موجود در جزایر لانگرهانس لوزالمعده هورمون‌های پلی‌پپتیدی انسولین و گلوکاگون را سنتز می‌کنند. در این سلول‌ها و سایر سلول‌های ترشحی، بخش اعظمی از سیتوزول با ER خشن و وزیکول‌های ترشحی پر شده است (شکل ۵-۹).

کمپلکس گلژی پروتئین‌های ترشحی و غشایی را پردازش و دسته‌بندی می‌کند

چند دقیقه بعد از سنتز پروتئین‌ها در ER خشن، بیشتر آنها توسط وزیکول‌های ناقل ER را ترک می‌کنند. این وزیکول‌ها، که از ناحیه ER خشن جوانه می‌زند ریبوزوم ندارد و پروتئین‌ها را به یک اندامک دیگر محصور شده با غشاء بنام **کمپلکس گلژی** (شکل ۵-۹ را ملاحظه کنید) حمل می‌کنند. کمپلکس گلژی نام خود را از میکروسکوپیست ایتالیایی کامیلوگلژی[1] گرفته است.

بازسازی سه‌بُعدی از برش‌های متوالی کمپلکس گلژی نشان می‌دهد که این اندامک یک سری وزیکول یا کیسه‌های غشایی پهن (سیسترنا) می‌باشد که توسط تعدادی وزیکول کروی احاطه شده است (شکل ۶-۹). تجمع سیسترن‌های گلژی باعث بوجود آمدن سه ناحیه مشخص، سیس، میانه و ترانس گردیده است. وزیکول‌های ناقل حاصل از ER خشن با ناحیه سیس کمپلکس گلژی ترکیب می‌شوند و محتوای پروتئینی خود را آزاد می‌کنند. همان‌گونه که در فصل ۱۴ با جزئیات بیشتر آورده شده است، این پروتئین‌ها سپس از ناحیه سیس به میانه و ترانس پیشروی می‌کنند. در هر ناحیه آنزیم‌های لومنی

1- Camillio Golgi



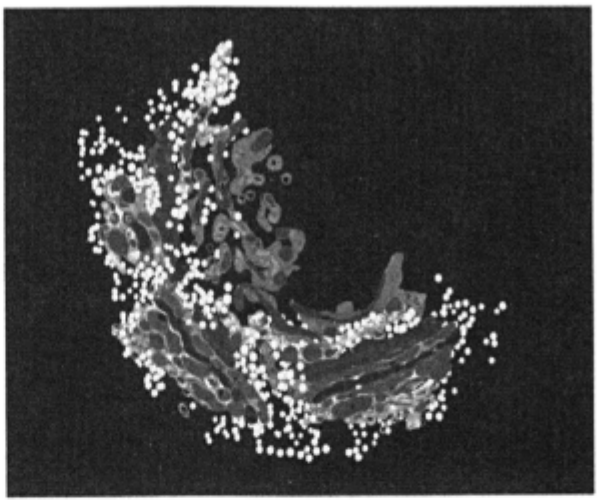
▲ **شکل ۵ـ۹ (شکل رنگی) ویژگی‌های شاخص سلول‌های تخصص یافته که مقادیر بیشتری از پروتئین‌های خاص (مثل هورمون و آنتی‌بادی‌ها) را ترشح می‌کنند.** (a) میکروگراف الکترونی مقطع نازکی از سلول ترشح‌کننده هورمون هیپوفیز رت. انتهای پایه سلول (پایین) که در آن هورمون‌های پلی‌پپتیدی سنتز و بسته‌بندی می‌شوند با ER خشن و کیسه‌های گلژی پر شده است. در انتهای رأسی سلول (بالا) وزیکول‌های ترشحی فراوانی وجود دارد که دارای هورمون‌های ترشحی هستند. (b) دیاگرام یک سلول ترشحی معمولی که مسیرهای طی شده یک پروتئین ترشحی (نقاط قرمز کوچک) را نشان می‌دهد. پروتئین‌های ترشحی دقیقاً بعد از سنتز بر روی ریبوزوم‌های (نقاط سیاه کوچک) ER خشن، در لومن ER خشن یافت می‌شود.وزیکول‌های ناقل از ER جوانه می‌زنند و این پروتئین‌ها را به کمپلکس گلژی انتقال می‌دهند ❶ تا در آنجا در وزیکول‌های ترشحی نابالغ تغلیظ و بسته‌بندی شوند ❷. این وزیکول‌ها سپس با همدیگر ترکیب می‌شوند و وزیکول‌های ترشحی بالغ بزرگ‌تری را تشکیل می‌دهند که آب خود را به سیتوزول می‌دهند و تقریباً مخلوط کریستالین پروتئین‌های ترشحی را حمل می‌کنند ❸. بعد از این‌که وزیکول‌ها در زیر سطح رأسی سلول تجمع پیدا کردند، آنها در پاسخ به تحریک هورمونی مناسب یا عصبی با غشاء پلاسمایی ترکیب شده و محتویات خودشان را آزاد می‌کنند (اگزوسیتوز) ❹.

متعددی پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشایی را بر حسب ساختار و مقصد نهایی آنها تغییر می‌دهند.

پروتئین‌های ترشحی و غشایی بعد از این‌که در کمپلکس گلژی تغییر یافتند توسط گروه دومی از وزیکول‌ها که از بخش ترانس کمپلکس گلژی جوانه می‌زنند به خارج از کمپلکس انتقال می‌یابند. بعضی ازوزیکول‌ها پروتئین‌هایی را که مقصدشان غشای پلاسمایی است یا پروتئین‌های محلول که قرار است به محیط خارج سلولی ترشح شوند را حمل می‌کنند؛ بعضی دیگر از وزیکول‌ها پروتئین‌های محلول یا غشایی را به لیزوزوم‌ها یا سایر اندامک‌ها انتقال می‌دهند. جوانه‌زنی ممتد وزیکول‌ها باعث تجمع فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی خواهد شد، اما وزیکول‌های اندوسیتوزی (شکل ۲ـ۹ را ملاحظه کنید) فسفولیپیدهای غشایی را به لیزوزوم‌ها یا به گلژی بر می‌گردانند. با وجود این وزیکول‌های دیگری از وزیکول‌های گلژی جوانه می‌زنند و با وزیکول‌های اولیه گلژی یا با ER خشن ترکیب می‌شوند. چگونه وزیکول‌های ناقل داخل سلولی «می‌دانند» که با کدام غشاها ترکیب شوند و محتویات خودشان را به کجا انتقال دهند نیز در فصل ۱۴ بحث شده است.

واکوئل‌های گیاهی مولکول‌های کوچک را ذخیره می‌کنند و سلول را قادر می‌سازند تا سریعاً طویل شود

بیشتر سلول‌های گیاهی حداقل دارای یک واکوئل داخلی می‌باشد. تعداد و اندازه واکوئل‌ها بستگی به نوع سلول و مرحله رشد آن دارد؛ یک واکوئل واحد ممکن است ۸۰٪ سلول گیاهی بالغ را اشغال کرده باشد (شکل ۷ـ۹). انواع پروتئین‌های انتقال‌دهنده در غشاء واکوئل وجود داردکه به سلول‌های گیاهی اجازه می‌دهند تا آب، یون‌ها و مواد غذایی (مثل ساکاروز، اسیدهای آمینه) را در واکوئل‌ها انباشت و ذخیره کنند (فصل ۱۱). همانند لیزوزوم، لومن واکوئل نیز دارای تعداد زیادی آنزیم‌های تجزیه‌کننده می‌باشد و pH آن نیز اسیدی است که توسط پروتئین‌های انتقال‌دهنده موجود در غشای واکوئلی حفظ می‌شود.



▶ **شکل ۶ـ۹ (شکل رنگی) مدلی از کمپلکس گلژی که براساس بازسازی‌های سه‌بُعدی تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده است.** وزیکول‌های ناقل (دایره‌های سفید) که از ER خشن جوانه می‌زنند با غشاهای سیس (آبی روشن) کمپلکس گلژی ترکیب می‌شوند. پروتئین‌ها توسط مکانیسم‌هایی که در فصل ۱۴ شرح داده شده است، از ناحیه سیس به ناحیه میانی و سرانجام به ناحیه ترانس کمپلکس گلژی حرکت می‌کنند. سرانجام وزیکول‌ها از غشاهای ترانس گلژی (نارنجی و قرمز) جوانه زده و بعضی از آنها به سمت سطح سلول و بعضی دیگر به سمت لیزوزوم‌ها حرکت می‌کنند. کمپلکس گلژی، همانند شبکه اندوپلاسمی خشن، در سلول‌های ترشحی به مقدار فراوان یافت می‌شوند.

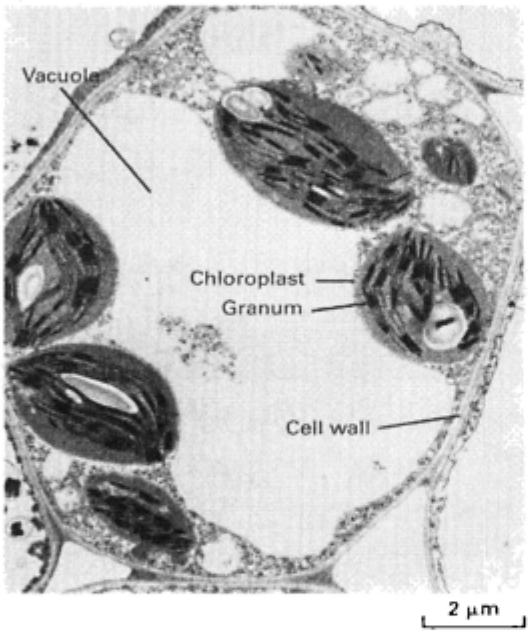
بنابراین واکوئل‌های گیاهی نیز ممکن است عملکرد تجزیه‌ای مشابه با لیزوزوم سلول‌های جانوری داشته باشند. واکوئل‌های ذخیره‌ای مشابهی در جلبک‌های سبز و بسیاری از میکروارگانیسم‌های دیگری مثل قارچ‌ها یافت شده است.

مانند بسیاری از غشاهای سلولی، غشای واکوئلی به آب نفوذپذیر است اما به مولکول‌های کوچک ذخیره شده در خود نفوذپذیری ضعیف‌تری دارد. به دلیل این‌که غلظت مواد حل‌شونده در لومن واکوئل بیشتر از سیتوزول یا مایعات خارج سلولی است، آب توسط فشار اسمزی تمایل دارد که به درون واکوئل‌ها حرکت کند. این جریان ورودی آب، که باعث می‌شود واکوئل بزرگ شود، فشار هیدرواستاتیک یا تورگر[1] در درون سلول ایجاد می‌کند. این فشار توسط مقاومت مکانیکی دیواره سلولی سلولزدار احاطه‌کننده سلول‌های گیاهی متعادل می‌گردد. تورگر در بیشتر سلول‌های گیاهی ۲۰ـ۱۵ اتمسفر (atm) می‌باشد؛ در نتیجه دیواره سلولی آنها باید به اندازه کافی قوی باشد تا به این فشار به صورت کنترل شده واکنش دهد. بر خلاف سلول‌های جانوری، سلول‌های گیاهی می‌توانند سریع‌تر، با سرعت ۷۵ـ۲۰μm/h رشد کنند. این طویل‌شدگی، که همراه با رشد گیاه است، وقتی که بخشی از دیواره سلولی نسبتاً الاستیک تحت فشار ایجاد شده با آب داخل واکوئلی کشیده شود رخ می‌دهد.

هسته دارای DNA ژنومی، دستگاه سنتز RNA، و یک ماتریکس رشته‌ای می‌باشد

هسته، بزرگ‌ترین اندامک موجود در سلول‌های جانوری است که به وسیله دو غشاء احاطه شده است. هر غشاء دارای انواع مختلفی از پروتئین‌ها می‌باشد. غشای داخلی هسته، هسته را مشخص می‌کند. در بسیاری از سلول‌ها، غشای خارجی هسته ادامه شبکه

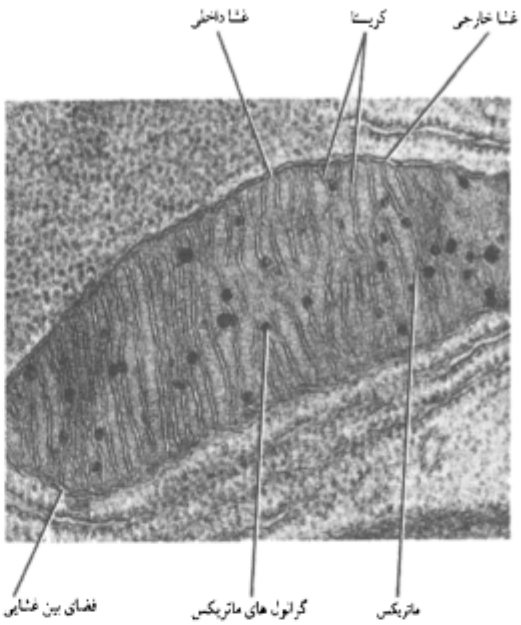
(a)



▲ **شکل ۷ـ۹ میکروگراف الکترونی مقطع نازکی از سلول برگ که در آن واکوئل بزرگی قابل مشاهده است.** در این سلول یک واکوئل بزرگ بیشتر حجم سلول را اشغال کرده است. بخش‌هایی از پنج کلروپلاست و دیواره سلولی نیز قابل رؤیت است. به بخش‌های داخلی کلروپلاست‌ها توجه شود.

اندوپلاسمی خشن می‌باشد، و فضای بین دو غشای داخلی و خارجی هسته ادامه لومن شبکه اندوپلاسمی خشن می‌باشد (شکل ۱ـ۹ را ملاحظه کنید). به نظر می‌رسد که دو غشای هسته‌ای در **منافذ هسته‌ای**[2] به یکدیگر متصل شده‌اند. منافذ هسته‌ای کمپلکس‌های حلقه مانند می‌باشد که از پروتئین ویژه به نام **نوکلئوپورین**[3]

1- Turgor
2- Nuclear Pores
3- Nucleoporin



▲ **شکل ۸ـ۹ میکروگراف الکترونی یک میتوکندری.** بیشترین مقدار تولید ATP در سلول‌های غیرفتوسنتزی در میتوکندری‌ها رخ می‌دهد. غشای داخلی، که فضای ماتریکسی را احاطه کرده است، پیچیدگی‌هایی دارد، که کریستا نامیده می‌شود. گرانول‌های ماتریکسی حاوی کلسیم را نیز می‌توان در شکل مشاهده کرد.

تشکیل شده‌اند و مواد از طریق آن بین هسته و سیتوزول حرکت می‌کند. ساختار منافذ هسته‌ای و انتقال تنظیم شده مواد بین آنها باجزئیات بیشتر در فصل ۸ بررسی شده است.

بیشتر RNA ریبوزومی سلول در **هستک**، یک زیر بخش هسته‌ای که به وسیله غشای فسفولیپیدی احاطه نشده است، سنتز می‌شود. پروتئین‌های ریبوزومی، مانند پروتئین‌های کد شونده توسط هسته، در سیتوزول ساخته می‌شود. آنها از طریق منافذ هسته‌ای به هسته وارد می‌شوند و در هستک به RNAهای ریبوزومی اضافه می‌شوند. زیر واحدهای ریبوزومی کامل شده یا نسبتاً کامل، از طریق منفذ هسته‌ای به سیتوزول هدایت می‌شود تا در سنتز پروتئین مورد استفاده قرار گیرد (فصل ۴). در اریتروسیت‌های بالغ مهره‌داران غیرپستاندار و در انواع سلول‌های «در حال استراحت[1]»، هسته غیرفعال یا خفته می‌باشد و سنتز DNA و RNA خیلی کم‌تر صورت می‌گیرد. بطور مشابه، mRNA و tRNA در هسته سنتز شده و متحمل پردازش گسترده‌ای در هسته می‌شوند. همچنین ذراتی که دارای این RNAها هستند از طریق منافذ هسته‌ای از هسته به سیتوزول می‌روند.

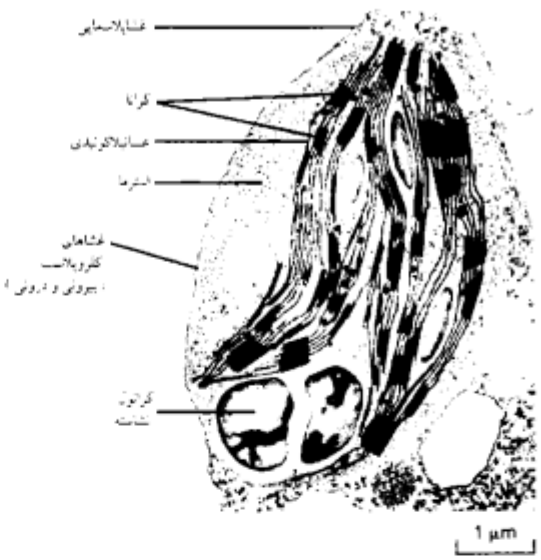
بسته‌بندی DNA هسته‌ای در کروموزوم‌ها در فصل ۶ توضیح داده شد. تنها در هنگام تقسیم سلولی است که کروموزوم‌ها توسط میکروسکوپ نوری قابل رؤیت هستند. در میکروسکوپ الکترونی، نواحی غیرهستکی هسته که نوکلئوپلاسم نامیده می‌شود را می‌توان در نواحی که به صورت سیاه و روشن رنگ‌آمیزی شده مشاهده کرد. نواحی تیره، که اغلب در نزدیک غشای هسته‌ای می‌باشد، دارای DNA فشرده است و **هتروکروماتین** نامیده می‌شود (شکل ۶ـ۳۳ a را ملاحظه کنید). پروتئین‌های رشته‌ای بنام **لامین** که یک شبکه دوبُعدی در سطح داخلی غشای داخلی تشکیل می‌دهد، به آن شکل می‌دهد و باعث اتصال DNA به آن می‌گردد. تجزیه این شبکه در اوایل تقسیم سلولی رخ می‌دهد و ما در فصل ۲۰ آن را با جزئیات بیشتری توضیح داده‌ایم.

میتوکندری‌ها مکان‌های اصلی تولید ATP در سلول‌های هوازی غیر فتوسنتزی می‌باشند

بیشتر سلول‌های یوکاریوتی میتوکندری‌های زیادی دارند به‌طوری که تا ۲۵٪ حجم سیتوپلاسم را اشغال می‌کنند (شکل ۳ـ۹ را ملاحظه کنید). این اندامک‌های پیچیده، مکان اصلی تولید ATP در متابولیسم هوازی می‌باشند و عموماً از نظر اندازه تنها از هسته، واکوئل و کلروپلاست‌ها (نیز ATP تولید می‌کنند) کوچکتر هستند.

دو غشایی که یک میتوکندری را احاطه کرده است از نظر ترکیب و عملکرد متفاوت می‌باشند. غشای خارجی، که تقریباً از ۵۰٪ لیپید و ۵۰٪ پروتئین تشکیل شده است، دارای پروتئین‌های پورین (شکل ۱۸ـ۱۰ را ملاحظه کنید) هستند که باعث می‌شود غشاء به مولکول‌هایی کوچک‌تر از ۱۰/۰۰۰ نفوذپذیر باشد. غشای داخلی دارای نفوذپذیری کم‌تری می‌باشد؛ نواحی سطحی غشای داخلی شدیداً توسط تعداد بیشتری پیچیدگی، یا کریستا که به سمت ماتریکس یا فضای مرکزی است، افزایش یافته است (شکل ۸ـ۹). در سلول‌های غیرفتوسنتزی، اسیدهای چرب و گلوکز سوخت اصلی برای سنتز ATP می‌باشد. در تجزیه کامل هوازی گلوکز به CO_2 و H_2O تقریباً ۳۰ مولکول ATP تولید می‌شود (تعداد دقیق آن هنوز سؤال‌برانگیز است). در سلول‌های یوکاریوتی، مراحل اولیه تجزیه گلوکز در سیتوزول انجام می‌شود، بطوری که به ازای هر مولکول گلوکز ۲ مولکول ATP تولید می‌شود. مراحل نهایی اکسیداسیون و سنتز ATP توسط آنزیم‌های موجود در ماتریکس میتوکندری و غشای داخلی انجام می‌شود (فصل ۱۲). به ازای هر مولکول گلوکز در

1- Resting



▲ **شکل ۹ـ۹ میکروگراف الکترونی یک کلروپلاست گیاهی.** وزیکول‌های غشایی درونی (تیلاکوئیدها) ترکیب شده و تشکیل توده (گرانا) می‌دهند که در ماتریکس (استروما) قرار گرفته‌اند. تمامی کلروفیل‌های سلول در غشای تیلاکوئیدها، مکانی که در هنگام فتوسنتز تولید ATP توسط نور القا می‌شود، قرار گرفته‌اند.

میتوکندری ۲۸ مولکول ATP تولید می‌شود. به‌طور مشابه کل ATP تولید شده در اثر اکسیداسیون اسیدهای چرب به CO_2 در میتوکندری‌ها ایجاد می‌شود. بنابراین میتوکندری‌ها می‌توانند به عنوان «نیروگاه انرژی[1]» سلول در نظر گرفته شوند.

کلروپلاست‌ها دارای بخش‌های درونی هستند که در آنجا فتوسنتز رخ می‌دهد

به استثنای واکوئل‌ها، **کلروپلاست‌ها** بزرگ‌ترین و مشخص‌ترین اندامک در سلول‌های گیاهان و جلبک‌های سبز می‌باشند. طول آنها ۱۰μm و قطر آنها ۰/۵ـ۲μm می‌باشد، اما اندازه و شکل آنها در سلول‌های مختلف مخصوصاً در جلبک‌ها متغیر می‌باشد. علاوه بر غشای دوتایی که کلروپلاست‌ها را احاطه کرده است، این اندامک‌ها هم‌چنین دارای یک سیستم درونی وسیع از کیسه‌های محصور با غشاء می‌باشند که **تیلاکوئید** نامیده می‌شود. تیلاکوئیدها پهن شده و دیسک تشکیل می‌دهند (شکل ۹ـ۹). تیلاکوئیدها توده‌هایی بنام گرانا تشکیل می‌دهند که در یک فضای ماتریکسی بنام استروما احاطه شده‌اند. غشاهای تیلاکوئیدی دارای رنگیزه‌های سبز (**کلروفیل**) و رنگیزه‌های دیگری که نور را جذب می‌کنند، به علاوه آنزیم‌هایی که در هنگام فتوسنتز ATP تولید می‌کنند، می‌باشد. بخشی از ATP توسط آنزیم‌های موجود در استروما صرف تبدیل CO_2 به حد واسطهای سه کربنه می‌شود. سپس حد واسطها به سیتوزول انتقال یافته و به قندها تبدیل می‌شوند.

همان‌طور که در فصل ۱۲ توضیح داده شده است مکانیسم‌های مولکولی که در آن ATP در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها تولید می‌شود مشابه می‌باشد. کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها ویژگی‌های مشترک دیگری نیز دارند. هر دو اغلب از بخشی از سلول به بخش دیگر مهاجرت می‌کنند و دارای DNA مخصوص به خودشان هستند، که برخی از پروتئین‌های کلیدی اندامکی را کُد می‌کنند (فصل ۶). پروتئین‌هایی که توسط DNA میتوکندریایی یا کلروپلاستی سنتز می‌شوند توسط ریبوزوم‌های موجود در این اندامک‌ها سنتز می‌شود. با وجود این بسیاری از پروتئین‌های موجود در این اندامک‌ها توسط DNA هسته‌ای کد می‌شود و در سیتوزول سنتز می‌گردد؛ سپس این پروتئین‌ها طی فرایندی که در فصل ۱۳ توضیح داده شده است به این اندامک‌ها وارد می‌شوند.

نکات کلیدی بخش ۹.۱

اندامک‌های سلول یوکاریوتی

- تمامی سلول‌های یوکاریوتی دارای هسته و اندامک‌های دیگر در سیتوپلاسم خودشان می‌باشند (شکل ۹ـ۱ را ملاحظه کنید).
- هسته، میتوکندری و کلروپلاست توسط دو تا غشای دو لایه که توسط یک فضای بین غشایی از هم تفکیک شده‌اند احاطه شده‌اند. اندامک‌های دیگر توسط یک غشاء احاطه شده‌اند.
- غشای پلاسمایی به عنوان یک مانع نفوذپذیری عمل می‌کند. غشاء دارای پروتئین‌های متعددی می‌باشد که مواد تغذیه‌ای و مولکول‌های زائد را از خود عبور می‌دهد. بعضی از این پروتئین‌ها به اجزای ماتریکس خارج سلولی و در گیاهان به دیواره سلولی متصل می‌شوند. هم‌چنین غشای پلاسمایی بسیاری از سلول‌های یوکاریوتی دارای پروتئین‌های گیرنده‌ای می‌باشند که به مولکول‌های پیام ویژه متصل می‌گردد.
- اندوزوم‌ها پروتئین‌های غشای پلاسمایی و مواد محلول محیط خارج سلولی را به داخل سلول می‌کشند و آنها را به غشاء برمی‌گرداند و یا به منظور تجزیه به سمت لیزوزوم هدایت می‌کند.
- لیزوزوم‌ها دارای یک محیط اسیدی هستند و دارای هیدرولازهای متعددی می‌باشند که اجزای فرسوده یا غیرضروری سلولی و بسیاری از مواد جذب شده را تجزیه می‌کنند.

1- power plants

■ پراکسیزوم‌ها اندامک‌های کوچکی می‌باشند، که دارای آنزیم‌هایی هستند که ترکیبات آلی متعددی را بدون تولید ATP اکسید می‌کنند. فراورده‌های حاصل از اکسیداسیون در واکنش‌های بیوسنتزی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

■ پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشایی بر روی شبکه اندوپلاسمی خشن سنتز می‌شوند، شبکه اندوپلاسمی خشن شبکه پهن کیسه‌های غشایی می‌باشد که بر روی آنها ریبوزوم‌ها قرار دارند.

■ پروتئین‌های سنتز شده بر روی ER خشن ابتدا به کمپلکس گلژی می‌روند، تا در آنجا پردازش و دسته‌بندی شوند و سپس به سطح سلول یا مقصدهای دیگری انتقال داده شوند. (شکل ۵ـ۹ را ملاحظه کنید).

■ سلول‌های گیاهی دارای یک یا چند واکوئل بزرگ هستند که مکان ذخیره‌سازی یون‌ها و مواد غذایی می‌باشد. جریان اسمزی آب به داخل واکوئل‌ها باعث تولید فشار تورژسانسی می‌کند که غشای پلاسمایی را به دیواره سلولی فشار می‌دهد.

■ هسته مکان ژنوم سلول می‌باشد. غشای داخلی و خارجی در منافذ هسته‌ای به یکدیگر متصل شده‌اند تا از طریق آن مواد بین هسته و سیتوزول حرکت کند. غشای خارجی هسته ادامه شبکه اندوپلاسمی خشن می‌باشد.

■ میتوکندری‌ها دارای یک غشای خارجی نفوذپذیر و یک غشای داخلی شدیداً چین‌خورده می‌باشند. آنزیم‌های موجود در غشای داخلی میتوکندری و ماتریکس مرکزی مراحل پایانی اکسیداسیون قند و لیپید و تولید ATP را کاتالیز می‌کنند.

■ کلروپلاست‌ها دارای یک سیستم پیچیده‌ای از غشاهای تیلاکوئیدی می‌باشند. این غشاها دارای رنگیزه‌ها و آنزیم‌هایی هستند که در هنگام فتوسنتز نور را جذب کرده و ATP تولید می‌کنند.

۹ـ۲ میکروسکوپ نوری: مشاهده ساختار سلولی و مکان‌یابی پروتئین‌های سلولی

سال‌های زیادی است که میکروسکوپ نوری یک بخش مهمی از تحقیقات در زمینه سلول‌های یوکاریوتی شده است. میکروسکوپ‌های نوری پایه در شمارش سلول‌های تحت مطالعه و روش‌های ساده رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار می‌گیرد و مطالعه سلول‌های زنده را قادر می‌سازد. تکنیک‌های بسیار تخصصی در میکروسکوپ نوری به محقق اجازه می‌دهد که حرکاتی از قبیل خزش سلولی در امتداد سوبسترا، کشش اکسون‌های عصبی، و حرکات کروموزوم‌ها و اندامک‌ها را در سلول مشاهده کند. با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیب، محققان می‌توانند در یک سلول یا یک موجود زنده، **کیمری** از پروتئین مورد نظر با پروتئین دارای فلورسنت ذاتی را بیان کنند. معمولاً یک کیمر عملکرد نرمال پروتئین مورد نظر را نشان می‌دهد و مکان آن در سلول‌های زنده با گذشت زمان آشکار می‌شود. به کمک ایمونوفلورسانس محققان می‌توانند مکان پروتئین‌های ویژه را در سلول‌های تثبیت شده و هر گونه تغییرات مکانی را در پاسخ به تغییرات محیط سلول تعیین کنند. در نهایت بسیاری از تصاویر میکروسکوپی را می‌توان در پایگاه داده‌ها در کامپیوتر ذخیره‌سازی کرد؛ بازسازی‌های دیجیتالی این امکان را می‌دهند که به کمک تصاویر دوبعدی اجزای سلولی را بصورت سه‌بعدی بازسازی کرد و تعیین کرد که آیا دو یا چند پروتئین در یک زیر بخش سلولی یافت می‌شوند یا نه.

قدرت تفکیک میکروسکوپ نوری تقریباً ۰/۲μm می‌باشد

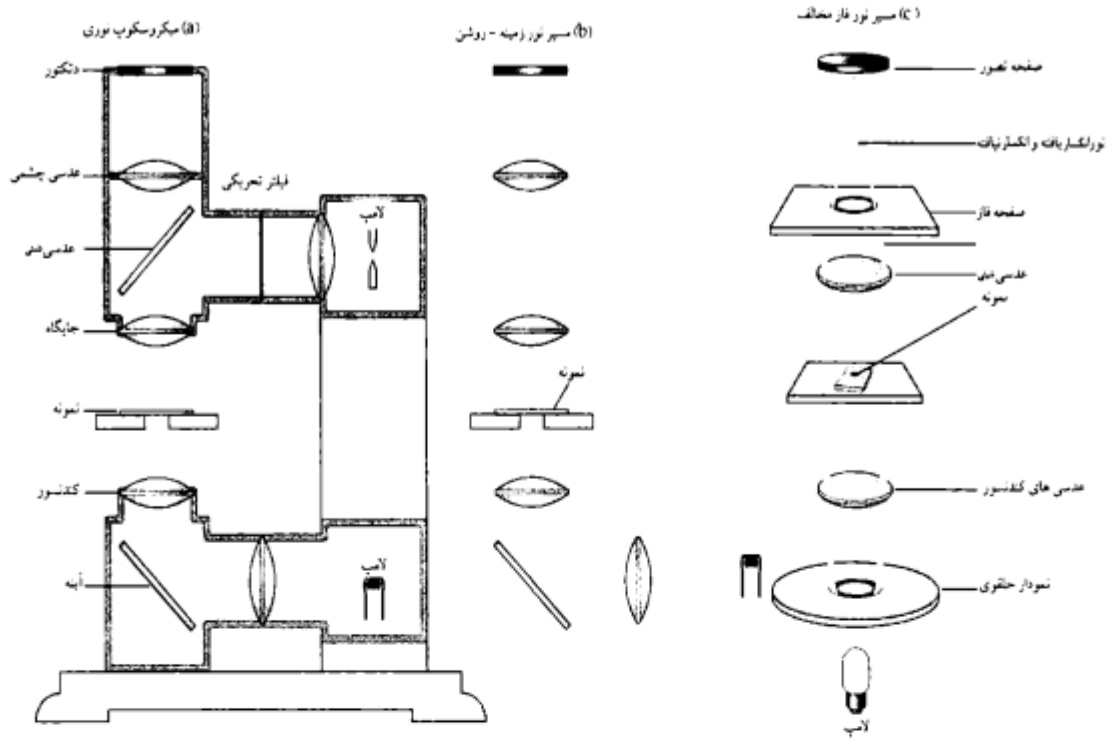
تمامی میکروسکوپ‌ها از اشیاء کوچک تصویر بزرگ می‌سازند اما طبیعت تصویر بستگی به نوع میکروسکوپ و روش تهیه نمونه دارد. میکروسکوپ ترکیبی[1]، که در میکروسکوپی نوری زمینه روشن معمولی مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارای چند لنز می‌باشدکه تصویر نمونه تحت مطالعه را بزرگتر می‌کند (شکل a,b ۱۰ـ۹). بزرگنمایی کلی حاصل بزرگنمایی تک‌تک لنزها می‌باشد هر گاه عدسی شیئی، نزدیک‌ترین عدسی به نمونه، ۱۰۰ برابر بزرگنمایی داشته باشد (عدسی ۱۰۰x، حداکثر بزرگنمایی می‌باشد) و عدسی تصویر که گاهی اوقات عدسی چشمی نیز نامیده می‌شود، دارای بزرگنمایی ۱۰ برابر باشد، بزرگنمایی نهایی که توسط چشم انسان یا بر روی فیلم ثبت می‌شود ۱۰۰۰ خواهد بود.

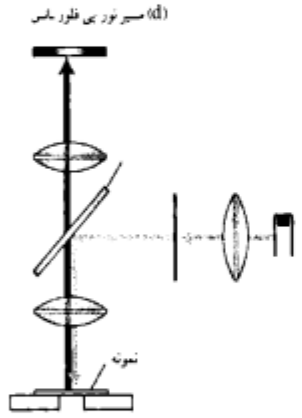
با وجود این، مهم‌ترین ویژگی یک میکروسکوپ، بزرگنمایی آن نمی‌باشد بلکه قدرت تفکیک، یا حد تفکیک آن می‌باشد. حد تفکیک توانایی تشخیص دو نقطه خیلی نزدیک به هم، می‌باشد. اگر تصویر کدر باشد صرفاً بزرگ کردن تصویر یک نمونه به درد نمی‌خورد. حد تفکیک یک عدسی میکروسکوپ از نظر عددی برابر با D، یعنی حداقل فاصله‌ای که بین دو نقطه قابل تشخیص باشد، می‌باشد. هر چقدر مقدار D کوچک‌تر باشد، حد تفکیک بهتر است. مقدار D از معادله زیر به دست می‌آید

$$D = \frac{0/61\lambda}{N\sin\alpha} \qquad (۹ـ۱)$$

α دریچه زاویه‌ای، یا نصف زاویه مخروطی از نور که از نمونه

1- Compound microscope

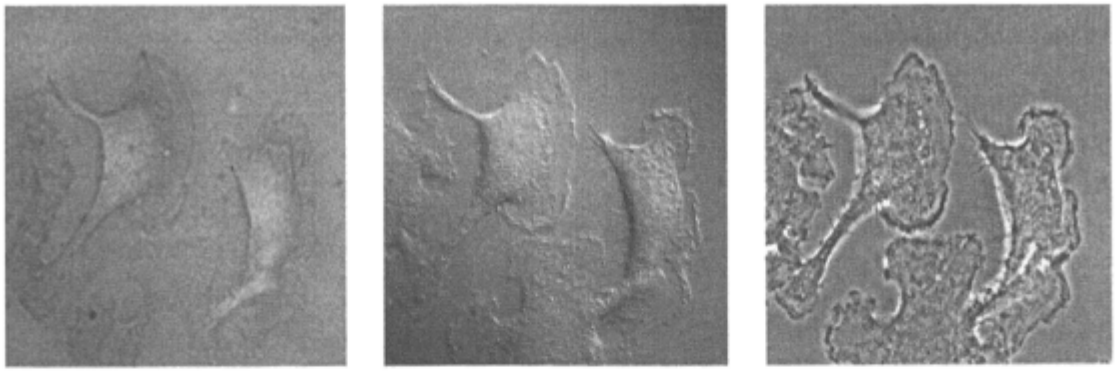




▲ شکل تجربی ۱۰-۹ (شکل رنگی) میکروسکوپ‌های نوری عموماً به سه دسته زمینه روشن (عبوری)، فاز متضاد و میکروسکوپ اپی‌فلورسانس تقسیم‌بندی می‌شوند. (a) در میکروسکوپ نوری معمولی، نمونه معمولاً بر روی یک اسلاید شیشه‌ای شفاف گذاشته می‌شود و در جایگاه نمونه متحرک قرار داده می‌شود. هر سه روش تصویربرداری به سیستم‌های مختلف نوری و کندنسورهای مختلف نیاز دارد؛ میکروسکوپ زمینه روشن و اپی‌فلورسانس از سیستم‌های جمع‌کننده نور و شناسایی یکسانی استفاده می‌کنند. (b) در میکروسکوپ زمینه روشن نور توسط یک عدسی کندنسور که در زیر جایگاه نمونه است از لامپ تنگستن بر روی نمونه متمرکز می‌شود؛ نور مسیرهایی را که به رنگ زرد نشان داده شده است طی می‌کند. (c) در میکروسکوپ فاز متضاد، نور از یک نمودار حلقوی که به صورت حلقه دایره‌ای (حلقه) بر روی نمونه می‌افتد، عبور می‌کند. نوری که بدون ممانعت از نمونه عبور می‌کند توسط عدسی شیئی بر روی حلقه ضخیم خاکستری صفحه فاز، که مقداری از نورهای مستقیم را جذب می‌کند و فاز آن را به اندازه یک چهارم طول موج تغییر می‌دهد، متمرکز می‌سازد. هر گاه نمونه‌ای نور را بشکند، فاز بعضی از امواج نوری تغییر می‌یابد (خطوط سبز) و امواج نوری از ناحیه نازک و شفاف صفحه فاز مجدداً جهت‌دهی می‌شود. انکسار یافته و انکسار نیافته مجدداً در صفحه تصویر ترکیب می‌شوند و تصویر تشکیل می‌شود. (d) در میکروسکوپ اپی‌فلورسانس، نور ماوراء بنفش (خط سبز) لامپ جیوه که در بالای صفحه قرار گرفته است توسط عدسی شیئی بر روی نمونه متمرکز می‌شود. فیلترهای موجود در مسیر نور، طول موج مشخصی از نور ماوراء بنفش را انتخاب می‌کنند و طوری آرایش یافته‌اند که فقط نور منتشره از طول موج مشخصی را که طویل‌تر از طول موج نور وارده می‌باشد را جذب کنند (خط قرمز).

به عدسی شیئی می‌رسد؛ N ضریب شکست محیط بین نمونه و عدسی شیئی (برای مثال سرعت نسبی نور در آن محیط نسبت به سرعت آن در هوا)؛ و λ طول موج نور ورودی می‌باشد. حد تفکیک را با استفاده از امواج کوتاه نور (کاهش مقدار λ) یا نور بیشتر (افزایش N یا α) می‌توان بهبود بخشید. توجه شود که بزرگنمایی در این معادله دخیل نمی‌باشد.

به دلیل ویژگی‌های فیزیکی نور و مقادیر α، λ و N محدوده حد تفکیک یک میکروسکوپ نوری، که از نور مرئی استفاده می‌کند، تقریباً ۰/۲μm (۲۰۰nm) می‌باشد. صرف‌نظر از این‌که تصویر چند



▲ **شکل تجربی ۱۱ـ۹ سلول‌های زنده را می‌توان به وسیله تکنیک‌های میکروسکوپی که با ایجاد تداخل اختلاف فاز ایجاد می‌کنند مشاهده کرد.** در این میکروگراف‌ها تصاویر سلول‌های ماکروفاژی زنده کشت داده شده را که به وسیله میکروسکوپ زمینه روشن (چپ)، میکروسکوپ اختلاف تداخلی افتراقی (DIC) (وسط) و میکروسکوپ اختلاف فاز (راست) گرفته شده است می‌توان مشاهده کرد. در یک تصویر اختلاف فاز، سلول‌ها توسط نوارهای یک در میان تاریک و روشن احاطه شده‌اند؛ جزئیات واضح و مبهم به‌طور همزمان در میکروسکوپ اختلاف فاز موجود می‌باشد. در یک تصویر DIC سلول‌ها به نظر دارای برجستگی کاذب هستند. در تصویر DIC به دلیل آن که تنها یک ناحیه باریکی از ناحیه شفاف به تصویر کشیده شده است، تصویر حاصله تکه نوری از جسم می‌باشد.

برابر بزرگ‌تر می‌شود، یک میکروسکوپ نوری معمولی هرگز نمی‌تواند اشیایی کوچک‌تر از $\simeq ۰/۲\mu m$ را تفکیک کند. اما میکروسکوپ‌های نوری جدید که در زیر شرح داده شده است می‌توانند دو شیئی فلورسنت را حتی اگر $\simeq ۲۰nm$ باشند تفکیک کنند.

میکروسکوپ نوری معمولی را می‌توان در ردیابی مکان یک ذره کوچک چند نانومتری مورد استفاده قرار داد. هر گاه ما اندازه دقیق و شکل دقیق یک شیئی را بدانیم ـ مثلاً طلای ۵ نانومتری که به یک آنتی‌بادی متصل شده است که آنهم به نوبه خود به یک پروتئین سطح سلول متصل است ـ و اگر از یک دوربین ویدئویی استفاده کنیم تا تصویر میکروسکوپی را به صورت یک تصویر دیجیتالی ثبت کنیم، کامپیوتر می‌تواند موقعیت مرکز شیئی را تا حد نانومترها محاسبه کند. در این روش، به کمک الگوریتم‌های کامپیوتری می‌توان درمشاهدات خیلی دقیق‌تر نسبت به حد تفکیک میکروسکوپ نوری ـ در این مورد حرکت پروتئین سطح سلولی نشاندار شده با آنتی‌بادی نشاندار با طلا ـ استفاده کرد. هم‌چنین از این تکنیک می‌توان در اندازه‌گیری گام‌های نانومتری مولکول‌ها یا وزیکول‌هایی که در طول فیلامنت‌های اسکلت سلولی حرکت می‌کنند استفاده کرد (شکل ۱۷ـ۲۱، ۱۷ـ۲۶ و ۱۷ـ۲۷ را ملاحظه کنید).

به کمک میکروسکوپ اختلاف فاز و اختلاف تداخلی افتراقی می‌توان سلول‌های زنده را بدون رنگ‌آمیزی مشاهده کرد

در دو روش رایج تصویربرداری، سلول‌های زنده و بافت‌های رنگ‌آمیزی نشده بدلیل وجود اختلاف در ضریب شکست و ضخامت مواد سلولی کنتراست ایجاد می‌شود. این روش‌ها، که میکروسکوپی اختلاف فاز و میکروسکوپی اختلاف تداخلی افتراقی[1] (DIC) (یا میکروسکوپی تداخلی نومارسکی) نامیده می‌شوند، تصاویری تولید می‌شود که از نظر ظاهری متفاوت بوده و ویژگی‌های متفاوت معماری سلولی را می‌توان در آن مشاهده کرد. در شکل ۱۱ـ۹ تصاویر سلول‌های زنده به کمک این دو روش و میکروسکوپ زمینه روشن معمولی مقایسه شده است.

میکروسکوپ اختلاف فاز (شکل c ۱۰ـ۹) تصویری ایجاد می‌کند که در آن درجه تاریکی و روشنایی نمونه بستگی به **ضریب شکست** آن ناحیه دارد. نور در محیطی که دارای ضریب شکست بیشتر می‌باشد خیلی آهسته حرکت می‌کند. بنابراین پرتو نور وقتی که از هوا به شیئی شفاف وارد می‌شود شکست می‌یابد. سرانجام، بخشی از موج نوری که از نمونه عبور می‌کند خواهد شکست و نسبت به موجی که از نمونه عبور نکرده است دارای اختلاف فاز خواهد بود. تفاوت اختلاف فاز آنها به اختلاف ضریب شکست دو مسیر طی شده و ضخامت نمونه بستگی دارد. اگر دو بخش موج نوری که هم فاز

1- Differential interference contrast

▲ **شکل تجربی ۱۲-۹ هیدرتراریخته** *H. vulgaris* **که پروتئین فلورسنت سبز (GFP) را بیان می‌کند.** پلاسمید نوترکیب، که در آن پروموتر ژن β-اکتین H. vulgaris بیان ژن GFP را پیش می‌برد، به جنین آن در مرحله ۲ تا ۸ سلولی ریز تزریق گردید. پلاسمید به ژنوم یک یا چند سلول وارد شده و سپس سلول‌ها تقسیم گردیدند. سلول‌های تولیدکننده GFP (سبز) توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. در نمونه‌هایی که این‌جا نشان داده شده‌اند GFP تنها به سلول‌های اپی‌تلیال اندودرمی داخلی محدود شده است. قطعه A از سلول‌های اپی‌تلیال اندودرمی GFP^+ توسط میکروسکوپ کانفوکال آشکارسازی شده است. میله مقیاس $20\mu m$ است. به وسیله تکنیک‌های تصویربرداری می‌توان سلول‌های تولیدکننده GFP را در هنگام رشد و تمایز موجود زنده دنبال کرد.

هستند مجدداً ترکیب شود نور شفاف خواهیم داشت و هر گاه آنها فاز متفاوتی داشته باشند نوری با روشنایی کم خواهیم داشت. نور انکسار یافته و انکسار نیافته در صفحه تصویر مجدداً ترکیب می‌شود تا تصویر ایجاد شود. میکروسکوپ اختلاف فاز برای مشاهده سلول‌های منفرد یا لایه‌های نازک سلولی مناسب می‌باشد اما برای بافت ضخیم مناسب نمی‌باشد. هم‌چنین این میکروسکوپ در بررسی مکان و حرکت اندامک‌های بزرگ‌تر در سلول‌های زنده کارآیی می‌باشد.

میکروسکوپ DIC بر اساس تداخل بین نور قطبیده می‌باشد و روشی انتخابی برای مشاهده جزئیات کوچک و اشیاء ضخیم می‌باشد. اختلاف حاصله ناشی از تفاوت ضریب شکست شیئی و محیط آن می‌باشد. در تصاویر DIC، به نظر می‌رسد که اشیاء در یک سمت خود سایه‌ای ایجاد می‌کنند. «سایه[1]» اساساً بدلیل تفاوت ضریب شکست نمونه می‌باشد. به کمک میکروسکوپ DIC به آسانی می‌توان اندامک‌های بزرگی مثل هسته و واکوئل‌ها را مشخص کرد. تصویر DIC علاوه بر داشتن یک ظاهر شبه «برجسته[2]»، یک بخش نوری نازک یا تکه‌ای از جسم می‌باشد. بنابراین جزئیات هسته را در نمونه‌های ضخیم (مثل کرم حلقوی کانورابدیتیس الگانس، شکل ۴-۲۱ را ملاحظه کنید) می‌توان به صورت یک سری برش‌های نوری مشاهده کرد، و ساختار سه‌بعدی جسم را به وسیله ترکیب تک‌تک تصاویر DIC بازسازی کرد.

هم میکروسکوپ اختلاف فاز و هم DIC را می‌توان در میکروسکوپ مروری[3]، که در آن سلول در زمان‌های منظم در چندین ساعت عکسبرداری می‌شود، مورد استفاده قرار داد. این روش به محقق اجازه می‌دهد تا حرکت سلولی را مورد مطالعه قرار دهد و به کمک جایگاه نمونه میکروسکوپ دمای نمونه و محیط گاز را کنترل کند.

به کمک میکروسکوپ فلورسانس می‌توان مولکول‌های ویژه را در سلول‌های زنده مکان‌یابی و کمی‌سازی کرد

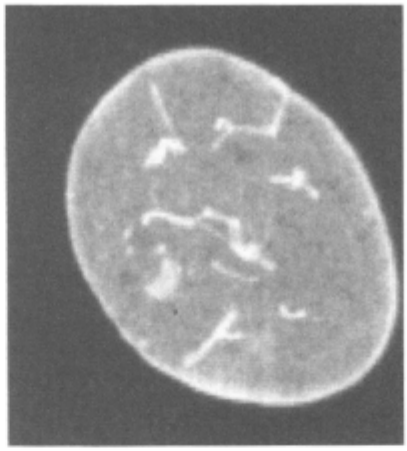
شاید توانمندترین و قدرتمندترین تکنیک برای مکان‌یابی پروتئین‌ها در سلول توسط میکروسکوپ نوری **رنگ‌آمیزی فلورسنت** سلول‌ها و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس می‌باشد. به ماده‌ای که نور را در یک طول موج خاص جذب کند (طول موج تهییجی) و آن را در یک طول موج ویژه نشر کند فلورسنت گفته می‌شود (فلورسانس). در میکروسکوپ‌های فلورسانس پیشرفته، تنها نور فلورسنت منتشره از نمونه در تشکیل تصویر استفاده می‌شود؛ نور طول موج تهییجی فلورسانس را القا می‌کند ولی از فیلترهای موجود در بین عدسی و چشم یا دوربین اجازه عبور پیدا نمی‌کند (شکل d ۱۰-۹).

بیان پروتئین‌های فلورسنت در سلول‌ها و موجودات زنده. از یک پروتئین با فلورسنت ذاتی که در ستاره دریایی *Aequorea victoria* یافت می‌شود در مشاهده سلول‌های زنده و پروتئین‌های ویژه موجود در آن استفاده می‌شود. این پروتئین که پروتئین با فلورسنت سبز (GFP[4]) نامیده می‌شود ۲۳۸ اسیدآمینه دارد و دارای توالی سرین، تیروزین و گلیسین می‌باشد که زنجیره‌های جانبی آنها به‌طور خودبه‌خودی حلقوی شده و ایجاد کروموفور فلورسانس

1- Shadow 2- Relief-like

3- Time-lapse microscopy

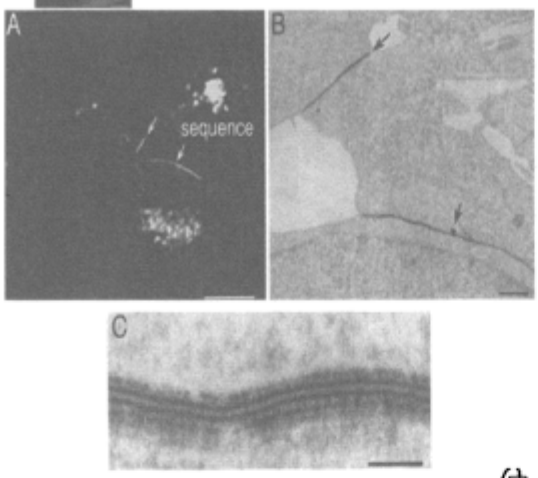
4- Green fluorescent protein (GFP)



▲ **شکل تجربی ۱۳ـ۹ مقطع نوری از سلول زنده CHO-K1 که پروتئین کیمر نوترکیب لامین GFP-A را بیان می‌کند.** در این‌جا هسته تخم‌مرغی شکل نشان داده شده است که لامین A (سفید) غشای داخلی هسته را پوشانده است. لامین A هم‌چنین در ساختارهای شبه توبولی داخل و عرض هسته‌ای یافت می‌شود. در بخش‌های دیگر سلول پروتئین لامین ـ GFP وجود ندارد و بنابراین تاریک دیده می‌شوند.

سبز می‌کند. به کمک تکنیک‌های DNA نوترکیب که در فصل ۵ بحث شد، ژن GFP را می‌توان به سلول‌های کشت شده یا به سلول‌های ویژهٔ موجود در جانوران وارد کرد. سلول‌هایی که ژن را دریافت می‌کنند GFP تولید کرده و در نتیجه زمانی که تحت تابش قرار گیرند فلورسانس سبز نشر می‌کنند؛ همان‌گونه که در شکل ۱۲ـ۹ در یک موجود پرسلولی اولیه، *Cnidairian Hydra Vulgaris*، نشان داده شده است، به‌کمک فلورسانس GFP می‌توان سلول‌های یک بافت یا حتی یک موجود کامل را مکان‌یابی استفاده کرد.

در یک کاربرد ویژه از GFP، پروتئین سلولی مورد نظر با GFP نشاندار می‌شود تا موقعیت آن در سلول مشخص شود. در این تکنیک ژن GFP با ژن پروتئین مورد نظر آمیخته می‌شود، تا یک DNA نوترکیب ایجاد شود. DNA حاصله یک پروتئین طویل کیمر دارای هر دو پروتئین را کُد می‌کند. پروتئین‌های آمیخته شده با GFP عملکرد نرمال خود را حفظ می‌کنند. بنابراین آمیزه‌های GFP یک ابزار بسیار مفید برای بررسی عملکرد نرمال و حرکت پروتئین‌های طبیعی می‌باشد. سلول‌هایی که DNA نوترکیب را دریافت کرده‌اند پروتئین کیمر دارای فلورسانس سبز را است سنتز خواهند کرد به‌طوری که فلورسانس سبز مکان تحت سلولی پروتئین مورد نظر می‌باشد. به عنوان مثال، به‌کمک این تکنیک بیان و توزیع لامین A، پروتئینی که در داخل یا سطح داخلی غشای هسته یافت می‌شود، بررسی شده است؛ لامین A هم‌چنین ساختارهای شبه توبولی



▲ **شکل تجربی ۱۴ـ۹ شناسایی کانکسین ۴۳ نشاندار با تتراسیستئین، پروتئین اتصال ـ شکافدار، توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی.** cDNAی که کانکسین ۴۳ (Cx43) را کُد می‌کند در سمت انتهای C خود دارای توالی می‌باشد که پپتید کوتاهی با توالی Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys را کد می‌کند. cDNA نوترکیب در سلول‌های Hela بیان گردید، سپس با ReAsH رنگ‌آمیزی شد. ReAsH رنگ فلورسانس قرمز است که به‌طور کوالان تنها به پروتئین‌های دارای توالی ویژه تتراسیستئین (TC) متصل می‌شود. (a) تصویر کانفوکال دو قطعه از غشای پلاسمایی سلول‌های مجاور را نشان می‌دهد که توسط اتصالات شکافدار به یکدیگر متصل شده‌اند. اتصالات شکافدار دارای پروتئین Cx43-TC می‌باشد (خطوط روشن که با فلش‌های سفیدرنگ نشان داده شده است). سپس سلول‌ها با گلوتارآلدهید ۲٪ تثبیت شدند و با رنگ دیامینوبنزیدین تیمار شدند و سرانجام تحت تأثیر روشنایی قوی قرار گرفتند. تحت این شرایط، رنگ ReAsH به کمک تبدیل نوری[1] رسوب متراکمی تشکیل می‌دهد. سپس رسوب حاصله را می‌توان بعد از برش‌گیری توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد. (b) در این میکروگراف الکترونی که از ناحیه‌ای در شکل (a) بعد از تبدیل نوری گرفته شده است، خطوط تاریک (فلش‌های سیاه) اتصالات شکافدار را نشان می‌دهد. (c) در بزرگنمایی بیشتر برش پانل (b)، پروتئین‌های اتصال شکافدار دارای Cx43 را در غشاهای پلاسمایی دو سلول مجاور (رنگ تیره) نشان داده شده است. این تصویر شفافیت قابل ملاحظه روش نشاندار کردن با تتراسیستئین را نشان می‌دهد. میله (a)، ۱۰μm؛ (b) ۱μm؛ (c) ۱۰۰ nm.

تشکیل می‌دهد که به سمت هسته برآمده می‌شود (شکل ۱۳ـ۹). در شکل تغییر یافته این تکنیک، cDNAی کدکننده پروتئین

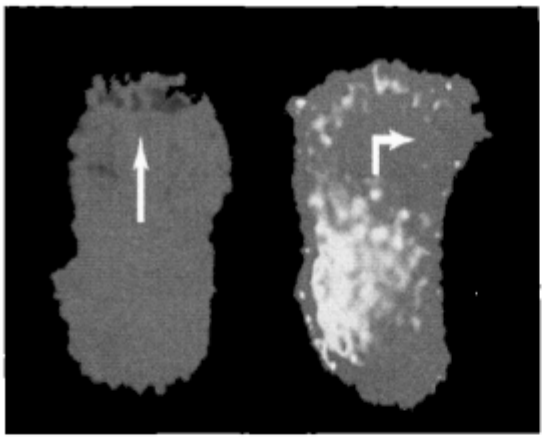
1- Photoconversion

مورد نظر را طوری تغییر می‌دهند که پروتئین حاصله در سمت C ـ ترمینال خود دارای چهار اسیدآمینه سیستئین در یک توالی مشخص داشته باشد (Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys). وقتی که پروتئین نوترکیب در سلول‌های کشت داده شده بیان می‌شود، یک رنگ فلورسانس قرمز (ReAsH)، که از نظر شیمیایی تغییر داده شده است، به محیط کشت اضافه می‌شود؛ این رنگ پیوند کووالان محکمی با چهار سیستئین موجود در توالی تتراسیستئین تشکیل می‌دهد. به دلیل این‌که این توالی در هیچ پروتئین طبیعی یافت نمی‌شود رنگ به پروتئین‌های سلولی متصل نمی‌شود. بعد از این‌که سلول‌ها در بافرها شستشو داده شدند تا رنگ‌های متصل نشده حذف شوند، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس می‌توان پروتئین مورد نظر را در سلول‌های زنده یا تثبیت شده مشاهده کرد. مکان تحت سلولی پروتئین نشاندار همان سلول‌ها را می‌توان با شفافیت بسیار بالا توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد. شکل ۱۴ـ۹ مکان **کانکسین**، (یک پروتئین غشایی که در **اتصالات شکاف‌دار** یافت می‌شود) را با استفاده از این تکنیک نشاندار فلورسانسی نشان می‌دهد. این ساختارهای سطح سلولی باعث انتشار سریع مولکول‌های محلول بین سیتوپلاسم دو سلول مجاور می‌گردد (فصل ۱۹). مثال دیگری از این تکنیک در شکل اول فصل نشان داده شده است. در این مورد، cDNAهایی که βاکتین دارای نشان برچسب تتراسیستئین راکد می‌کنند وارد سلول‌های Hela و سپس سلول‌ها با رنگ ReAsH را رنگ‌آمیزی شدند تا βاکتین نشاندار شود.

تعیین سطح Ca^{2+} و H^+ داخل سلولی به وسیله رنگ‌های فلورسنت حساس به یون. غلظت Ca^{2+} و H^+ سلول‌های زنده را می‌توان به کمک رنگ‌های فلورسنت، یا فلوروکروم‌هایی که فلورسانس آنها بستگی به غلظت این یون‌ها دارد، اندازه‌گیری کرد. همان‌طور که در فصول بعدی بحث شده است غلظت H^+ و Ca^{2+} اثرات مهمی در بسیاری از فرایندهای سلولی دارد. برای مثال، بسیاری از هورمون‌ها و محرک‌ها باعث افزایش Ca^{2+} سیتوزولی نسبت به سطح مبنای آن، $۱۰^{-۷}M$ تا $۱۰^{-۶}M$، می‌شود، این افزایش به نوبه خود باعث پاسخ‌های متعدد سلولی مثل انقباض عضلانی می‌گردد.

رنگ فلورسنت *fura-2*، که به Ca^{2+} حساس است، دارای پنج گروه کربوکسیلی می‌باشد که با اتانول اتصالات استری تشکیل می‌دهند. استر fura-2 لیپوفیل می‌باشد و می‌تواند از محیط کشت به داخل سلول‌ها انتشار یابد. در سیتوزول، استرازها باعث هیدرولیز استر fura-2 می‌گردند. وقتی که fura-2 آزاد شد از آنجایی که گروه‌های کربوکسیلی آن غیرلیپوفیل می‌باشد بنابراین نمی‌تواند از غشاء عبور کند و در نتیجه در سیتوزول می‌ماند. در درون سلول‌ها، هر مولکول fura-2 می‌تواند به یک یون Ca^{2+} متصل شود ولی به کاتیون‌های دیگر سلول متصل نمی‌شود. این اتصال که متناسب با غلظت سیتوزولی Ca^{2+} می‌باشد، فلورسانس fura-2 را در یک طول موج ویژه افزایش می‌دهد. در طول موج دوم، فلورسانس fura-2 برای اتصال Ca^{2+} یا عدم اتصال آن یکسان است و مقدار کلی fura-2 را در یک محدوده سلول نشان می‌دهد. با بررسی پیوسته سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسانس و اندازه‌گیری تغییرات سریع نسبت فلورسانس fura-2 در دو طول موج، می‌توان تغییرات سریع fura-2 دارای یون Ca^{2+} را کمی‌سازی کرد که بنابراین، آن غلظت Ca^{2+} سیتوزولی می‌باشد. (شکل ۱۵ـ۹).

از رنگ‌های فلورسنت (مثل SNARF-1) که به غلظت H^+ حساس می‌باشند می‌توان به‌طور مشابه در تعیین pH سیتوزولی



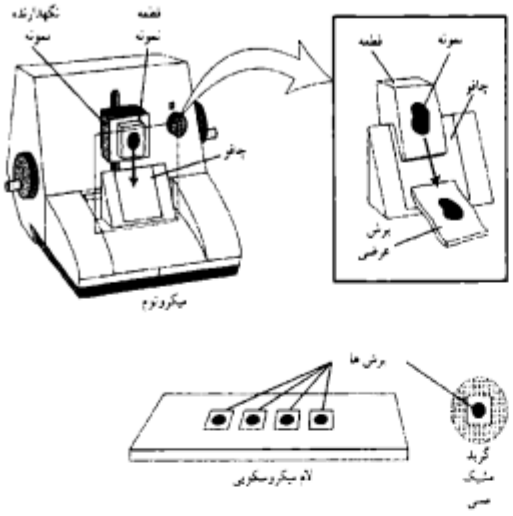
▲ **شکل تجربی ۱۵ـ۹ (شکل رنگی) fura-2، فلورکروم حساس به Ca^{2+} را می‌توان برای تعیین غلظت نسبی Ca^{+2} سیتوزولی در نواحی مختلف سلول‌های زنده مورد استفاده قرار داد.** (چپ) در یک لوکوسیت متحرک وجود شیب Ca^{2+} اثبات شده است. بیشترین میزان آن (رنگ سبز) در عقب سلول، جایی که انقباضات غشایی رخ می‌دهد و کم‌ترین میزان آن (رنگ آبی) در جلو سلول، جایی که آکتین پلیمریزه می‌شود، می‌باشد. (راست) وقتی که پیپتی پر از مولکول‌های کموتاکتیک در کنار سلول قرار می‌گیرد سلول برگشته و غلظت Ca^{2+} سریعاً در سیتوپلاسم افزایش می‌یابد در نتیجه شیب جدیدی به وجود می‌آید. شیب طوری ایجاد می‌شود که ناحیه‌ای با غلظت کم‌تر Ca^{2+} (رنگ آبی) در جهت چرخش سلول قرار گیرد در حالی که ناحیه‌ای با Ca^{2+} بیشتر (رنگ زرد) در مکان‌هایی ایجاد می‌گردد که سرانجام بخش عقبی سلول خواهد بود.

سلول‌های زنده استفاده کرد. پروب‌های مفید دیگری نیز وجود دارند که از فلوروکروم‌هایی تشکیل شده‌اند که به یک باز ضعیف متصل‌اند و در pH خنثی به‌طور جزئی پروتونه می‌شوند و به آسانی می‌توانند از غشاهای سلولی عبور کنند. با وجود این در اندامک‌های اسیدی، این پروب‌ها پروتونه می‌گردند؛ بدلیل اینکه پروب‌های پروتونه نمی‌توانند از غشای اندامک‌ها مجدداً عبور کنند، غلظت آنها در لومن چند برابر غلظت سیتوزولی خواهد بود. همان گونه که در شکل ۳ـ۹ نشان داده شده است، از این نوع رنگ فلورسنت می‌توان در رنگ‌آمیزی ویژه لیزوزوم‌های سلول‌های زنده، استفاده قرار کرد.

تصویربرداری از جزئیات تحت سلولی اغلب به تثبیت، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها نیاز دارد

به‌طور کلی سلول‌ها و بافت‌ها فاقد ترکیباتی هستند که نور را جذب کنند بنابراین تقریباً توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نیستند. اگرچه با استفاده از تکنیک‌های ویژه که بحث شد می‌توان چنین نمونه‌هایی را مشاهده کرد، اما این روش‌ها جزئیات دقیقی از ساختار سلولی را ارائه نمی‌دهند. در مشاهده میکروسکوپی سلول‌های زنده، بایستی سلول‌ها در اتاقک‌های شیشه‌ای[1]، به نام اتاقک‌های کشت[2]، قرار گیرند تا بتوان آنها را در جایگاه میکروسکوپ قرار داد. به همین دلیل سلول‌ها را اغلب تثبیت، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی می‌کنند تا ساختارهای تحت سلولی را مشاهده نمایند.

نمونه‌های میکروسکوپ نوری و الکترونی را اغلب در یک محلول شیمیایی که باعث برقراری اتصالات عرضی در بسیاری از پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد، تثبیت می‌کنند. فرمالدهید یک تثبیت‌کننده رایج است که گروه‌های آمینو مولکول‌های مجاور را به یکدیگر متصل می‌کند؛ این پیوندهای کوالان میانکنش‌های پروتئین ـ پروتئین و پروتئین ـ اسید نوکلئیک را پایدار می‌کند و مولکول‌ها را برای مراحل بعدی کار نامحلول و پایدار می‌کند. بعد از تثبیت‌سازی، نمونه‌ای که قرار است در میکروسکوپ نوری مشاهده گردد را در پارافین قالب‌گیری می‌کنند و آنها را به صورت برش‌های نازک با ضخامت ۰/۵ـ۵۰μm تهیه می‌کنند (شکل ۱۶ـ۹). در نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی، نمونه‌ها در پلاستیک مایع قالب‌گیری می‌شوند و بعد از جامد شدن با ضخامت‌های ۵۰ـ۱۰۰nm برش‌گیری می‌شوند. در یک روش دیگر، می‌توان نمونه‌ها را قبل از تثبیت منجمد کرد و سپس برش‌گیری کرد؛ در چنین روشی فعالیت آنزیم‌ها برای آزمایشات بعدی به وسیله مواد سیتوشیمیایی حفظ می‌گردد. سلول‌هایی که بر روی لامل‌های شیشه‌ای کشت داده

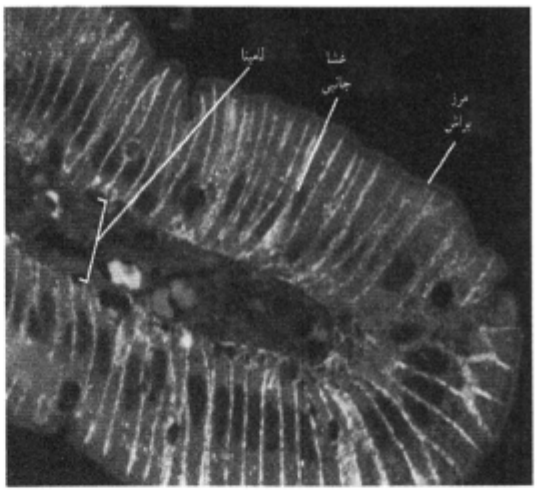


▲ **شکل تجربی ۱۶ـ۹ به منظور مشاهده میکروسکوپی معمولاً بافت‌ها تثبیت شده در یک محیط جامد قالب‌گیری شده و سرانجام از آنها برش‌های نازکی تهیه می‌گردد.** بافت تثبیت شده توسط یک سری محلول‌های الکل ـ آب آبگیری می‌گردد. محلول آخری بایستی با محیط قالب‌گیری سازگار باشد. به منظور قالب‌گیری، در میکروسکوپ نوری بافت در پارافین مایع و در میکروسکوپ الکترونی در پلاستیک مایع قرار داده می‌شود. بعد از این‌که قطعه جامد حاوی نمونه سفت گردید، در میکروتوم قرار می‌گیرد و به وسیله یک چاقو بریده می‌شود. برش‌های میکروسکوپ نوری معمولاً دارای ضخامت ۰/۵ـ۵۰μm می‌باشد. برش‌های میکروسکوپ الکترونی معمولاً دارای ضخامت ۵۰ـ۱۰۰nm می‌باشد. برش‌ها بر روی لام‌های میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری) یا بر روی گریدهای مشبک مسی (میکروسکوپ الکترونی) جمع‌آوری شده و با محلول‌های مناسبی رنگ‌آمیزی می‌گردند.

می‌شود، همان‌طور که بعداً توضیح داده می‌شود، به اندازه کافی نازک هستند بنابراین می‌توان آنها را به صورت In situ تثبیت کرد و بدون برش‌گیری با میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد.

مرحله نهایی در آماده‌سازی نمونه‌های میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی می‌باشد تا بتوان بواسطه آن ویژگی‌های مهم ساختاری سلول یا بافت را مشاهده کرد. رنگ‌های شیمیایی زیادی به مولکول‌هایی که ویژگی‌های خاصی دارند متصل می‌شوند. به عنوان مثال، هماتوزایلن[3] به اسیدهای آمینه بازی (لیزین و آرژینین) انواع متنوعی از پروتئین‌ها متصل می‌شود، در حالی که ائوزین[4] به

1- Glass-faced chamber
2- Glass-faced chamber
3- Hematoxylin 4- Eosin



▲ **شکل تجربی ۱۷ـ۹ (شکل رنگی) با استفاده از میکروسکوپی ایمونوفلورسانس می‌توان یک پروتئین ویژه را در برش‌های بافتی تثبیت شده مکان‌یابی کرد.** برش عرضی دیواره روده رت به وسیله آبی اوانس، که فلورسانس غیرویژه قرمز ایجاد می‌کند، و آنتی‌بادی فلورسانس سبز زرد ویژه GLUT2، پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز، رنگ‌آمیزی شده است. همان‌طور که در این میکروگراف فلورسانس نشان داده شده است، GLUT2 در بخش‌های پایه و جانبی سلول‌های روده یافت می‌شود و در حاشیه مسواکی یافت نمی‌شود. حاشیه مسواکی از میکروویلی‌های به هم فشرده در سطح رأسی سلول‌های روده تشکیل شده است که به سمت لومن روده قرار گرفته‌اند. مویرگ‌ها از لامینا، بافت پیوندی شل در زیر لایه اپی‌تلیال، عبور می‌کنند.

مولکول‌های اسیدی (مثل DNA و گروه‌های جانبی آسپارتات و گلوتامات) متصل می‌شود. چون آنها دارای ویژگی‌های اتصالی متفاوتی هستند، انواع سلول‌ها را به صورت متفاوت رنگ‌آمیزی می‌کنند به طوری که آنها را می‌توان از یکدیگر تشخیص و شناسایی کرد. اگر آنزیمی طی واکنشی پیش‌ساز غیررنگی را به رسوب رنگی یا قابل مشاهده کاتالیز کند، می‌توان آن آنزیم را به وسیله محصول رنگی واکنش خود در مقاطع سلولی شناسایی کرد. چنین تکنیک‌های رنگ‌آمیزی، اگرچه کاملاً رایج‌اند، اما به‌طور وسیعی توسط سایر تکنیک‌های مشاهده پروتئین‌های ویژه که در بعد بحث شده است جایگزین گردیده‌اند.

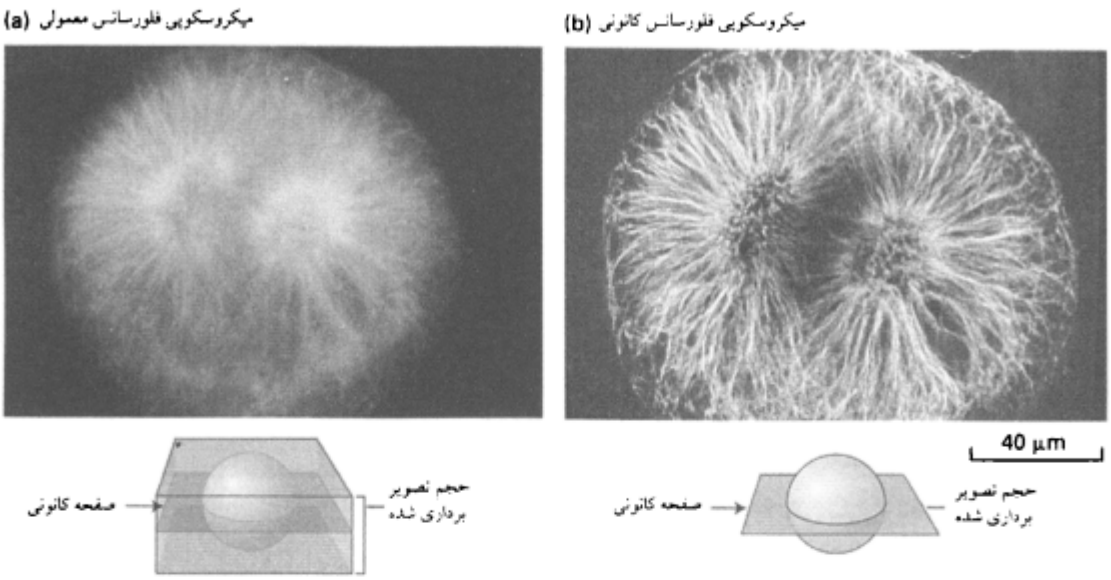
با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس می‌توان پروتئین‌های ویژه را در سلول‌های تثبیت شده شناسایی کرد

رنگ‌های شیمیایی که اشاره شد تنها اسیدهای نوکلئیک یا گروه وسیعی از پروتئین‌ها را رنگ‌آمیزی می‌کنند، اما محققان اغلب می‌خواهند که حضور یا مکان پروتئین‌های ویژه را شناسایی کنند. به همین منظور غالباً از آنتی‌بادی‌های ویژه استفاده می‌گردد که به وسیله فلورسانس شناسایی می‌شوند. در یکی از این تکنولوژی‌ها آنتی‌بادی ـ عموماً مونوکلونال ـ به‌طور کوالان به یک فلوروکروم متصل می‌شود. فلوروکروم‌های رایج شامل رادامین و قرمز تگزاس، که نور قرمز نشر می‌کنند؛ Cy3، که نور نارنجی نشر می‌کند؛ و فلورسین که نور سبز نشر می‌کند، می‌باشند. این فلوروکروم‌ها را می‌توان به‌طور شیمیایی به آنتی‌بادی‌های تخلیص شده که تقریباً برای هر ماکرومولکول مورد نظر ویژه می‌باشد، متصل کرد. زمانی که کمپلکس فلوروکروم ـ آنتی‌بادی به برش سلول یا بافت نفوذپذیر شده اضافه گردید، کمپلکس به آنتی‌ژن‌های مورد نظر متصل خواهد شد. سپس با اعمال امواج تهییج کننده نور از خود ساطع خواهند کرد، این تکنیک **میکروسکوپی ایمونوفلورسانس**[1] نامیده می‌شود (شکل ۱۷ـ۹). به کمک رنگ‌آمیزی نمونه با چند رنگ متفاوت که در طول موج‌های متفاوت فلورسانس می‌کند می‌توان چندین پروتئین به علاوه DNA را در یک سلول مورد شناسایی قرار داد (شکل اول فصل را ملاحظه کنید).

در یکی از تکنیک‌های ایمونوفلورسانس، یک آنتی‌بادی مونوکلونال یا پلی‌کلونال به برش بافت تثبیت شده اضافه می‌کنند، سپس یک آنتی‌بادی ثانویه نشاندار با فلورکروم اضافه می‌کنند که به بخش (Fc) آنتی‌بادی اولی متصل می‌شود. برای مثال، یک آنتی‌بادی «ثانویه» (که «آنتی خرگوش بزی[2]» نامیده می‌شود) زمانی که به یک فلورکروم متصل شد تمام آنتی‌بادی‌های خرگوشی استفاده شده در رنگ‌آمیزی بافت یا سلول را شناسایی خواهد کرد. آنتی خرگوش بزی با تزریق بخش Fc به بز، که در تمام آنتی‌بادی‌های IgG خرگوشی مشترک است، تهیه می‌گردد؛ به دلیل این‌که چندین آنتی‌بادی خرگوشی بزی به یک مولکول آنتی‌بادی خرگوش در یک برش متصل می‌شوند، فلورسانس حاصله اغلب شدیدتر از زمانی است که یک آنتی‌بادی ویژه یک پروتئین به‌طور مستقیم به یک فلورکروم متصل گردد.

در شکل دیگری از این تکنولوژی، به سلول‌ها cDNA کدکننده پروتئین نوترکیب که در انتهای خود دارای توالی اسید آمینه‌ای خاص به نام **برچسب اپی‌توپ**[3] می‌باشد وارد می‌کنند. دو

1- Immunofluorescence microscopy
2- Goat anti-rabbit
3- Epitope tag



▲ **شکل تجربی ۱۸ـ۹ به کمک میکروسکوپی کانونی می‌توان از سلولهای ضخیم مقاطع نوری شفاف به دست آورد.** تخم لقاح‌یافته میتوزی خارپوست دریایی *(Psammechinus)* توسط دترجنت لیز گردید و سپس در معرض آنتی‌بادی آنتی‌توبولین قرار گرفت، و در نهایت در معرض آنتی‌بادی نشاندار با فلورسین که به آنتی‌بادی آنتی‌توبولین متصل می‌شود، قرار گرفت. (a) وقتی که توسط میکروسکوپ فلورسانس معمولی رویت شد دوک میتوزی بصورت کدر دیده می‌شود. همانطور که در طرح شماتیکی دیده می‌شود دلیل این کدورت فلورسانس زمینه می‌باشد که در بالا و پایین صفحه کانونی قابل شناسایی است. (b) تصویر میکروسکوپ کانونی مخصوصاً در مرکز دوک میتوزی بسیار شفاف است. در این تصویر، فلورسانس تنها از مولکولهای موجود در صفحه کانونی تشخیص داده می‌شود و یک مقطع نوری بسیار نازک ایجاد می‌شود.

برچسب اپی‌توپی که به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد FLAG، که توالی اسیدآمینه‌ای DYKDDDDK (کد تک حرفی اسیدهای آمینه) و myc که توالی EQKLISEEDL را کد می‌کند، می‌باشند. سپس به منظور شناسایی پروتئین نوترکیب در سلول از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال آنتی‌اپی‌توپ که به صورت تجاری موجود هستند استفاده کرد.

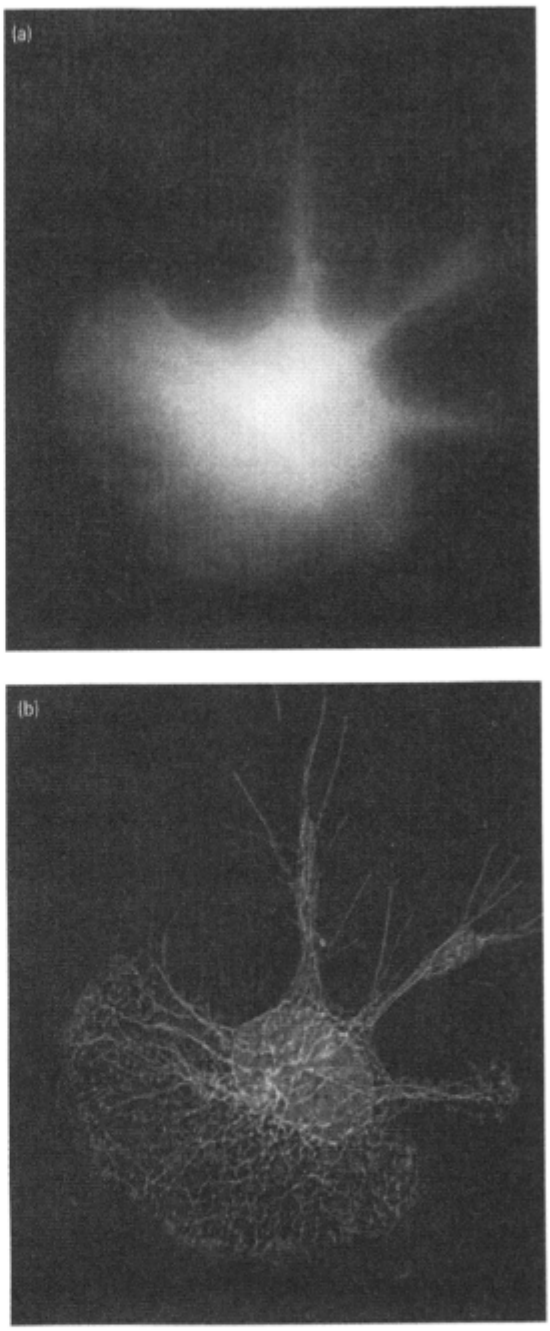
به کمک انواع میکروسکوپ‌های فلورسانس جدید، مثل STED[1] (تخلیه نشر تحریک شده)، می‌توان دو شیئی فلورسنت که به اندازه ۲۰nm≃ نزدیک هم باشد تفکیک کرد، این مقدار بسیار پایین‌تر از حد تفکیک میکروسکوپ نوری معمولی می‌باشد. برای مثال، سلول‌های عصبی دارای یک دسته وزیکول نزدیک غشاء، بنام وزیکول‌های سیناپتیک می‌باشند، که بسیار کوچک‌تر (قطر ۴۰nm≃) و بسیار متراکم‌تر از آن هستند که بتوان آنها را به وسیله میکروسکوپ‌های فلورسانس مشاهده کرد. علی‌رغم این به کمک STED می‌توان وزیکول‌ها را در سلول‌های عصبی مشاهده کرد. هم‌چنین این تکنیک محققان را قادر می‌سازد که پروتئین‌های فلورسنت واحد را در غشاهای اندامک‌های تخلیص شده مورد مطالعه و شناسایی قرار دارد.

به کمک میکروسکوپی کانونی و دکانولوشن[2] می‌توان اشیا سه‌بعدی را مشاهده کرد

میکروسکوپی فلورسانس رایج دارای دو محدودیت مهم می‌باشد. نخست، نور فلورسنت منتشر شده از نمونه ناشی از مولکول‌های پایین و بالای صفحه می‌باشد؛ بنابراین یک تصویر کدر و مبهمی بوجود می‌آید که توسط تصاویر فلورسانسی حاصله از مولکول‌های موجود در عمق‌های مختلف سلول ناشی می‌گردد. **اثر کدورت**[3] باعث می‌شود که تعیین آرایش مولکولی واقعی مشکل باشد (شکل a ۱۸ـ۹). ثانیاً، برای مشاهده نمونه‌های ضخیم بایستی برش‌های عرضی پی در پی (متوالی) تهیه، عکسبرداری و ساختار آن توسط بازسازی تصاویر حاصله، تعیین گردد. از این دو روش می‌توان به منظور جلوگیری از تهیه مقاطع عرضی متوالی و کسب اطلاعات سه‌بعدی با کیفیت بالا استفاده کرد.

روشی بنام، میکروسکوپی کانونی از نظر وجود چاهکی[4] در جلو دتکتور با میکروسکوپی فلورسانس معمولی متفاوت است. این

1- Stimulated emission depletion
2- Deconvolution
3- Blurring effect
4- Pinhole



▲ **شکل تجربی ۱۹ـ۹ (شکل رنگی) میکروسکوپ فلورسانس دکانوولوشن باعث ایجاد برش‌های نوری با کیفیت بالا می‌گردد که می‌توان بوسیله آنها یک تصویر سه‌بعدی بازسازی گردد.** سلول ماکروفاژی توسط مواد نشاندار با فلوروکروم ویژه DNA (آبی)، میکروتوبول‌ها (سبز)، و فیلامنت‌های آکتین (قرمز) رنگ‌آمیزی شده است. مجموعه تصاویر فلورسنتی که در صفحات کانونی پی در پی (برش‌های نوری) از سلول گرفته شد به صورت سه‌بعدی ترکیب گردید. (a) در بازسازی سه‌بعدی تصاویر خام، DNA، میکرتوبول‌ها و اکتین به صورت نواحی پخش شده در سلول مشاهده می‌شود. (b) بعد از اعمال الگوریتم دکانوولوشن روی تصاویر، سازمان‌یابی رشته‌ای میکروتوبول‌ها و مکان اکتین به آسانی در تصویر بازسازی شده قابل مشاهده و مرئی گردید.

چاهک، نوری که منشأ آن صفحه کانونی نیست را متوقف می‌کند. تصاویر حاصله عاری از کدورت ناشی از ساختارهای بالا و پایین صفحه کانونی می‌باشد (شکل b ۱۸ـ۹). در اغلب میکروسکوپ‌های کانونی از لیزر به عنوان منبع روشنایی استفاده می‌شود؛ لیزرها یک طول موج مشخصی را فراهم می‌کنند و به دلیل انرژی متمرکزشان اغلب از نمونه‌های ضخیم عبور می‌کنند. اگرچه لیزر به یک نقطه واحدی از نمونه متمرکز می‌گردد، ولی بایستی عرض و پایین نمونه را اسکن کند تا یک تصویر ساخته شود. شدت نور حاصله از این نواحی تحت تابش توسط یک لوله تقویت‌کننده ثبت می‌شود و تصویر در کامپیوتر ذخیره می‌گردد. فرایند اسکن اغلب چند دقیقه طول می‌کشد در نتیجه برای تصویربرداری از فرایندهای زیستی سریع در نمونه‌های زنده خیلی مناسب نیستند. یک نوع میکروسکوپ کانونی اسکن‌کننده با لیزر که جدیداً انقلاب کرده است میکروسکوپ کانونی نیپکو[1] می‌باشد. در این روش از یک دیسک چرخان دارای چاهک استفاده می‌شود که لیزر را به صدها پرتو تجزیه می‌کند و سرعت تصویر جمع‌آوری شده را به اندازه ۱۰ برابر یا بیشتر افزایش می‌دهد.

با استفاده از دکانولوشن، که یک فرایند ریاضیاتی پیچیده‌ای می‌باشد، می‌توان تصاویری با کیفیت بالا به دست آورد. در این فرایند اشیاء تیره و تار به صورت شفاف در می‌آیند. الگوریتم‌های مشابهی توسط ستاره‌شناسان استفاده می‌شود تا تصاویر ستارگان دور را شفاف سازند. در میکروسکوپی دکانولوشن مجموعه‌ای از تصاویر یک شیئی با یک میکروسکوپ فلورسانس معمولی یا میکروسکوپ کانونی در صفحات کانونی متفاوت گرفته می‌شود. مجموعه جداگانه‌ای از تصاویر از یک لام آزمایشی دارای دانه‌های ریز فلورسنت (با قطر ۰/۲μm) گرفته می‌شود. قطر این دانه‌ها کوچکتر از حد تفکیک میکروسکوپ می‌باشد. هر دانه نشان‌دهنده یک نقطه کوچک نور می‌باشد که به دلیل سیستم نورانی ناقص میکروسکوپ به صورت جسم کدر درمی‌آید؛ به کمک این تصاویر تابع توزیع نقطه‌ای[2] مشخص می‌گردد که به محقق کمک می‌کند تا توزیع منبع نقطه فلورسانت راکه باعث «کدورت» تصاویر شیئی می‌گردد، محاسبه کند. به عبارت دیگر، نوری که باعث ایجاد تصویر کدر از صفحات کانونی مجاور می‌گردد از طریق مقایسه مکرر با تابع توزیع نقطه‌ای، به صفحه کانونی صحیح جهت‌دهی می‌شود. همانگونه که در شکل ۱۹ـ۹ آورده شده است در تصاویر بازیابی شده توسط دکانوولوشن بدون هیچ‌گونه کدورتی جزئیات شگفت‌انگیزی را می‌توان مشاهده کرد.

1- Nipkow 2- Point Spread function

علم گرافیک و انفورماتیک میکروسکوپی مدرن را متحول کرده است

در دهه گذشته، به‌طور وسیعی دوربین‌های دیجیتالی در ثبت تصاویر میکروسکوپی جایگزین دوربین‌های نوری گردیده است. تصاویر دیجیتالی را می‌توان در کامپیوتر ذخیره و نگهداری کرد و توسط نرم‌افزارهای فتوگرافی رایج و الگوریتم‌های ویژه آنها را دستکاری کرد. همان‌گونه که در بالا اشاره شد، با استفاده از الگوریتم‌های دکانوولوشن می‌توان یک تصویر را با متمرکز کردن فوتون‌های خارج از مرکز به محل اصلی آنها شفاف‌تر ساخت. به کمک سایر الگوریتم‌های کامپیوتری، که به تجهیزات فوق محاسباتی نیاز دارند، می‌توان ساختارهای سه‌بعدی دقیق بازسازی شده در کامپیوترهای میزی را مشاهده کرد (شکل ۱۹ـ۹ را ملاحظه کنید). به کمک انفورماتیک که در برگیرنده الگوریتم‌های آنالیز تصویر و روش‌های آماری می‌باشد می‌توان کمّیت اشکال، حرکات و شدت سیگنال اشیایی مثل سلول‌ها یا بافت‌ها را تعیین کرد.

نکات کلیدی بخش ۹.۲

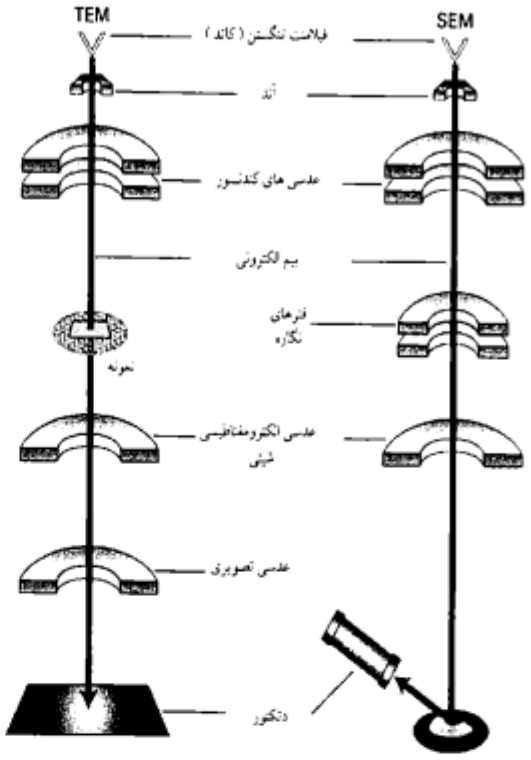
میکروسکوپ نوری، مشاهده ساختار سلولی و مکان‌یابی پروتئین‌های سلول‌ها

- حد تفکیک یک میکروسکوپ نوری تقریباً ۲۰۰nm می‌باشد.
- به دلیل آن که سلول‌ها و بافت‌ها تقریباً شفاف هستند، به منظور ایجاد کنتراست کافی برای تصویربرداری، انواع متنوعی از تکنیک‌های رنگ‌آمیزی و نوری مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- از میکروسکوپ اختلاف فاز و تداخلی افتراقی (DIC) برای مشاهده جزئیات سلول‌های زنده و رنگ‌آمیزی نشده و نشان دادن حرکت سلولی استفاده می‌شود (شکل ۱۱ـ۹ را ملاحظه کنید).
- وقتی که پروتئین‌ها با یک پروتئین فلورسانس سبز طبیعی (GFP) نشاندار می‌شوند یا مشابه آن در سلول بیان می‌شود، می‌توان به کمک میکروسکوپ فلورسانس آنها را مشاهده کرد. (شکل ۱۲ـ۹ را ملاحظه کنید).
- با استفاده از رنگ‌هایی که نسبت فلورسانس آنها متناسب با غلظت یون‌های Ca^{2+} یا H^{+} می‌باشد، می‌توان به کمک میکروسکوپ فلورسانس غلظت موضعی یون‌های Ca^{2+} و pH داخل سلولی را در سلول‌های زنده اندازه‌گیری کرد.
- در میکروسکوپی ایمونوفلورسانس، پروتئین‌ها و اندامک‌های ویژه در سلول‌های تثبیت شده به وسیله آنتی‌بادی مونوکلونال نشاندار با فلوروکروم رنگ‌آمیزی می‌شوند. چندین پروتئین را می‌توان در یک نمونه به وسیله رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های نشاندار با فلورکروم‌های مختلف مکان‌یابی کرد (شکل اول فصل را ملاحظه کنید).
- در میکروسکوپی کانونی و دکانوولوشن از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود تا از نظر نوری از یک نمونه برش تهیه شود، بنابراین کدورت ناشی از نور فلورسانس خارج از مرکز شفافیت را کاهش یابد (اشکال ۱۸ـ۹ و ۱۹ـ۹ را ملاحظه کنید). در هر دو روش تصاویری شفاف‌تر از میکروسکوپ فلورسانس استاندارد یا میکروسکوپ نوری مخصوصاً در مورد نمونه‌های ضخیم بدست می‌آید.
- پیشرفت‌های موجود در محاسبات و گرافیک باعث گردیده است که بتوان بررسی‌های بیشتری روی تصاویر میکروسکوپی انجام داد.

۹ـ۳ میکروسکوپ الکترونی: روش‌ها و کاربردها

توسط میکروسکوپ الکترونی می‌توان نسبت به میکروسکوپ نوری تصاویری با شفافیت بالاتر از فراساختارهای سلولی تهیه کرد. علی‌رغم این، از آن جایی که در این تکنولوژی ضروری است که سلول‌ها تثبیت و برش‌گیری گردند بنابراین از سلول‌های زنده نمی‌توان تصویربرداری نمود. محققان این شرایط را ارزیابی می‌کنند و از میان انواع روش‌ها، روش‌هایی را انتخاب می‌کنند که تصاویر حاصله به سؤالات آنها پاسخ دهد. برای مثال، ایمونوالکترون میکروسکوپی[1] را می‌توان در تعیین جایگاه پروتئین‌های ویژه سلولی با شفافیت بالا استفاده نمود. دو پروتئین را، نه بیشتر، می‌توان به‌طور همزمان توسط روش‌هایی که از نظر تکنیکی هنوز بحث‌انگیز می‌باشد مورد شناسایی قرار داد. در مقایسه با آن، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس می‌توان چهار یا تعداد بیشتری پروتئین را همزمان شناسایی کرد (شکل اول فصل را ملاحظه کنید) اما شفافیت آن پایین می‌باشد. برخی از ذرات تخلیص شده مثل ویروس و ریبوزوم‌ها را می‌توان بدون تثبیت یا رنگ‌آمیزی اولیه مشاهده کرد اما نمونه بایستی در نیتروژن مایع منجمد شده باشد و در زمان مشاهده میکروسکوپی در شرایط انجمادی حفظ شود.

1- Immunoelectorn microscopy



▲ **شکل تجربی ۲۰ـ۹ در میکروسکوپ الکترونی، تصاویر از الکترون‌هایی که از نمونه می‌گذرند و یا از نمونه‌های پوشیده شده با فلز پراکنش می‌یابند، تشکیل می‌گردند.** در میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) الکترون‌ها با گرم شدن فیلامنت خارج شده و به وسیله میدان مغناطیسی شتاب داده می‌شوند و در نهایت به وسیله یک عدسی مغناطیسی کندانسور بر روی نمونه متمرکز می‌شوند. الکترون‌هایی که از نمونه می‌گذرند توسط یک سری عدسی‌های مغناطیسی شیئی و تصویری متمرکز می‌شوند تا بر روی دتکتور تصویری بزرگ شده تشکیل شود. دتکتور ممکن است یک پرده فلورسنت، فیلم عکاسی، یا یک دوربین جفت شده به بار[1] (CCD) باشد. در میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، الکترون‌ها توسط عدسی‌های کندانسور و شیئی بر روی نمونه پوشیده شده با فلز متمرکز می‌شوند. فنرهای نگاره[2] بیم را از میان نمونه عبور می‌دهند و الکترون‌هایی که از فلز پخش شده‌اند توسط یک دتکتور لوله تقویت‌کننده جمع‌آوری می‌شوند. در هر دو نوع میکروسکوپ، به دلیل این‌که الکترون‌ها به آسانی توسط مولکول‌های هوا پراکنده می‌شوند، سراسر ستون تحت شرایط بسیار بالای خلاء حفظ می‌گردد.

تفکیک میکروسکوپ الکترونی گذاره خیلی بیشتر از میکروسکوپ نوری می‌باشد

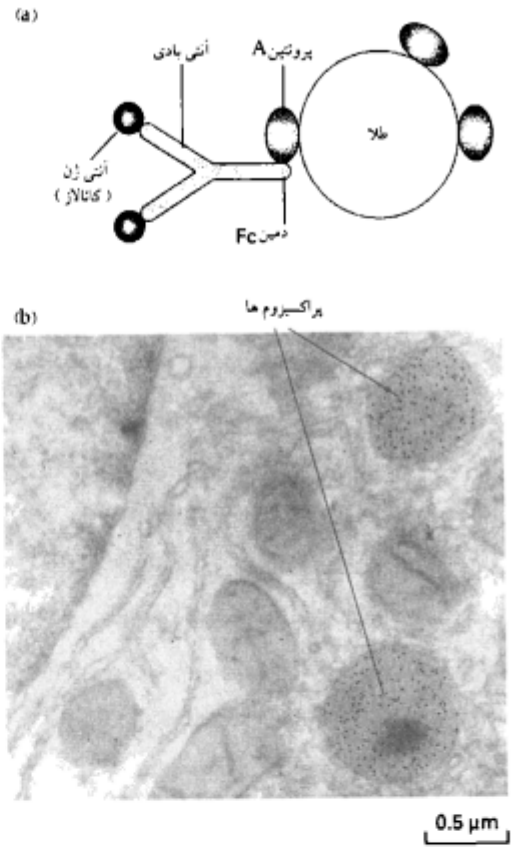
اصول پایه‌ای میکروسکوپ الکترونی مشابه میکروسکوپ نوری می‌باشد؛ تفاوت اصلی در عدسی‌های الکترومغناطیسی می‌باشد که به جای نور مرئی بیم الکترونی با سرعت بالا را متمرکز می‌کند. در میکروسکوپ الکترونی گذاره *(TEM)*، الکترون‌ها از یک فیلامنت نشر می‌یابند و در یک میدان الکتریکی شتاب می‌گیرند. عدسی کندانسور بیم الکترونی را به نمونه متمرکز می‌کند؛ عدسی‌های شیئی و تصویری الکترون‌های عبوری از نمونه را متمرکز می‌کنند و آنها را به پرده نمایش یا دتکتورهای دیگر می‌تاباند (شکل ۲۰ـ۹، چپ). به دلیل این‌که اتم‌های موجود در هوا الکترون‌ها را جذب می‌کنند، سراسر لوله، از منبع الکترونی تا دتکتور، تحت شرایطی با خلاء بسیار بالا حفظ می‌گردد.

حد تفکیک میکروسکوپ الکترونی گذاره بدلیل طول موج کوتاه الکترون‌ها از نظر تئوری ۰/۰۰۰۵nm (کم‌تر از قطر یک اتم)، یا ۴۰/۰۰۰ برابر بیشتر از تفکیک میکروسکوپ نوری، و دو میلیون برابر بیشتر از چشم غیرمسلح می‌باشد. با وجود این، تفکیک مؤثر میکروسکوپ الکترونی گذاره در مطالعه سیستم‌های زیستی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از این حد ایده‌ال می‌باشد. تحت شرایط بهینه، می‌توان تفکیک میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره را تا حد ۰/۱nm بهبود بخشید که تقریباً ۲۰۰۰ برابر بیشتر از حداکثر تفکیک میکروسکوپ‌های نوری می‌باشد. در بخش ۱ـ۹ چندین مثال از ساختارهای سلولی و زیر سلولی که توسط TEM تصویربرداری شده، آورده شده است.

به دلیل آن که هنگام کار با TEM نیاز به برشهای بسیار نازک و تثبیت شده (تقریباً ۵۰nm) می‌باشد، تنها بخش کوچکی از سلول را در هر برش می‌توان مشاهده کرد. روش برش‌گیری نمونه مشابه روش تهیه نمونه در میکروسکوپ نوری می‌باشد و با استفاده از یک چاقویی صورت می‌گیرد که توانایی تولید برش‌هایی به ضخامت ۵۰ـ۱۰۰nm را دارد (شکل ۱۶ـ۹ را ملاحظه کنید). ایجاد تصویر بستگی به پراکندگی متفاوت الکترون‌ها توسط مولکول‌های موجود در نمونه دارد. بدون رنگ‌آمیزی، بیم الکترون‌ها از نمونه به‌طور یکسان عبور می‌کنند، و بنابراین تمامی نمونه به‌طور یکسان روشن به نظر می‌رسد و تنها اختلاف کمی در اجزای آن وجود دارد. به منظور تهیه تصاویر خوب از TEM، نمونه‌ها را عموماً در هنگام مرحله تثبیت یا بعد از تثبیت به وسیله فلزات سنگین مثل سرب و اورانیوم رنگ‌آمیزی می‌کنند. به دلیل آن که فلزات بیشتر الکترون‌های ورودی را پراکنده (انکسار) می‌کنند نواحی رنگ‌آمیزی شده با فلز تاریک به نظر می‌رسد؛ الکترون‌های پراکنده شده توسط عدسی‌های

1- Charged-couple-device camera

2- Scanning coil



▲ شکل تجربی ۲۱ـ۹ ذرات طلای پوشیده شده با پروتئین A در تشخیص یک پروتئین متصل به آنتی‌بادی در میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد استفاده قرار می‌گیرند. (a) ابتدا به آنتی‌بادی‌ها اجازه داده می‌شود تا با آنتی‌ژن‌های ویژه خودشان (برای مثال کاتالاز) در برش نمونه بافت تثبیت شده وارد میانکنش شود. سپس برش نمونه با ذرات طلای پوشیده شده با پروتئین A باکتری S. aureus تیمار می‌گردد. اتصال پروتئین A متصل شده به ذرات طلا به دُمین Fc مولکول‌های آنتی‌بادی باعث مشاهده جایگاه پروتئین هدف، در این مورد کاتالاز، در میکروسکوپ الکترونی می‌گردد. (b) بخشی از بافت کبدی توسط گلوتارآلدهید تثبیت و برش‌گیری شده و سپس مطابق آنچه که در بخش (a) توضیح داده شد، تیمار گردید تا مکان کاتالاز تعیین شود. ذرات طلا (نقاط سیاه) که نشان‌دهنده حضور کاتالاز می‌باشد به‌طور اختصاصی در پراکسیزوم‌ها موجود می‌باشند.

الکترومغناطیسی متمرکز نمی‌شوند و در تشکیل تصویر مشارکت نمی‌کنند. نواحی که رنگ کم‌تری گرفته‌اند روشن‌تر به نظر می‌رسد. تتروکسیداسمیوم به‌طور ترجیحی بخش‌های مشخصی از سلول مثل غشای پلاسمایی را رنگ می‌کند (شکل ۶ـ۱۰ را ملاحظه کنید).

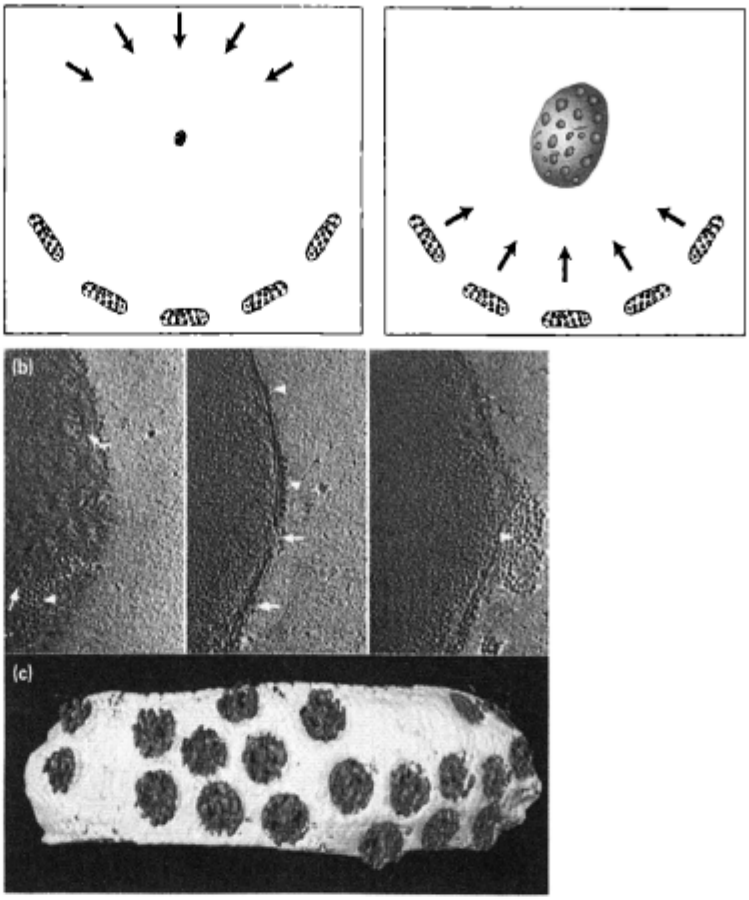
پروتئین‌های ویژه‌ای را می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی‌های ویژه در برش‌های نازک مورد شناسایی قرار داد. در این روش سلول‌ها نسبتاً تثبیت می‌شوند (تا از دناتوره شدن اپی‌توپ‌ها ممانعت شود)، سپس در دمای نیتروژن مایع منجمد می‌شوند و بعد از آن برش‌گیری می‌شوند. بعد از گرم کردن[1]، به نمونه برش‌گیری شده آنتی‌بادی اضافه می‌گردد، سپس با ذرات طلای متراکم با الکترون که به وسیله پروتئین A پوشیده شده است، تیمار می‌گردد. پروتئین A یک پروتئین باکتریایی است که به بخش Fc تمام آنتی‌بادی‌ها متصل می‌گردد (شکل ۲۱ـ۹). به دلیل آن‌که ذرات طلا الکترون‌های ورودی را انکسار می‌دهد، به صورت نقطه‌های تاریکی دیده می‌شوند.

توسط میکروسکوپ الکترونی کرایو می‌توان ذرات را بدون تثبیت و رنگ‌آمیزی مشاهده کرد

از میکروسکوپ الکترونی گذاره معمولی نمی‌توان برای مطالعه سلول‌های زنده استفاده کرد زیرا سلول‌های زنده نسبت به شرایط و تکنیک‌های آماده‌سازی آسیب‌پذیر هستند. بعلاوه به دلیل عدم حضور آب، ماکرومولکول‌ها دناتوره و غیرفعال می‌شوند. با وجود این نمونه‌های زیستی تثبیت نشده و رنگ‌آمیزی نشده را می‌توان مستقیماً توسط میکروسکوپی الکترونی گذاره مشاهده کرد ولی نمونه‌ها باید در شرایط منجمد باشند. در تکنیک میکروسکوپی الکترونی کرایو[2]، یک محلول سوسپانسیونی از نمونه به صورت خیلی نازک بر روی گرید قرار داده شده، سپس در نیتروژن مایع منجمد می‌شود و توسط یک سری روش‌های مخصوص تحت این شرایط نگهداری می‌شود. سپس نمونه منجمد شده توسط میکروسکوپ الکترونی مطالعه می‌شود. دمای بسیار پایین (۱۹۶°C-) از تبخیر آب حتی در شرایط خلاء جلوگیری می‌کند. بنابراین نمونه را می‌توان در شرایط طبیعی و آبدار خودش بدون تثبیت کردن یا رنگ‌آمیزی با فلز سنگین، مشاهده کرد. بعضی از سلول‌ها یا برخی از ویروس‌ها وقتی تحت این شرایط قرار بگیرند کشته خواهند شد. با میانگین‌گیری‌های کامپیوتری از صدها تصویر، یک مدل سه‌بُعدی در حد اتمی می‌توان به دست آورد. برای مثال با استفاده از این روش مدل‌هایی از ریبوزوم (شکل ۲۶ـ۴ را ملاحظه کنید)، پمپ کلسیم عضله که در فصل ۱۱ بحث گردیده است و سایر پروتئین‌های بزرگ‌تر که کریستالیزاسیون آنها مشکل است را می‌توان به دست آورد.

1- Thawing

2- Cryoelectron microscopy



◀ شکل تجربی ۲۲ـ۹ (شکل رنگی) ساختار کمپلکس منفذ هسته‌ای (NPC) توسط توموگرافی کرایوالکترون. (a) در توموگرافی الکترونی مجموعه نیم دایره‌ای تصاویر دوبعدی از نمونه سه‌بعدی که در مرکز قرار گرفته است، ثبت می‌گردد. وقتی که چشم الکترونی و دتکتور ثابت می‌ماند نمونه کج می‌شود. با استفاده از تک‌تک تصاویر دوبعدی که از الکترون‌های وارده به شی به دست می‌آید (فلش‌های پانل چپ) می‌توان ساختار سه‌بُعدی را محاسبه کرد. این تصاویر در ایجاد یک تصویر سه‌بُعدی از شیئی مورد استفاده قرار می‌گیرد (فلش‌ها، پانل راست). (b) هسته‌های استخراج شده از قارچ لجنی دیکتیوستلیوم دیسکوئیدومی[1] سریعاً در نیتروژن مایع منجمد شدند و تحت این شرایط توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده شده‌اند. در پانل سه تصویر دارای انحرافدار پی در پی نشان داده شده است. آرایش‌های متفاوت NPCها (فلش) از بالا (چپ و وسط) و حاشیه (راست) نشان داده شده‌اند. ریبوزوم‌های متصل به غشاء بیرونی هسته به صورت بخش‌های از ER خشن قابل مشاهده هستند (نوک فلش‌ها) (c) نمایش کامپیوتری سطح غشاء پاکت هسته‌ای (زرد) که توسط NPCها (آبی) تزیین شده است.

بسیاری از ویروس‌ها دارای پوشش یا کپسید می‌باشند که از نسخه‌های متعدد یک یا چند پروتئین تشکیل شده‌اند و به طور متقارن آرایش یافته‌اند. در میکروسکوپ الکترونی کرایو تصاویر این ذرات را می‌توان از چندین زاویه مشاهده کرد. با استفاده از آنالیز کامپیوتری تصاویر متعدد می‌توان به دلیل ویژگی متقارن ذرات، ساختار سه‌بعدی کپسید را تا حد تفکیک ۵۰nm محاسبه نمود. مثال‌هایی از این تصاویر در شکل ۴۴ـ۴ آورده شده است.

یک روش پیشرفته این تکنیک، کرایوالکترون توموگرافی می‌باشد که به محققان اجازه می‌دهد ساختارهای سه‌بعدی اندامک‌ها یا حتی تمام سلول قالب‌گیری شده در یخ را که شرایط آن نزدیک به شرایط زنده است، تعیین کنند. در این روش، نگهدارنده نمونه به‌طور خیلی جزئی در حول محور قائم به بیم الکترونی، کج شده است؛ بنابراین تصاویر نمونه را از جهات مختلف می‌توان مشاهده کرد (شکل ۲۲ـ۹ a,b). سپس تصاویر توسط کامپیوتر به صورت سه‌بُعدی بازسازی می‌شود که به توموگرام[2] معروف است (شکل ۲۲ـ۹ c را ملاحظه کنید). یک عیب توموگرافی کرایوالکترونی این است که نمونه‌ها بایستی نسبتاً نازک و در حدود ۲۰۰nm باشند؛ این ضخامت بسیار نازک‌تر از نمونه‌هایی (۲۰۰μm) است که توسط میکروسکوپ نوری کانونی مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

با مطالعه میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های پوشیده شده با فلز می‌توان ویژگی‌های سطحی سلول‌ها و اجزای آنها را مشخص کرد

به کمک TEM با استفاده از سایه‌دهی فلزی[3] می‌توان اطلاعاتی درباره شکل ویروس‌ها، فیبرها، آنزیم‌ها و سایر ذرات تحت

1- Dictyostelium discoideum

2- Tomogram

3- Metal shadowing

سلولی به دست آورد. در این روش آماده[1] یک لایه نازکی از فلز، مثل پلاتینوم، بر روی نمونه زیستی تثبیت شده یا منجمد شده بخاردهی می‌شود (شکل a ۲۳ـ۹). تیمار نمونه با اسید و ماده سفیدکننده باعث حل شدن سلول می‌گردد و یک رپلیکایی از فلز بر جای می‌گذارد که توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره قابل مشاهده است (شکل b ۲۳ـ۹).

به‌طور جایگزین، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) به محققان اجازه می‌دهد که سطوح نمونه‌های برش نیافته پوشیده شده با فلزات را مشاهده کنند. یک بیم الکترونی قوی در داخل میکروسکوپ سریعاً نمونه را اسکن می‌کند. مولکول‌های موجود در لایه پوشاننده تهییج می‌گردد و باعث آزاد شدن الکترون‌های ثانویه می‌گردد که در دتکتورسینتیلاسیون جمع می‌گردد؛ سیگنال حاصله بر روی یک لوله اشعه کاتدی که مشابه تلویزیون‌های معمولی می‌باشد نمایش داده می‌شود (شکل ۲۰ـ۹ سمت راست را ملاحظه کنید). به دلیل اینکه تعداد الکترون‌های ثانویه تولید شده در هر نقطه از نمونه به زاویه بیم الکترونی نسبت به سطح دارد میکروگراف الکترونی نگاره نهایی ظاهری سه‌بُعدی بستگی دارد (شکل ۲۵ـ۹) قدرت تفکیک میکروسکوپ‌های الکترونی که توسط ضخامت پوشش فلز محدود شده است، تنها تقریباً ۱۰nm است، که در مقایسه با ابزارهای گذاره بسیار کمتر است.

نکات کلیدی بخش ۹.۳

میکروسکوپ الکترونی: روش‌ها و کاربردها

- نمونه‌های مورد استفاده در میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) عموماً بایستی تثبیت، آبگیری، قالب‌دهی، برش‌گیری و سپس توسط فلزات سنگین دارای دانسیته الکترونی رنگ‌آمیزی گردد.
- بوسیله میکروسکوپی الکترونی کرایو می‌توان نمونه‌های زیستی آب‌دهی شده، تثبیت نشده، و رنگ‌آمیزی نشده را مستقیماً در میکروسکوپ الکترونی گذاره مشاهده کرد؛ نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد شده‌اند و در این شرایط نگهداری می‌شود.
- جزئیات سطحی اشیاء را می‌توان در نمونه‌های پوشیده شده با فلز به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره شاهده کرد.
- توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) می‌توان از سلول‌ها یا بافت‌های برش‌گیری نشده پوشیده شده با فلز تصاویری ایجاد کرد که به نظر سه‌بُعدی می‌رسند.

۹ـ۴ تخلیص اندامک‌های سلولی

در بسیاری از مطالعات ساختاری و عملکردی سلول‌ها نمونه‌هایی از اندامک‌های مشخص زیر سلولی ضروری می‌نماید. به عنوان مثال، در یک مطالعه پروتئومیکسی که بر روی میتوکندری تخلیص شده از مغز، قلب، کلیه و کبد موش انجام شد ۵۹۱ پروتئین میتوکندریایی مشخص شد که ۱۶۳ تا از آنها قبلاً به این اندامک متصل نشده بودند. چندین پروتئین تنها در میتوکندری‌های انواع سلول‌های ویژه یافت شدند. تعیین عملکرد این پروتئین‌های میتوکندریایی تازه کشف شده هدف اصلی تحقیق اخیر بر روی این اندامک می‌باشد. در این بخش، ما به بررسی چندین روش رایج برای جداسازی اندامک‌های مختلف می‌پردازیم.

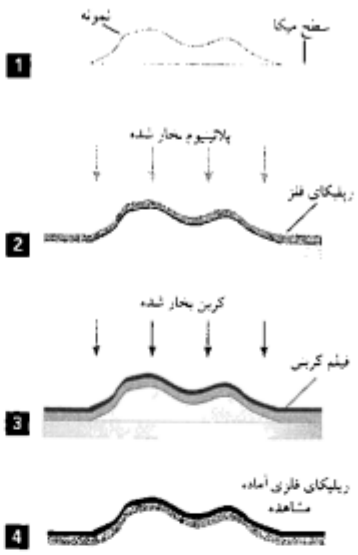
تخریب سلولی باعث آزادسازی اندامک‌ها و سایر محتویات آن می‌گردد

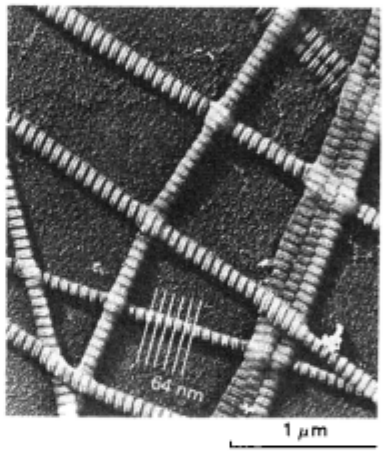
گام اول در تخلیص ساختارهای زیر سلولی آزادسازی محتویات سلولی به وسیله شکست غشای پلاسمایی و در صورت وجود دیواره سلولی می‌باشد. ابتدا سلول‌ها در محلولی از pH و نمک مناسب، معمولاً ساکارز ایزوتونیک (۰/۲۵M) یا ترکیبی از نمک‌های مشابه نمک‌های داخل سلولی، قرار داده می‌شوند. بسیاری از سلول‌ها را می‌توان با هم زدن سوسپانسیون سلولی در همزن با سرعت بالا[2] یا گذاشتن آنها در معرض اصواتی با فرکانس خیلی بالا (سونیکاسیون) شکست. غشاهای پلاسمایی را هم‌چنین می‌توان توسط هموژنیزورهای بافتی ویژه، که در آنها سلول‌ها در میان فضای باریک بین میله و جداره هموژنیزور و تحت فشار قرار می‌گیرند، پاره کرد؛ فشار موجود بین دیواره هموژنیزور و میله آن باعث پارگی و شکست سلول‌ها می‌گردد.

قابل ذکر است که زمانی که سلول‌ها در محلول‌های هیپوتونیک قرار می‌گیرند آب به داخل آنها جریان می‌یابد، به این معنی که آن محیط دارای غلظت یونی کم‌تر از مولکول‌های موجود در داخل سلول‌ها می‌باشد. از این جریان اسمزی می‌توان در متورم کردن سلول، تضعیف غشای پلاسمایی و تسهیل در پارگی آن استفاده کرد. عموماً محلول سلولی در ۰°C نگهداری می‌شوند تا فعالیت آنزیم‌ها و سایر اجزای آن حفظ شود.

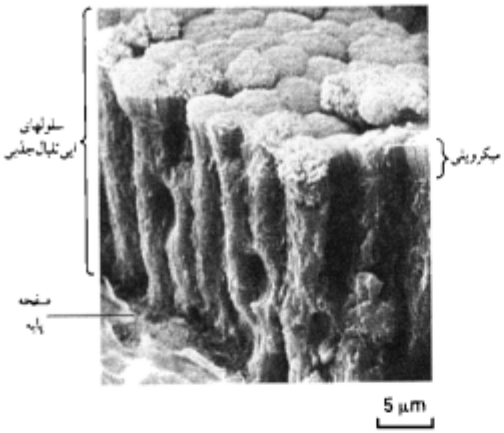
با شکست سلولی یک مخلوطی از اجزای سلولی شناور، (هموژنات)، تولید می‌شود که می‌توان از آن اندامک‌های مورد نظر را

1- Preparative 2- High-Speed blender





▲ **شکل تجربی ۹ـ۲۳ بوسیله سایه‌دهی فلزی می‌توان جزئیات سطحی اشیا کوچکتر را توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مشاهده کرد.** (a) نمونه بر روی سطح میکا کشیده می‌شود و سپس در یک تبخیرکننده با خلاء[1] خشک می‌گردد (❶). شبکه[2] نمونه توسط یک فیلم نازکی از یک فلز سنگین مثل پلاتینیوم یا طلا که از فیلامنت فلزی گرم شده بخار می‌گردد، پوشانده می‌شود (❷). به منظور پایدارسازی ریپلیکا، نمونه سپس توسط یک فیلم کربنی که از الکترود بخار می‌شود، پوشیده می‌شود (❸). سپس ماده زیستی توسط اسید و سفیدکننده حل می‌گردد (❹) و بوسیله TEM مشاهده می‌شود. در میکروگراف الکترونی چنین نمونه‌ای، نواحی پوشیده شده با کربن روشن به نظر می‌رسند ـ در مقابل، ناحیه‌ای از میکروگراف که با فلز سنگین رنگ‌آمیز شده است تاریک به نظر می‌رسد. (b) ریپلیکای سایه‌دهی شده با پلاتینیوم فیبرهای زیر ساختاری کلاژن پوست گوساله، پروتئین ساختاری مهم تاندون‌ها، استخوان‌ها، و بافت‌های مشابه. ضخامت فیبرها حدود ۲۰۰nm می‌باشد؛ الگوی ویژه تکراری ۶۴nm (خطوط موازی سفید) در طول هر فیبر قابل رؤیت می‌باشد.



▲ **شکل تجربی ۹ـ۲۴ به کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) می‌توان تصویر سه‌بعدی از سطح نمونه برش نیافته به دست آورد.** شکل فوق تصویر SEM از اپی‌تلیوم لومن روده می‌باشد. میکروویلی‌های شبه انگشتی از سطح لومنی سلول‌ها کشیده شده‌اند. صفحه پایه‌ای موجود در زیر اپی‌تلیوم باعث اتصال آن به بافت پیوندی می‌گردد. این تصویر سلول‌های روده‌ای را با شکل ۹ـ۱۷، میکروگراف فلورسانسی، مقایسه کنید.

بازیابی کرد. به دلیل این‌که کبد رت دارای مقدار فراوانی از یک نوع سلول می‌باشد، از این بافت در بسیاری از مطالعات اندامک‌های سلولی استفاده می‌شود. با وجود این اساس استخراج برای تمام بافت‌ها و سلول‌ها مشابه می‌باشد و تنها با اعمال تغییراتی در روش‌های فراکشن‌سازی سلولی می‌توان اجزای موردنظر را جداسازی و تخلیص کرد.

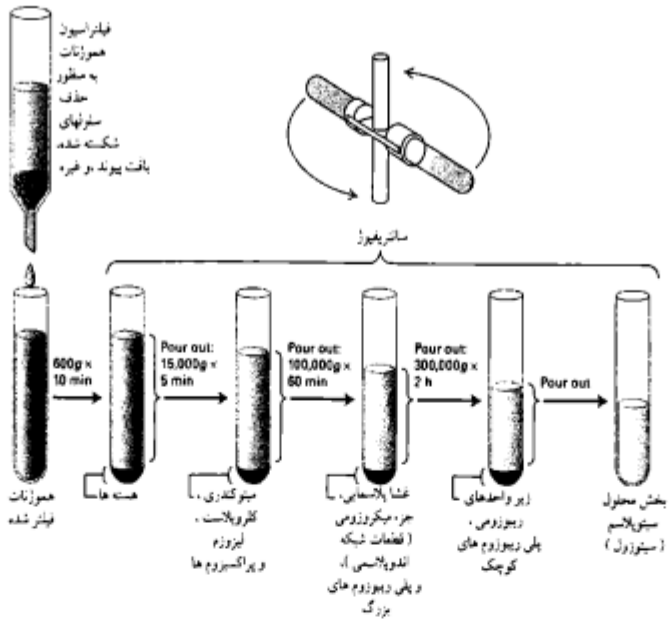
با سانتریفیوژ کردن می‌توان انواع اندامک‌ها را تفکیک کرد

در فصل ۳، ما اصول سانتریفیوژ کردن و کاربردهای تکنیک سانتریفیوژ را در تفکیک پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ملاحظه کردیم. روش‌های مشابهی در تفکیک و تخلیص اندامک‌های مختلف سلولی، که از نظر اندازه و چگالی متفاوت هستند و در نتیجه نیازمند رسوب در سرعت‌های متفاوت می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

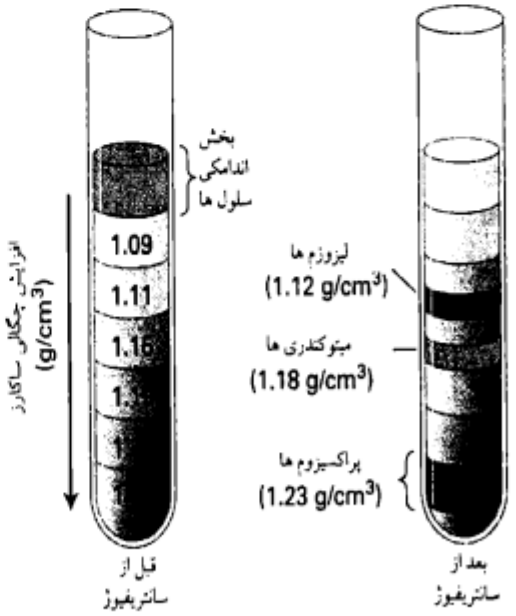
بسیاری از روش‌های تفکیک سلولی با سانتریفیوژ افتراقی هموژنات سلولی فیلتر شده در سرعت‌های بالاتر آغاز می‌گردد (شکل ۹ـ۲۵). بعد از هر سانتریفیوژ در مدت زمان مناسب، مایعی که در

1- Vacuum evaponator

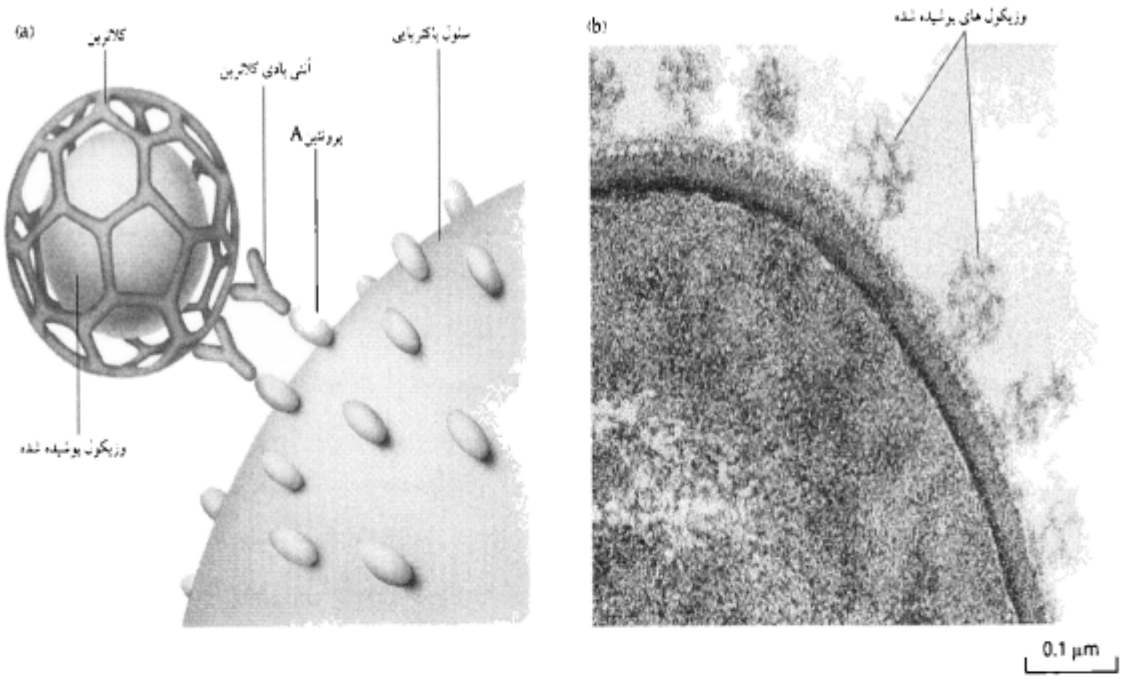
2- Grid



▲ **شکل تجربی ۲۵ـ۹ سانتریفیوژ افتراقی گام اول در تفکیک هموژنات سلولی می‌باشد.** هموژنات سلولی از شکست سلول‌ها به وجود می‌آید و معمولاً به منظور حذف سلول‌های سالم فیلتر شده و سپس در یک سرعت ملایم سانتریفیوژ می‌گردد تا هسته ـ بزرگ‌ترین اندامک رسوب یابد. سپس محلول رویی در سرعت بالا سانتریفیوژ می‌گردد تا میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها، لیزوزوم‌ها و پراکسیزوم‌ها رسوب یابند. سانتریفیوژ بعدی اولتراسانتریفیوژ می‌باشد که به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۰۰/۰۰۰g انجام می‌گردد و باعث رسوب غشای پلاسمایی، قطعات شبکه اندوپلاسمی و پلی‌ریبوزوم‌های بزرگ می‌شود. برای تخلیص زیرواحدهای ریبوزومی، پلی‌ریبوزوم‌های کوچک، و ذراتی مثل کمپلکس‌های آنزیمی نیاز به سانتریفیوژ در سرعت‌های بیشتر دارد. در محلول رویی تنها سیتوزول ـ (بخش محلول آبی سیتوپلاسم) ـ بعد از سانتریفیوژ در ۳۰۰/۰۰۰g به مدت ۲ ساعت باقی می‌ماند.



◀ **شکل تجربی ۲۶ـ۹ مخلوط فراکشن اندامکی را می‌توان توسط سانتریفیوژ تعادلی با شیب چگالی به میزان بیشتری تفکیک کرد.** در این مثال، کبد موش، مواد موجود در رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۱۵/۰۰۰g مجدداً حل گردید، (شکل ۲۵ـ۹) و بر روی شیبی از محلول پر چگال مثل ساکارز در یک لوله سانتریفیوژ قرار داده شد. با انجام چندین ساعت سانتریفیوژ، هر اندامک به مکان مناسب هم چگال خود در محلول حرکت کرده و در آنجا باقی می‌ماند. به منظور تفکیک بهتر لیزوزوم‌ها از میتوکندری‌ها، کبد قبل از شکست یافتی با محلول دارای مقدار کمی دترجنت پرفیوز می‌گردد. در طول این مدت، دترجنت به واسطه عمل اندوسیتوز جذب سلول‌ها می‌گردد و به لیزوزوم‌ها منتقل می‌گردد. دترجنت باعث می‌شود لیزوزوم‌ها تراکم کمتری نسبت به حالت نرمال داشته باشند و بدین ترتیب از میتوکندری‌ها به خوبی تفکیک گردد.



▲ **شکل تجربی ۲۷ـ۹ وزیکول‌های کوچک پوشیده شده را می‌توان به وسیله اتصال آنتی‌بادی ویژه پروتئین سطحی وزیکول و با اتصال به سلول‌های باکتری تخلیص کرد.** در این مثال، سوسپانسیون غشاهای کبد رت با آنتی‌بادی ویژه کلاترین انکوبه گردید، کلاترین پروتئینی است که سطح خارجی وزیکول‌های معین سیتوزولی را می‌پوشاند. به این مخلوط سوسپانسیونی از باکتری استافیلوکوکوس اوروس اضافه می‌گردد. این باکتری در سطح غشاء خود دارای پروتئین A می‌باشد، این پروتئین به ناحیه ثابت Fc آنتی‌بادی‌ها متصل می‌گردد. (a) میانکنش پروتئین A با آنتی‌بادی متصل به وزیکول‌های پوشیده با کلاترین باعث اتصال وزیکول به سلول‌های باکتریایی می‌گردد. سپس کمپلکس وزیکول ـ باکتری را می‌توان با سرعت پایین سانتریفیوژ کرده و آن را بازیابی کرد. (b) میکروگراف الکترونی مقطع نازک که وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین را به صورت متصل به سلول *S. aureus* نشان می‌دهد.

بالای لوله باقی می‌ماند و محلول رویی[1] نامیده می‌شود، جدا شده و در سرعت بالاتری سانتریفیوژ می‌گردد. بخش رسوب[2] حاصل از سانتریفیوژ که دارای مخلوطی از اندامک‌های مختلف، هسته‌ها و ذرات ویروسی می‌باشد را نیز اغلب می‌توان به‌طور کامل با این روش تخلیص کرد.

بخش ناخالص حاصله از سانتریفیوژ افتراقی را می‌توان توسط سانتریفیوژ تعادلی با شیب چگالی[3] تخلیص کرد؛ این روش اجزای سلولی را مطابق با چگالی آنها تفکیک می‌کند. بعد از این‌که فراکشن مجدداً حل گردید، آن بر روی شیبی از یک ماده غیریونی متراکم مثل ساکارز یا گلیسرول قرار می‌گیرد. وقتی لوله در سرعت بالا (تقریباً ۴۰/۰۰rpm) به مدت چندین ساعت سانتریفیوژ می‌گردد، ذرات در جایی مستقر می‌شوند که چگالی آن با چگالی مایع اطرافش برابر است (شکل ۲۶ـ۹). سپس لایه‌های متعدد مایع با پمپ کردن محتویات لوله سانتریفوژ از یک لوله باریک به بیرون بازیابی می‌گردد.

به دلیل این‌که هر اندامک دارای شکل مورفولوژیکی منحصربه‌فردی می‌باشد، خلوص اندامک تخلیص شده را می‌توان با بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی اثبات کرد. در یک روش جایگزین می‌توان به منظور شناسایی اندامک از مولکول‌های مارکر مخصوص استفاده کرد. برای مثال پروتئین سیتوکروم C تنها در میتوکندری‌ها یافت می‌شود، بنابراین حضور این پروتئین در فراکشن لیزوزمی نشان‌دهندهٔ آلودگی آن توسط میتوکندری‌ها می‌باشد. بطور مشابه کاتالاز تنها در پراکسیزوم‌ها یافت می‌شود، اسید فسفاتاز در لیزوزوم‌ها و ریبوزوم‌ها تنها در شبکه اندوپلاسمی خشن یا سیتوزول یافت می‌شوند.

آنتی‌بادی‌های ویژه اندامکی در تهیه اندامک‌های بسیار خالص مورد استفاده قرار می‌گیرند

بعد از سانتریفیوژ افتراقی و سانتریفیوژ تعادلی با شیب چگالی فراکشن‌های سلول معمولاً حاوی بیشتر از یک نوع اندامک می‌باشند.

1- Supernatant 2- Pellet

3- Equilibrium density-gredient centrifugation

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ویژه پروتئین‌های غشایی اندامک‌ها ابزاری قوی در تخلیص بیشتر چنین فراکشن‌هایی می‌باشند. مثالی از این مورد تخلیص وزیکول‌هایی است که در سطح خارجی خود دارای پروتئین **کلاترین** می‌باشد؛ این وزیکول‌های پوشیده شده، که در تشکیل آندوزوم از غشای پلاسمایی مشارکت می‌کنند (شکل ۲ـ۹)، با جزئیات بیشتر در فصل ۱۴ بحث گردیده است. آنتی‌بادی کلاترین، که به حامل باکتریایی متصل شده است می‌تواند به‌طور انتخابی به این وزیکول‌های موجود در محلول خام[1] غشاها متصل شود، سپس کل کمپلکس آنتی‌بادی را می‌توان به وسیله سانتریفیوژ با سرعت کم استخراج کرد (شکل ۲۷ـ۹). در یک تکنیک مشابه از دانه‌های فلزی ریز که با آنتی‌بادی ویژه پوشانده شده است، استفاده می‌گردد. اندامک‌هایی که به آنتی‌بادی‌ها متصل می‌شود، و در نتیجه به دانه‌های فلزی نیز متصل می‌شوند، توسط یک آهن‌ربای کوچک از لوله آزمایش تخلیص می‌شوند.

تمامی سلول‌ها دارای انواع متنوعی از وزیکول‌های کوچک در اندازه‌های مشابه (قطر ۵۰ـ۱۰۰nm) و چگالی یکسان می‌باشند که تفکیک آنها را توسط تکنیک‌های سانتریفیوژی از یکدیگر با دشواری مواجه کرده است. تکنیک‌های ایمونولوژیکی در تخلیص گروه‌های ویژهٔ این وزیکول‌ها بسیار مفید می‌باشند. برای مثال سلول‌های چربی و عضلانی دارای ناقل‌های ویژه گلوکز (GLUT4) می‌باشند که در غشاء یکی از این نوع وزیکول‌ها قرار گرفته‌اند. زمانی که انسولین به این سلول‌ها اضافه می‌گردد، این وزیکول‌ها با غشاء سطحی سلول آمیخته می‌شوند و تعداد ناقل‌های گلوکز را افزایش می‌دهند تا گلوکز از خون جذب گردد. همان‌طور که در فصل ۱۵ خواهیم دید این فرایند در حفظ غلظت مناسب قند خون حیاتی می‌باشد. وزیکول‌های دارای GLUT4 را می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی که به بخشی از پروتئین GLUT4 موجود در بخش سیتوزولی وزیکول متصل می‌شود، جدا کرد. به‌طور مشابه، انواع وزیکول‌های ناقل، که در فصل ۱۴ بحث گردیده است، را می‌توان به وسیله آنتی‌بادی‌های ویژه پروتئین‌های سطحی ویژه آنها تفکیک کرد.

شکل تغییریافته این تکنیک را زمانی استفاده می‌کنند که هیچ آنتی‌بادی ویژه‌ای برای اندامک تحت مطالعه موجود نباشد. به همین منظور به ژنی که پروتئین غشایی ویژه اندامکی را کد می‌کند قطعه‌ای که برچسب اپی‌توپی را کد می‌کند اضافه می‌کنند. برچسب در بخشی از پروتئین قرار می‌گیرد که به سمت سیتوزول باشد. به دنبال بیان پایدار پروتئین نوترکیب در سلول تحت مطالعه، آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی‌اپی‌توپ (که در بالا شرح داده شد) در تخلیص اندامک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نکات کلیدی بخش ۹.۴

تخلیص اندامک‌های سلولی

- شکست سلولی توسط هموژنیزاسیون، سونیکاسیون یا سایر تکنیک‌ها منجر به رهایی اندامک‌ها از آن می‌گردد. آماس سلول‌ها در محلول هیپوتونیک باعث تضعیف غشای پلاسمایی شده و آنها را مستعد شکست می‌کند.
- سانتریفیوژ افتراقی پی در پی هموژنات سلولی موجب ایجاد فراکشن‌هایی از اندامک‌های نسبتاً تخلیص شده می‌گردد که از نظر جرم و چگالی فرق می‌کنند (شکل ۲۵ـ۹).
- از سانتریفیوژ تعادلی با شیب چگالی، که اجزا سلولی را بر حسب چگالی جدا می‌کند، می‌توان در تخلیص بیشتر اجزای سلولی بعد از سانتریفیوژ افتراقی استفاده کرد (شکل ۲۶ـ۹).
- تکنیک‌های ایمونولوژیکی که در آنها از آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین‌های غشایی ویژه اندامکی استفاده می‌شود در تخلیص اندامک‌ها و وزیکول‌هایی با اندازه و چگالی مشابه استفاده می‌شود (شکل ۲۷ـ۹).

۹ـ۵ جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های موجودات متازوان

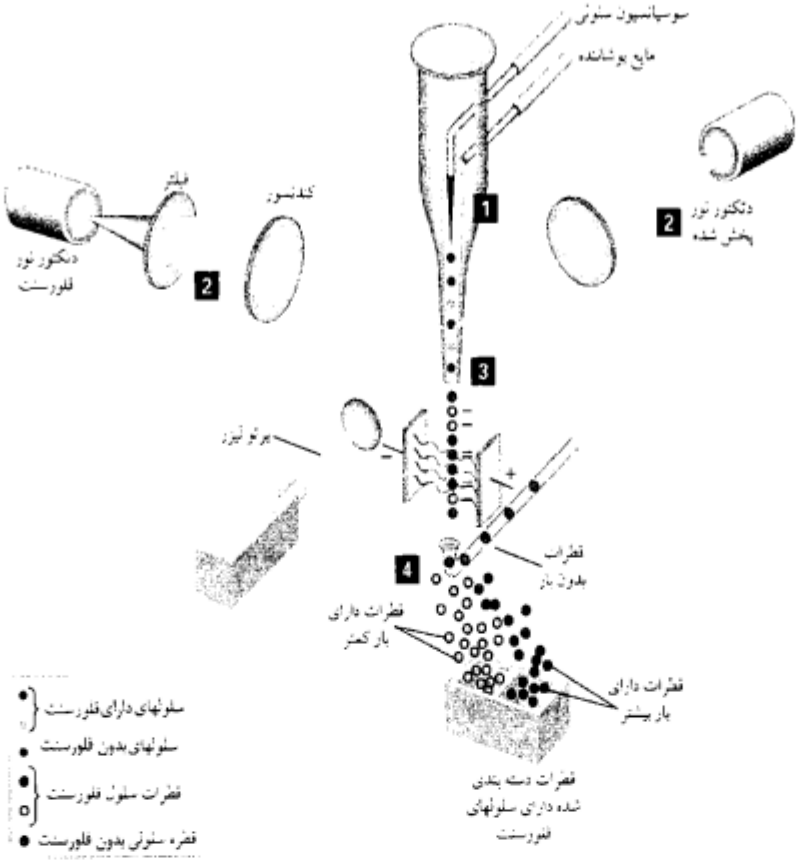
بافت‌های جانوری و گیاهی دارای انواع متنوعی از سلول‌ها می‌باشند، اما بررسی‌های بیوشیمیایی و مولکولی بیشتر روی جمعیت سلولی هموژن انجام می‌گردد. در قسمت اول این بخش ما ابزاری قدرتمندی بنام **دسته‌بندی‌کننده سلولی فعال شده با فلورسانس** (FACS)[2] را توضیح می‌دهیم، با این ابزار سلول‌هایی که دارای پروتئین‌های سطح سلولی ویژه‌ای هستند را می‌توان از مخلوط پیچیده سلولی جداکرد. با این طریق، محقق می‌تواند جمعیت هموژن انواع ویژه سلولی را برای مطالعه جداسازی کند. بعداً ما بر روی تکنیکی بحث می‌کنیم که در کشت سلول‌های اولیه[3] مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت سلول‌های اولیه به این معنی است که سلول‌هایی که مستقیماً از جانور جداسازی می‌شود را در آزمایشگاه تحت شرایط رشد و بقا حداقل به مدت چندین تقسیم حفظ و نگهداری شود.

انواع مشخصی از سلول‌های اولیه، مخصوصاً آن دسته که از جنین جداسازی می‌گردد در کشت متحمل تمایز می‌گردند. به عنوان مثال، ما توضیح خواهیم داد که چگونه پیش‌ساز سلول عضلانی در

1- Crude Preparation

2- Fluorescence-activated cell sorter (FACS)

3- Primary cells



▲ **شکل تجربی ۲۸ـ۹ به کمک دسته‌بندی‌کننده سلولی فعال شده با فلوسانس (FASC) می‌توان سلول‌هایی که با فلورسنت نشاندار شده‌اند را تفکیک کرد.** مرحله (❶): سوسپانسوین غلیظ سلول‌های نشاندار شده با یک بافر (مایع پوشاننده[1]) مخلوط می‌گردد و سلول‌ها از جلوی پرتوی نور لیزر عبور می‌کنند. مرحله (❷): نور فلورسنت نشر یافته و نور پراکنده شده توسط هر سلول هر دو اندازه‌گیری می‌گردد؛ از میزان نور پخش شده می‌توان اندازه و شکل سلول را تعیین کرد. مرحله (❸): سپس سوسپانسیون از یک دهانک عبور داده می‌شود تا قطرات کوچک دارای یک سلول واحد تشکیل گردد. در موقع تشکیل هر قطره به میزان فلورسانس سلول بار الکتریکی منفی به آن داده می‌شود. مرحله (❹): قطرات بدون بار و آنهایی که بار الکتریکی متفاوت دارند توسط یک میدان الکتریکی تفکیک شده و جمع‌آوری می‌شود. به خاطر آن که برای دسته‌بندی هر قطره تنها میلی ثانیه زمان لازم است می‌توان در هر ساعت ۱۰ میلیون سلول از این دستگاه عبور داد.

موقع کشت می‌تواند تمایز یابد و سلول‌های نرمال عضلانی تشکیل دهد، این موضوع مثالی از یک سیستم خوب برای مطالعه این فرایند تکوینی می‌باشد. اگرچه بسیاری از سلول‌های اولیه تنها متحمل چند تقسیم محدود می‌شوند، اما در برخی از آنها جهش‌های سرطان‌زا (انکوژنیک) انباشته می‌شوند که به آنها اجازه می‌دهد به‌طور نامحدود رشد کنند. در بسیاری از موارد یک سلول واحد را می‌توان به آسانی به کلونی از سلول‌های مشخص تبدیل کرد، این فرایند کلون کردن سلول[2] نامیده می‌شود. چون این سلول‌ها از نظر ژنتیکی هموژن هستند، برای مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی مفید می‌باشند. بعضی از سلول‌های کلون یافته به سلول‌های ویژه مثل آدیپوسیت (سلول‌های ذخیره‌کننده چربی)، عصب، یا عضله تمایز می‌گردند. بنابراین مطالعه مکانیسم تمایز را می‌توان بر روی این جمعیت سلولی هموژن انجام داد. در بخشی‌هایی از این فصل نشان داده‌ایم که چگونه استفاده از آنتی‌بادی‌ها آزمایشات زیستی سلول را تسهیل کرده‌اند؛ در انتهای این فصل چگونگی استفاده از سلول‌های ویژه کشت شده را در تولید این آنتی‌بادی‌ها شرح خواهیم داد.

1- Sheath
2- Cell cloning

به وسیله فلوسایتومتری می‌توان انواع سلول‌های مختلف را تفکیک کرد

بعضی از انواع سلول‌ها به اندازه کافی از نظر چگالی متفاوت هستند که بتوان آنها را براساس این ویژگی فیزیکی تفکیک کرد. برای مثال سلول‌های سفید خون (لوکوسیت‌ها) و سلول‌های قرمز خون (اریتروسیت‌ها) به دلیل این‌که اریتروسیت‌ها هیچ هسته‌ای ندارند، چگالی بسیار متفاوتی از یکدیگر دارند؛ بنابراین، این سلول‌ها را می‌توان با سانتریفیوژ تعادلی با چگالی که در بالا توضیح داده شد، تفکیک کرد. به دلیل این‌که بسیاری از انواع سلول‌ها را نمی‌توان به آسانی تمیز داد، تکنیک‌هایی مثل فلوسایتومتری در تفکیک آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در فلوسایتومتری سلول‌های مختلف بر اساس نوری که آنها در زمان عبور از جلوی پرتولیزر از خود پراکنده[1] و فلورسانسی که از خود نشر می‌کنند، شناسایی می‌شوند؛ بنابراین می‌توان به وسیلهٔ فلوسایتومتری تعداد سلول‌های یک نوع ویژه را از مخلوط سلولی تعیین کرد. توسط FACS، که بر پایه فلوسایتومتری می‌باشد، می‌توان یک یا چند نوع سلول را از میان هزاران سلول دیگر انتخاب کرد و آنها را در یک ظرف کشت جداگانه دسته‌بندی کرد (شکل ۲۸ـ۹). برای مثال، هر گاه یک آنتی‌بادی ویژه مولکول سطح سلولی به یک رنگ فلورسنت متصل شود، هر سلولی که این مولکول را داشته باشد به آنتی‌بادی متصل شده و در زمانی که در FACS فلورسانس کند از سایر سلول‌ها جدا می‌گردد. سلول‌های تفکیک شده از سایر سلول‌ها را می‌توان کشت داد.

روش FACS در تخلیص انواع مختلف سلول‌های سفید خون، که هر کدام از آنها در سطح خود یک یا چند پروتئین ویژه دارند و بنابراین به آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه خود متصل می‌شود، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای مثال تنها سلول‌های T سیستم ایمنی در سطح خود پروتئین‌های CD3 و Thy1.2 را دارند. حضور این پروتئین‌های سطحی باعث می‌شوند که سلول‌های T به آسانی از سایر سلول‌های خونی یا سلول‌های طحال جدا شوند (شکل ۲۹ـ۹).

ممکن است که دانه‌های مغناطیسی کوچکی نیز در این فرایند استفاده شود و نیازی به فلوسایتومتر نباشد. دانه‌ها توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ویژه پروتئین سطحی مثل CD3 یا Thy1.2 پوشیده می‌شوند. تنها سلول‌هایی که دارای این پروتئین‌ها هستند به دانه‌ها متصل می‌شوند و توسط یک آهن‌ربای کوچک از مخلوط سلولی جدا می‌گردد.

از سایر کاربردهای فلوسایتومتری می‌توان به اندازه‌گیری میزان DNA و RNA سلولی و تعیین شکل و اندازه عمومی سلول‌ها اشاره کرد. با استفاده از FACS می‌توان اندازه سلولی (از طریق مقدار نور پراکنده شده) و مقدار DNA (از طریق مقدار فلورسانس نشر شده از رنگ متصل شده به DNA) را اندازه‌گیری کرد.

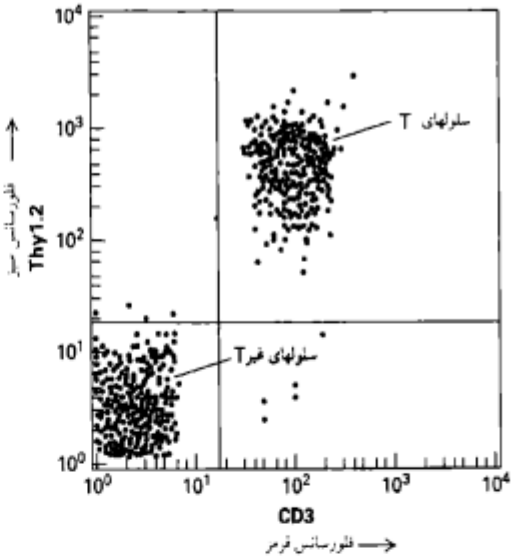
با اندازه‌گیری میزان DNA سلول‌ها می‌توان همانندسازی DNA را، که شاخصی از پیشرفت چرخه سلولی است، تعقیب کرد (فصل ۲۰).

کشت سلول‌های جانوری نیاز به محیط غنی از مواد غذایی و سطوح جامد ویژه دارد

بر خلاف بسیاری از سلول‌های باکتریایی که به آسانی کشت داده می‌شوند برای کشت سلول‌های جانوری نیاز به مواد غذایی ویژه و ظروف ویژه پوشانده شده[2] نیاز است. برای این‌که بافت‌ها یا سلول‌های کشت داده شده فعالیت طبیعی داشته باشند بایستی دما، pH، قدرت یونی، و دسترسی به مواد غذایی ضروری کاملاً مشابه شرایط بدن موجود زنده باشد. سلول‌های جانوری جدا شده از جاندار را در یک مایع غنی از مواد غذایی بنام محیط کشت در ظروف پلاستیکی یا فلاسک قرار می‌دهند. سلولها در انکوباتورهایی که در آنها دما، اتمسفر، و رطوبت کاملاً تحت کنترل است، نگهداری می‌شوند. به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی یا قارچی اغلب به محیط کشت آنتی‌بیوتیک‌هایی اضافه می‌گردد. برای ممانعت از آلودگی‌های بیشتر محققان معمولاً ظرف سلول‌ها را تعویض می‌کنند، موادی را به محیط کشت اضافه می‌کنند، و نیز نمونه‌ها در محفظه‌هایی که دارای هوای آن در حال چرخش و فیلتر شده است دست‌ورزی می‌کنند. فیلتر شدن هوا باعث حذف میکروارگانیسم‌ها و سایر آلودگی‌های موجود در هوا می‌شود.

محیط کشت سلول‌های جانوری بایستی ۹ اسیدآمینه‌ای که سلول‌های جانوران مهره‌دار قادر به سنتز آن نیستند را تأمین کند. به علاوه بیشتر سلول‌های کشت داده شده به سه اسیدآمینه دیگر که تنها در سلول‌های ویژه جانوری سنتز می‌شود، نیز نیاز دارند. ترکیبات ضروری دیگر محیط‌های کشت سلول‌های جانوری شامل ویتامین‌ها، نمک‌های مختلف، اسیدهای چرب، گلوکز و سرم می‌باشد. سرم، مایع بخش غیرسلولی خون (پلاسما) می‌باشد که بعد از لخته شدن پلاسما به وجود می‌آید. سرم بسیاری از فاکتورهای

1- Scatter 2- Coated



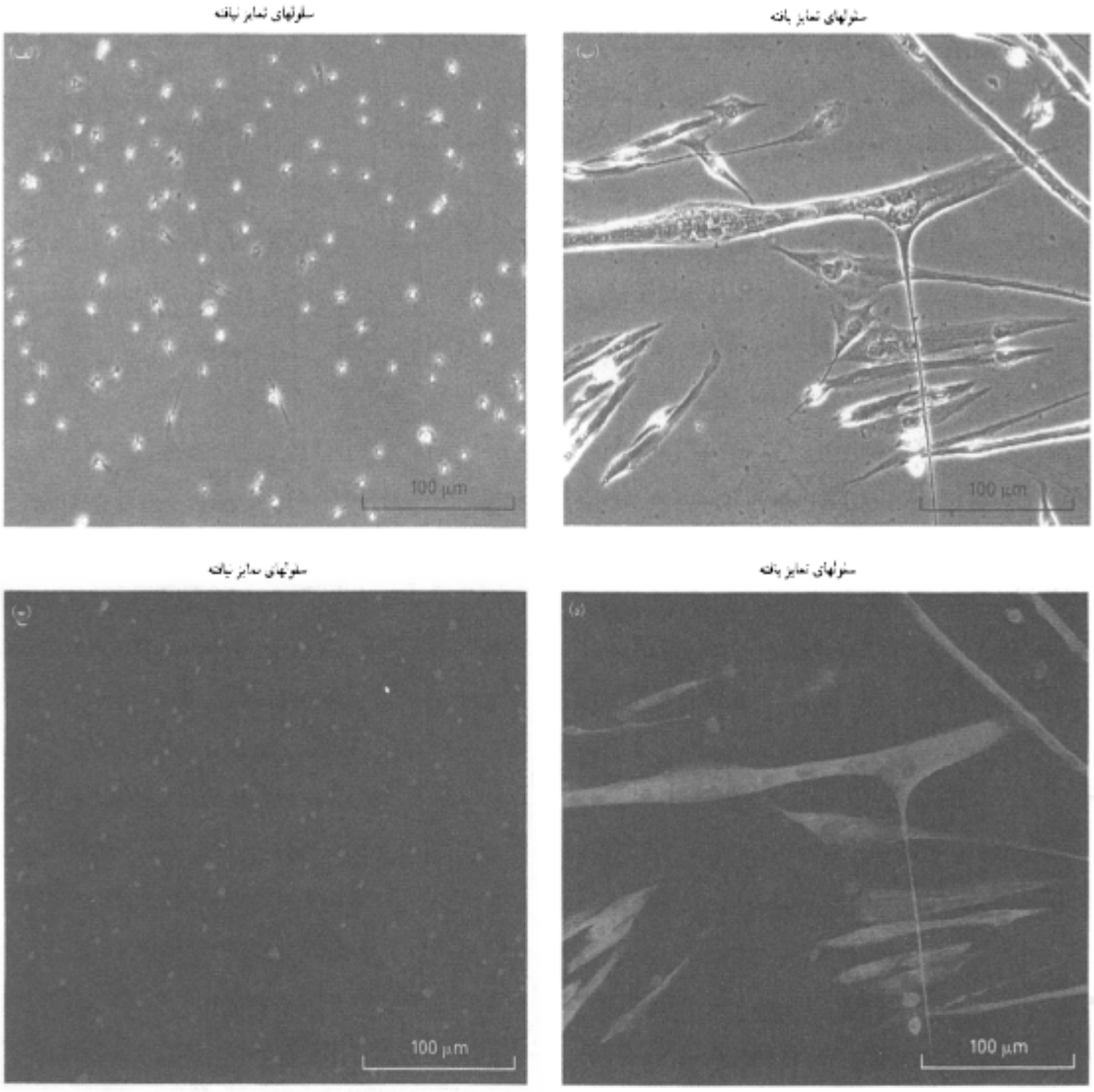
▲ **شکل تجربی ۲۹ـ۹ سلول‌های T متصل به آنتی‌بادی‌های نشاندار با فلورسانس مخصوص دو پروتئین سطح سلولی، توسط FACS از سایر سلول‌های سفید خون تفکیک می‌شوند.** سلول‌های طحال از موش استخراج شد و با آنتی‌بادی مونوکلونال فلورسنت قرمز ویژه پروتئین سطح سلولی CD3 و آنتی‌بادی مونوکلونال فلورسنت سبز ویژه پروتئین سطحی سلولی Thy1.2 تیمار شدند. زمانی که سلول‌ها از دستگاه FACS عبور داده شدند، شدت فلورسانس سبز و قرمز منتشره از هر سلول ثبت می‌گردد. هر نقطه نشان‌دهنده یک سلول می‌باشد. نمودار فلورسانس سبز (محور عمودی) در برابر فلورسانس قرمز (محور افقی) هزاران سلول طحال نشان می‌دهد که تقریباً نیمی از آنها ـ سلول‌های T ـ هر دو پروتئین CD3 و Thy1.2 را در سطح خودشان بیان می‌کنند (چارک راست ـ بالا). باقیمانده سلول‌ها، که فلورسانس پایین‌تری را نشان می‌دهند (چارک چپ ـ پایین) تنها مقدار کم‌تری از این پروتئین‌ها را بیان کرده‌اند و در نتیجه سایر سلول‌های سفید به جز سلولهای T می‌باشند. به مقیاس لگاریتمی محورهای عمودی و افقی توجه شود.

پروتئینی ضروری برای تکثیر سلول‌های پستانداران را دارا می‌باشد. این فاکتورها شامل هورمون پلی‌پپتیدی انسولین؛ ترانسفرین، که آهن را به شکل قابل دسترس مهیا می‌کند؛ و بسیاری از فاکتورهای رشد می‌باشد. به علاوه بعضی از انواع سلول‌ها نیاز به فاکتورهای رشد پروتئینی ویژه دارند که در سرم موجود نیست. به عنوان مثال پیش‌ساز[1] سلول‌های قرمز خون نیاز به اریتروپوئتین و لنفوسیت‌های T نیاز به اینترلوکین ۲ دارند (فصل ۱۶). تعداد کمی از سلول‌های پستانداران را می‌توان در محیط‌های کشت بدون سرم که دارای اسیدهای آمینه، گلوکز، ویتامین‌ها و نمک‌ها به علاوه مواد معدنی کمیاب، فاکتورهای رشد پروتئینی ویژه و سایر ترکیبات می‌باشند کشت داد. بر خلاف سلول‌های باکتریایی و مخمر که در محیط‌های سوسپانسیون می‌توانند رشد کنند، بیشتر سلول‌های جانوری می‌توانند تنها بر روی سطوح جامد رشد کنند. این ضرورت اهمیت پروتئین‌های سطح سلولی را که مولکول‌های چسبنده سلولی[2] (CAMs) نامیده می‌شوند، پر رنگ‌تر می‌کند. این پروتئین‌ها سلول‌ها را به سایر سلول‌ها یا به پروتئین‌هایی مثل کلاژن یا فیبرونکتین ماتریکس خارج سلولی متصل می‌کند. ماتریکس خارج سلولی بسیاری از سلول‌های جانوری را احاطه کرده است و محیط بیرونی آنها را تشکیل می‌دهد (فصل ۱۹). بسیاری از سلول‌ها می‌توانند به شیشه یا پلاستیک‌های ویژه متصل شوند و رشد کنند. بسیاری از سلول ها اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) را ترشح می‌کنند که به سطوح ظروف کشت چسبیده و به اتصال سلول‌ها به آن و رشد سلولها کمک می‌کند. سلولی که بر روی شیشه یا ظرف پلاستیکی کشت داده می‌شود تکثیر یافته و در مدت ۱۴ـ۴ روز بر حسب سرعت رشد توده قابل مشاهده‌ای ایجاد می‌کند که کلونی نامیده می‌شود. کلونی دارای هزاران سلول مشخص می‌باشد که از نظر ژنتیکی یکسان می‌باشد. بعضی از سلول‌های خونی تخصص یافته و سلول‌های سرطانی را می‌توان به صورت سلول‌های واحد و سوسپانسیون نگهداری یا کشت داد.

با استفاده از کشت سلول اولیه می‌توان تمایز سلولی را مطالعه کرد

عموماً در تهیه کشت سلول اولیه[3]، بافت‌های نرمال جانوری (مثل پوست، کلیه، کبد) یا کل جنین استفاده می‌شود. به منظور تهیه سلول برای کشت اولیه، بایستی میانکنش‌های سلول با سلول و ماتریکس با سلول شکسته شوند. برای انجام این کار قطعات بافتی را با یک پروتئاز (مثل تریپسین، آنزیم هیدرولیزکننده کلاژن، کلاژناز، یا هر دو آنها) و شلاتورهای کاتیون‌های دو ظرفیتی (مثل EDTA) که محیط را از Ca^{2+} و Mg^{2+} تهی می‌سازند تیمار می‌کنند. بسیاری از مولکول‌های چسبنده سلولی نیاز به کلسیم دارند و بنابراین زمانی که کلسیم حذف می‌گردد غیرفعال می‌شوند؛ سایر مولکول‌های چسبنده سلولی که به کلسیم وابسته نیستند بایستی پروتئولیز شوند تا سلول‌ها جدا شوند. سپس سلول‌های آزاد شده در ظروف غنی از مواد

1- Progenitor
2- Cell-adhesion molecules (CAM)
3- Primary cell Culture



▲ **شکل تجربی ۳۰ـ۹ (شکل رنگی) تمایز سلول‌های اولیه ماهواره‌ای موش (میوبلاست) به سلول‌های عضلانی در محیط کشت.** سلول‌های اولیه ماهواره‌ای موش تحت شرایط تکثیری غیرتمایزی (c,a) یا شرایط تمایزی (b,d) کشت داده شدند. (b,a) تصاویر اختلاف فاز تشکیل سین‌سیتیای چند هسته‌ای را در هنگام تمایز عضلانی نشان می‌دهد. (d,c) رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی فلورسانس قرمز ویژه زنجیره سنگین میوزین نشان می‌دهد که این پروتئین ویژه عضلانی در هنگام تمایز القا شده است. با رنگ‌آمیزی هوخست (آبی) هسته‌ها را می‌توان شناسایی کرد. میله = ۱۰۰mm.

غذایی و محیط حاوی سرم قرار داده می‌شوند تا به سطح آنها و به یکدیگر بچسبند. به منظور مطالعات بیوشیمیایی یا کشت‌های دیگر از محلول‌های شلاتور / پروتئاز مشابهی برای برداشتن سلول‌های چسبنده از ظرف کشت (انتقال به ظرف دیگر) استفاده می‌شود.

فیبروبلاست‌ها عمده‌ترین سلول‌ها در بافت‌های پیوندی می‌باشند که به طور معمول ترکیبات ECM مثل کلاژن تولید می‌کنند. کلاژن به مولکول‌های چسبنده سلولی متصل می‌گردد و به این طریق سلول‌ها را به سطح متصل می‌کند. در محیط کشت، فیبروبلاست‌ها نسبت به سایر سلول‌ها سریع‌تر تقسیم می‌گردند، بنابراین اگر در موقع جداسازی سایر سلول‌ها دقت بیشتری در جهت حذف آنها انجام نگردد در کشت اولیه غالب خواهند بود.

نواحی مختلف جنین مهره‌داران دارای **میوبلاست** می‌باشد، میوبلاست‌ها پیش‌ساز سلول‌های عضلانی می‌باشد که سریع‌تر تقسیم می‌گردد و به سایر بخش‌های جنین مهاجرت می‌کند. در بعضی نقاط میوبلاست پشت سر یکدیگر قرار گرفته، تقسیم سلولی را متوقف می‌کنند و به یکدیگر ملحق می‌شوند و یک سلول بزرگ چند هسته‌ای به نام **میوتیوب** تشکیل می‌دهند. همزمان با اتصال میوبلاست‌ها به یکدیگر، این سلول‌ها سنتز چندین پروتئین ویژه

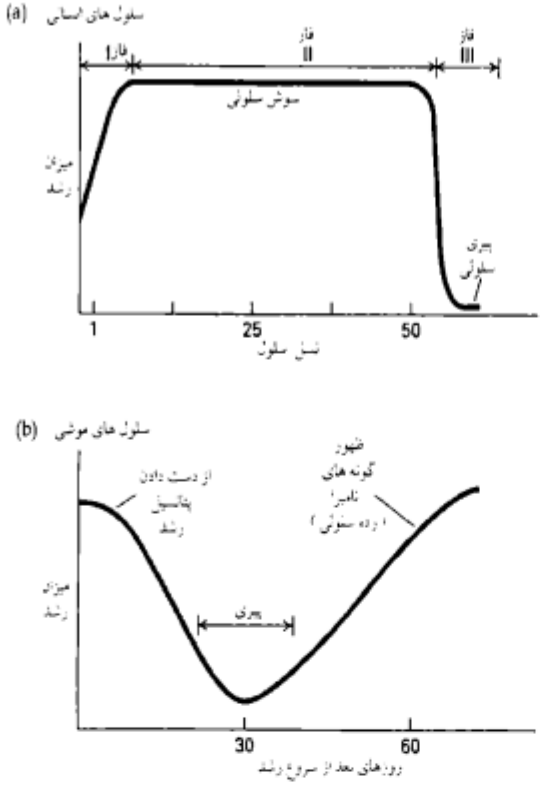
عضلانی را القا می‌کنند که برای تکوین و عملکرد عضلانی ضروری است. سلول‌های تک هسته‌ای مشابهی در عضلات بالغین، که سلول‌های سیاره‌ای[1] نامیده می‌شوند، می‌توانند با یکدیگر ترکیب شده و میوتیوب ایجاد کنند که به طور خودبه‌خودی سنتز پروتئین ویژه عضلانی مثل زنجیره بزرگ میوزین را القا کنند. همان‌طور که در شکل ۹ـ۳۰ نشان داده شده است این فرایند تکوینی را می‌توان در محیط کشت تکرار کرد. وقتی که سلول‌های اولیه ماهواره‌ای موش در محیط کشت مناسب قرار می‌گیرند با همدیگر ترکیب شده (اشکال ۹ـ۳۰ a,b) و به سلول‌های عضلانی تمایز می‌یابند (اشکال ۹ـ۳۰ c,d). این سیستم به محققان اجازه می‌دهد تا نقش فاکتورهای رونویسی ویژه و مولکول‌های چسبنده سلولی را در کنترل تکوین عضله بررسی کنند.

بعضی از سلول‌های خونی، طحال، یا مغز استخوان به‌طور ضعیف به ظرف کشت می‌چسبند اما با وجود این به خوبی رشد نمی‌کنند. در بدن، چنین سلول‌های **غیرچسبنده**[2] به صورت‌سوسپانسیون (در خون) یا به‌طور خیلی ضعیفی چسبنده هستند (در مغز استخوان و طحال). به دلیل این‌که بعضی از این سلول‌ها در تکوین سلول‌های خونی تمایز یافته مراحل تابالغی از خود نشان می‌دهند، در مطالعه تمایز سلول‌های خونی و تکوین غیرطبیعی لوکمیا مفید می‌باشند.

کشت سلول اولیه و سوش‌های سلولی[3] طول عمر محدودی دارند

زمانی که سلول‌هایی از جنین یا جانور بالغ برداشته و کشت داده شود، بیشتر آنهایی که چسبنده هستند تقسیم سلولی محدودی دارند و سرانجام رشد خود را متوقف می‌کنند (پیری سلولی[4]). برای مثال فیبروبلاست جنین انسانی قبل از این‌که رشد خود را متوقف کنند تقریباً ۵۰ بار تقسیم می‌گردد (شکل a ۹ـ۳۱). اگر 10^6 سلول وجود داشته باشد ۵۰ بار تقسیم شدن، $2^{50} \times 10^6$ یا بیشتر از 10^{20} سلول تولید می‌شود که برابر با وزن تقریباً ۱۰۰۰ انسان می‌باشد. به‌طور معمول تنها بخش کوچکی از این سلول‌ها در هر آزمایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین اگرچه نیمه عمر این نوع کشت‌ها محدود است ولی چنانچه با احتیاط حفظ شود می‌توان آن را نسل‌های زیادی مورد مطالعه قرار داد. چنین رده سلولی که از یک کشت اولیه به وجود بیاید **سوش سلولی**[5] نامیده می‌شود.

با توجه به توانایی منجمد کردن و دوباره گرم کردن سلولی تحقیقات بر روی رده‌های سلولی بسیار ساده شده است. سوش‌های



▲شکل ۹ـ۳۱ مراحل کشت سلول. (a) زمانی که سلول‌ها از بافت انسانی جداسازی و کشت داده می‌شوند برخی از آنها می‌میرند و برخی دیگر (اغلب فیبروبلاست‌ها) شروع به رشد می‌کنند؛ روی هم رفته میزان رشد افزایش می‌یابد (فاز I). زمانی که سلول‌های باقیمانده جمع‌آوری و رقیق گردد و در ظروف دیگر کشت داده شوند سوش سلولی تا ۵۰ نسل شروع به تقسیم می‌کند (فاز II). بعد از آن میزان رشد سریعاً افت می‌کند. در ادامه (فاز III) تمامی سلول‌های موجود در محیط کشت شروع به متوقف کردن رشد خود می‌کنند (پیری). (b) در محیط کشتی که از سلول‌های موش یا سایر جوندگان تهیه شده است، مرگ سلولی اولیه (نشان داده نشده است) به همراه ظهور سلول‌های سالم در حال رشد مشاهده می‌شود. وقتی که این سلول‌های در حال تقسیم رقیق شدند و اجازه رشد یافتند، شروع به از دست دادن پتانسیل رشد خود می‌کنند و بیشتر آنها رشد خود را متوقف می‌نمایند (محیط کشت متحمل پیری می‌شود). سلول‌های بسیار نادری دچار جهش‌های انکوژنی می‌گردد. این جهش‌ها به آنها کمک می‌کند تا زنده مانده و تقسیم خود را تا زمانی که محیط کشت پر شود ادامه دهند. این سلول‌ها رده سلولی می‌باشند که هر گاه به‌طور صحیح رقیق شده و مواد غذایی در اختیارشان قرار داده شود به‌طور نامحدودی رشد می‌کنند. به چنین سلول‌هایی، سلولهای نامیرا گفته می‌شود.

1- Satellite cells
2- Nonodherent
3- Cell strain
4- Cell senescence
5- Cell Strain

سلولی را می‌توان در حالت سوسپانسیونی منجمد کرد و برای مدت طولانی در دمای نیتروژن مایع نگهداری کرد. در این حالت به منظور جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ از مواد نگهدارنده استفاده می‌شود. اگرچه بعضی از سلول‌ها در هنگام گرم کردن زنده باقی نمی‌مانند اما بسیاری از آنها می‌توانند زنده بمانند و رشد خود را از سر بگیرند.

سلول‌های تبدیل شده را می‌توان در محیط کشت به‌طور نامحدودی رشد داد

زیست‌شناسان برای این‌که بتواند سلول‌های واحدی را کلون کنند، رفتار سلولی را تغییر دهند، یا جهش یافته‌ها را انتخاب کنند بایستی سلول‌ها را تا بیش از ۱۰۰ بار تقسیم سلولی حفظ کنند. سلول‌های مشتق شده از بعضی تومورها چنین رشد طولانی دارند. به علاوه، تعداد کمی از سلول‌های موجود در جمعیت سلول‌های اولیه ممکن است متحمل جهش‌های انکوژنیک خودبه‌خودی گردند که منجر به **تبدیل** انکوژنیکی آنان می‌گردد (فصل ۲۵). به چنین سلول‌هایی گفته می‌شود که از نظر انکوژنیکی تبدیل شده‌اند یا به‌طور ساده **تبدیل یافته**[1] هستند و قادرند به‌طور نامحدودی رشد کنند. سلول‌هایی که طول عمر نامحدودی دارند نامیرا خوانده می‌شوند و رده سلولی[2] نامیده می‌شود.

رده سلولی Hela اولین رده سلولی انسانی می‌باشد که در سال ۱۹۵۲ برای اولین بار از سرطان بدخیم (کارسینومای) دهانه رحم جداسازی شد. کشت سلول اولیه نرمال انسانی به ندرت به سمت رده سلولی تغییر می‌گردند اما سلول‌های جوندگان متحمل این تغییر می‌گردند. بعد از این‌که سلول‌های جوندگان چند نسل در محیط کشت رشد داده شدند، متحمل پیری می‌گردند (شکل b ۳۱ـ۹). در این مدت بسیاری از سلول‌ها رشد خود را متوقف می‌کنند، اما اغلب یک سلول تبدیل شده به وجود می‌آید که قابلیت تقسیم سریع دارد و با تقسیم سریع خود محیط کشت را پر می‌کند. رده سلولی که از چنین سلول تغییر یافته مشتق می‌گردد در محیط مغذی به‌طور نامحدودی رشد خواهد کرد.

سلول‌های نامیرا صرفنظر از منبع سلولی اغلب دارای توالی‌های غیرطبیعی DNA در کروموزوم خود می‌باشند. علاوه بر این تعداد کروموزوم‌های موجود در این سلول‌ها معمولاً بیشتر از سلول نرمالی است که از آن نشأت گرفته است و با هر تقسیم سلولی تعداد کروموزوم‌ها بیشتر می‌گردد. یک استثناء معروف رده تخمدان همسترچینی (CHO) و مشتقات آن می‌باشد که از پروژنیتورهای اولیه خود تعداد کروموزوم کمتری دارد. به سلول‌هایی که تعداد کروموزوم‌های آنها غیرطبیعی می‌باشد آنوپلوئیدی گفته می‌شود.

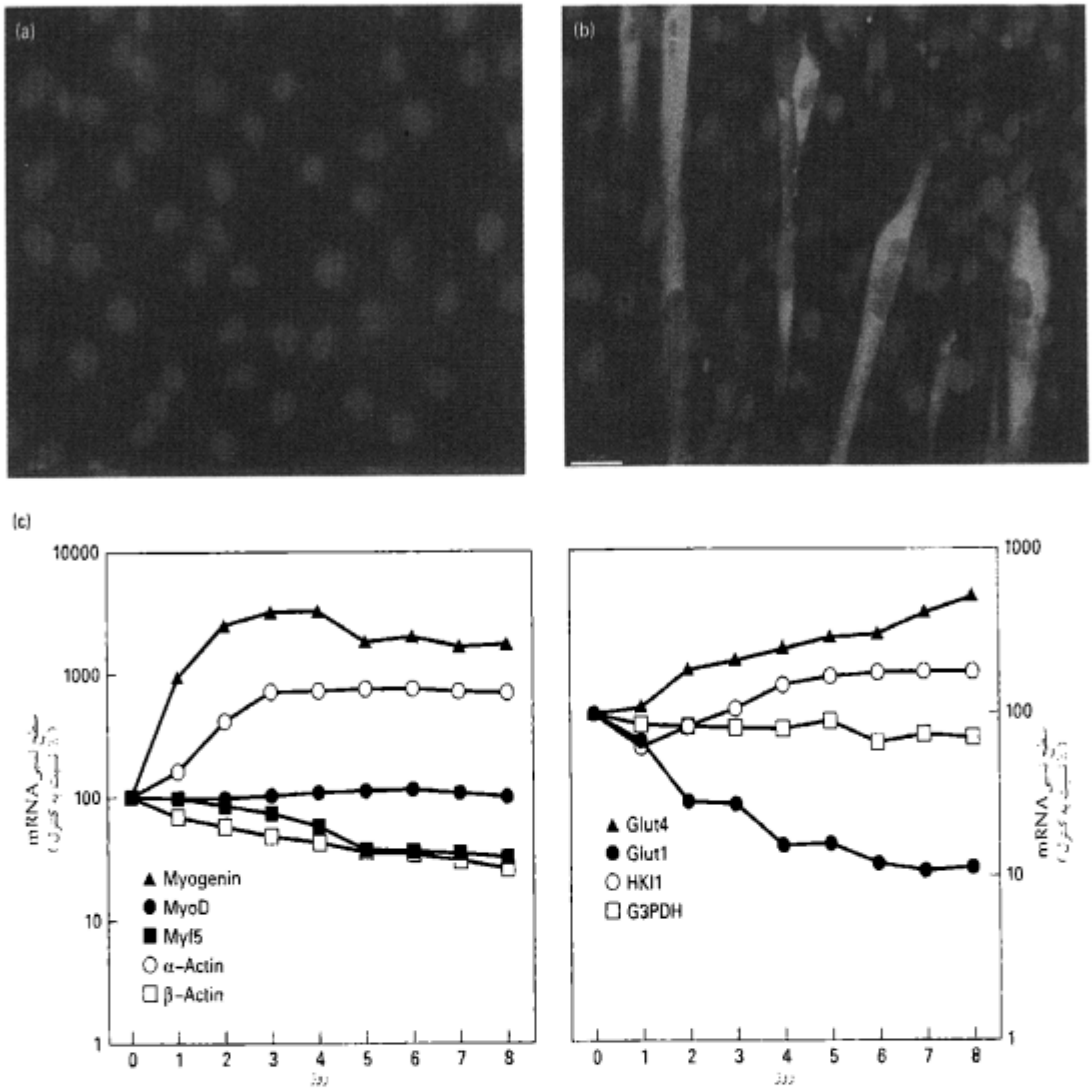
بعضی از رده‌های سلولی در محیط کشت تمایز می‌یابند

بسیاری از رده‌های سلولی برخی از ویژگی‌های عملکردی سلول‌های تمایز یافته‌ای راکه از آنها مشتق شده‌اند، از دست داده‌اند. این سلول‌های نسبتاً تمایز نیافته مدل‌های ضعیفی برای بررسی فعالیت نرمال انواع ویژه‌ای از سلول‌ها می‌باشد. در این زمینه چندین رده سلولی بسیار تمایز یافته وجود دارد که بسیاری از ویژگی‌های سلول‌های نرمال تبدیل نشده را نشان می‌دهند. این رده‌ها شامل سرطان کبد انسانی (هپاتوما) رده HepG2 می‌باشد که بسیاری از پروتئین‌های سرمی سنتز شده توسط سلول‌های نرمال کبدی (هپاتوسیت‌ها) را می‌سازند و در مطالعاتی که هدف آنها تعیین فاکتورهای رونویسی تنظیم‌کننده سنتز پروتئین‌های کبدی می‌باشد، کاربرد دارد.

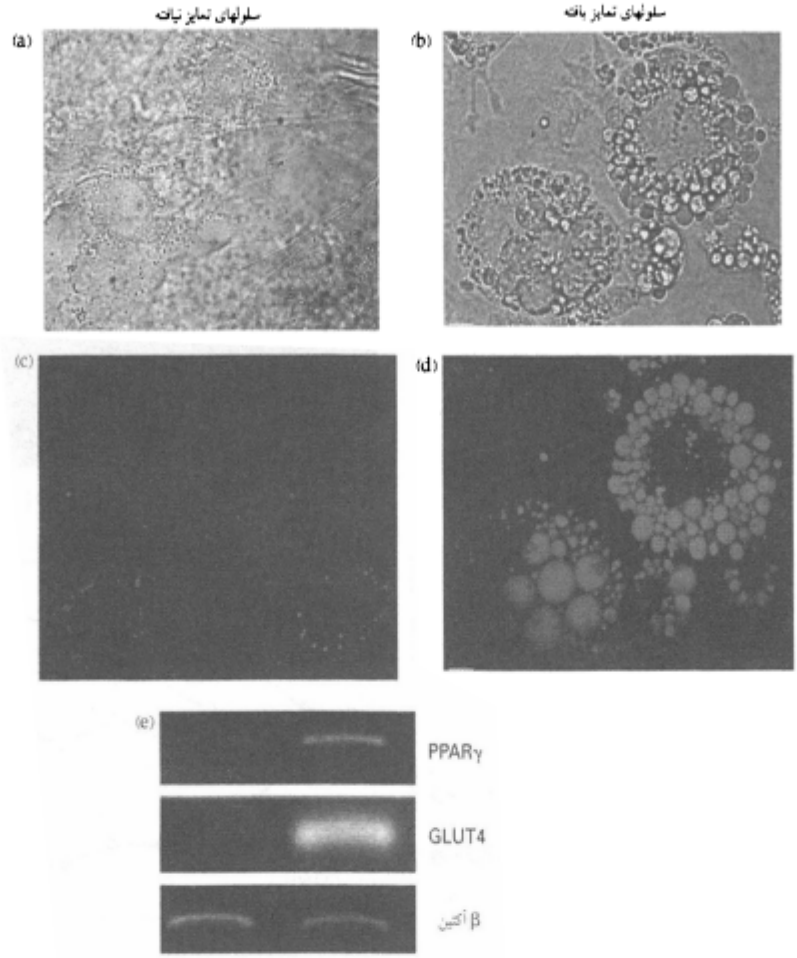
برای زیست‌شناسان سلولی و تکوینی رده‌های سلولی که بدون کسب ویژگی‌های سلول تمایز یافته رشد کنند، مهم می‌باشند. زیرا می‌توان آنها را در محیط کشت متفاوت به یک نوع سلول ویژه تمایز داد. به دلیل این که در محیط کشت تعداد بیشتری از این سلول را می‌توان همزمان به یک مرحله تمایزی القا کرد اغلب در مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مثالی از این مورد رده میوبلاست تبدیل شده موشی می‌باشد که سلول‌های C2C12 نامیده می‌شوند. این سلول‌ها که از عضله موش بالغ مشتق می‌شوند سریعتر تقسیم می‌یابند و وقتی در محیط کشت غنی از فاکتورهای رونویسی قرار داده می‌شوند هیچ کدام از پروتئین ویژه عضلانی را القا نمی‌کنند. وقتی که در محیط کشتی با غلظت پایین فاکتورهای رشد قرار داده می‌شود سلول‌ها تقسیم سلولی را متوقف می‌کنند. وقتی که این سلولها در کنار هم بصورت ردیفی قرار می‌گیرند تقسیم نمی‌شوند و با یکدیگر ترکیب شده و مانند میوبلاست‌های اولیه، میوتیوب‌های چندهسته‌ای بزرگ تشکیل می‌دهد و سنتز پروتئین‌های ویژه عضلانی را القا می‌کنند (شکل ۳۲ـ۹). به دلیل این‌که می‌توان یک ژن خاص را در این سلول‌ها وارد یا حذف کرد و تأثیر آن را در تمایز می‌توان مشاهده کرد، این سلول‌ها در کشف نقش بسیاری از فاکتورهای رونویسی در تکوین عضله بسیار ارزشمند می‌باشند (فصل ۲۲).

1- Transformed 2- Cell line



▲ **شکل تجربی ۹ـ۳۲ تمایز سلول‌های C2C12، رده‌ای از میوبلاست‌های موشی تبدیل شده، در محیط کشت.** (a) سلول‌های C2C12 در محیط کشت دارای سرم گوساله جنینی که غلظت بالایی از فاکتورهای رشد میتوژنیک دارد تکثیر می‌یابند اما تمایز نمی‌یابند. (b) بعد از این‌که سلول‌های C2C12 در محیط کشت دارای سرم اسبی قرار گرفتند، بسیاری از این سلول‌ها به یکدیگر آمیخته شده و تشکیل سین‌سیتیای چند هسته دادند، چون این سرم دارای غلظت پایینی از فاکتورهای رشد می‌باشد، سین‌سیتیای چند هسته‌ای زنجیر سنگین میوزین عضلانی را بیان می‌کند. این پروتئین توسط آنتی‌بادی فلورسانس سبز ویژه آن پروتئین شناسایی می‌شود. رنگ‌آمیزی DNA با رنگ آبی DAPI هسته‌ها را نشان می‌دهد. میله‌ها ۲۰μm می‌باشد. c) در طی تمایز سلول‌های C2C12، سطح mRNAهای خاصی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که در این نمودار نشان داده شده است. برای مثال mRNAهای میوژنین (فاکتور رونویسی ویژه عضله)، αـ اکتین (از اجزای اصلی فیلامنت‌های انقباضی، و انتقال‌دهنده گلوکز GLUT4 (که تنها در سلول‌های عضلانی و چربی یافت می‌شود) به میزان ۵ تا ۵۰ برابر افزایش می‌یابند. در مقابل، mRNAهای کدکننده پروتئین‌های ویژه رشد سلول‌ها مثل انتقال‌دهنده گلوکز GLUT1 و βـ اکتین کم‌تر شده‌اند. سایر mRNAها مثل آنزیم گلیکولیزی گلیسرآلدهید ۳ـ فسفات دهیدروژناز (G3PDH) تغییر نمی‌کند. mRNAها با استفاده از رونوشت‌ساز معکوس به cDNA تبدیل شدند و سپس cDNA ویژه آنها، توسط واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) کمّی تکثیر شد. مقادیر RNA حاصله نسبت به مقادیر موجود در سلول‌های در حال رشد نرمال‌سازی شد.



▲ **شکل تجربی ۳۳ـ۹ (شکل رنگی) رده پیش آدیپوسیت 3T3L1 در محیط کشت می‌تواند به آدیپوسیت تمایز یابد و mRNAهای ویژه آدیپوسیت را بیان کند.** پیش آدیپوسیت‌های شبه فیبروبلاستی 3T3-L1 موجود در محیط دارای سرم (c,a) به مدت ۸ روز به محیط کشت تمایزی دارای انسولین، هورمون استروئیدی دگزامتازون، و ایزوبوتیل متیل‌زانتین، که یک مهارکننده cAMP فسفودی‌استراز می‌باشد، انتقال داده شدند (d,b). (b,a) تغییرات مورفولوژیکی قابل ملاحظه سلولهای تمایز یافته توسط میکروسکوپ تداخلی افتراقی (DIC) نشان داده شده است. (d,c) رنگ‌آمیزی قرمز چربی (Oli Red O) قطرات تری‌گلیسرید (قرمز) را در سلول‌های تمایز یافته نشان می‌دهد. (e) با آنالیز نورترن‌بلات بیان دو ژن کلیدی آدیپوسیت که فاکتور رونویسی PPARγ و انتقال‌دهنده گلوکز حساس به انسولین GLUT4 در سلول‌های تمایز یافته 3T3-L1 را کد می‌کند (سمت راست ژل) نشان داده شده است. این ژن‌ها در سلول‌های پیش آدیپوسیت 3T3-L1 را تمایز نیافته دیده نمی‌شود (سمت چپ ژل). β- اکتین به عنوان کنترل میزان برابر RNA برابر می‌باشد.

به‌طور مشابه رده سلولی پیش آدیپوسیت 3T3-L1 موشی در محیط کشت از نظر مورفولوژی مشابه فیبروبلات رشد می‌کند. زمانی که آنها در محیط دارای انسولین و دگزامتازون (هورمون استروئیدی گلوکوکورتیکوئید) قرار گرفتند، سلول‌های 3T3-L1 همزمان به آدیپوست (سلول‌های چربی) متمایز می‌گردند که با تجمع چربی داخل سلولی (شکل a-d ۳۳ـ۹) و القا mRNA ویژه سلول چربی (شکل e ۳۳ـ۹) همراه است. به دلیل این‌که سلول‌های چربی اولیه در محیط کشت تقسیم نمی‌یابند از این رده‌های سلولی به‌طور وسیع در مطالعات بیوشیمیایی، مولکولی و سلولی به منظور درک عملکرد و تکوین سلول‌های چربی استفاده می‌کنند.

همان‌طور که در فصل ۱۹ اشاره شد، بسیاری از انواع سلولی وقتی که در نزدیک سلول‌های دیگر باشند فعال هستند. مثال کلیدی از این نوع سلول‌ها، لایه‌های صفحه مانند بافت اپی‌تلیال است، که **اپی‌تلیا** (مفردش **اپی‌تلیوم** است) نامیده می‌شود، و سطوح خارجی و داخلی اندامها را می‌پوشاند.

به‌طور معمول سطوح مشخص یک سلول اپی‌تلیال قطبی،

سطوح **رأسی**[1] (بالا)، **بازال**[2] (پایه یا پایین) و **لاترال**[3] (جانبی) نامیده می‌شود (شکل ۸ـ۱۹ را ملاحظه کنید). سطح بازال معمولاً با ماتریکس خارج سلولی در تماس است و **بازال لامینا** نامیده می‌شود. ترکیب و عملکرد آن در بخش ۳ـ۱۹ بحث شده است. انواع اتصالات سلولی موجب برقراری ارتباط بین سلول‌های اپی‌تلیال می‌گردد و آنها را به بازال لامینا متصل می‌کند. در مطالعه تشکیل و عملکرد سلول‌های اپی‌تلیال سلول‌هایی بنام سلول‌های *Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)* مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقتی که این سلول‌ها در ظروف ویژه رشد داده می‌شوند صفحه‌ای به ضخامت یک سلول (تک لایه) از سلول‌های اپی‌تلیال شبه کلیه‌ای قطبی تشکیل می‌شود (شکل ۳۴ـ۹). اهمیت پروتئین‌های دخیل در تشکیل ارتباطات سلولی میان سلول‌های MDCK توسط مهار تولید آنها توسط RNAهای کوچک مهارکننده (siRNAها) بررسی شده است، این پدیده مداخله RNA[4] نامیده می‌شود (شکل ۴۵ـ۵ را ملاحظه کنید).

عیب اساسی سلول‌های کشت داده شده این است که آنها در محیط طبیعی خودشان قرار ندارند و بنابراین فعالیت آنها توسط سایر سلول‌ها و بافت‌های مشابه موجود در بدن موجود زنده، تنظیم نمی‌گردد. برای مثال، انسولین تولید شده توسط پانکراس تأثیر مهمی در متابولیسم کبدی گلوکز دارد؛ با وجود این، این مکانیسم تنظیمی در جمعیت سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) استخراج شده و کشت داده شده در محیط کشت عمل نمی‌کند. به علاوه همان‌طور که قبلاً گفته شد، توزیع سه‌بعدی سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی در اطراف سلول نیز در شکل و رفتار سلول تأثیر دارد. به دلیل این‌که محیط سلول‌های کشت داده شده از محیط «طبیعی» آن متفاوت است ویژگی‌های این سلول‌ها تحت تأثیر عوامل متعددی است. بنابراین باید همیشه در نتیجه‌گیری‌های حاصله از آزمایشات انجام شده بر روی سلولهای جداسازی شده و کشت داده شده در آزمایشگاه و تعمیم آن به سلولهای بافت‌های پیچیده و موجودات زنده بایستی دقت کافی اعمال گردد.

سلول‌های هیبریدکه هیبریدوما نامیده می‌شوند مقدار فراوانی آنتی‌بادی مونوکلونال تولید می‌کنند

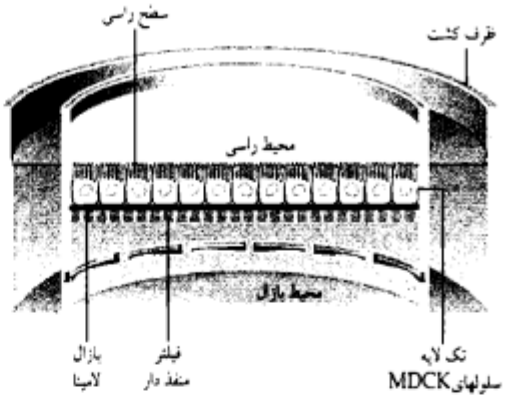
علاوه بر اینکه از سلول‌های کشت داده شده به عنوان مدل‌های تحقیقات استفاده می‌شود از آنها می‌توان به عنوان «کارخانه‌های» تولیدکننده پروتئین‌های ویژه استفاده کرد. در فصل ۵، ما بحث کردیم که چگونه با وارد کردن ژن‌های کدکننده انسولین، فاکتورهای رشد و سایر پروتئین‌های مفید دارویی به سلول‌های باکتریایی یا یوکاریوتی می‌توان از آنها بعنوان تولیدکننده پروتئین‌های ویژه استفاده کرد. (شکل ۳۱ـ۵ و ۳۲ـ۵ را ملاحظه کنید). در اینجا سلول‌های ویژه، که ابزارهای تجربی مورد استفاده در بسیاری از تحقیقات زیست‌شناسی سلولی هستند را، به منظور تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بررسی می‌کنیم. به‌طور روزافزونی، این نوع آنتی‌بادی‌ها در اهداف تشخیصی و درمانی که در فصول بعدی بحث می‌کنیم استفاده می‌شوند.

به منظور درک موضوع تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ما نیاز داریم که به‌طور خلاصه چگونگی تولید آنتی‌بادی توسط پستانداران را مرور کنیم، جزئیات بیشتر در مورد تولید آنتی‌بادی در فصل ۲۴ آورده شده است. هر لنفوسیت B تولیدکننده آنتی‌بادی توانایی تولید یک نوع آنتی‌بادی واحد دارد که می‌تواند به‌طور ویژه به ساختار شیمیایی ویژه بر روی مولکول آنتی‌ژن (که شاخص[5] یا **اپی‌توپ** نامیده می‌شود) متصل گردد. هرگاه به جانوری آنتی‌ژنی تزریق گردد، بسیاری از سلول‌های لنفوسیت B تحریک شده و رشد کرده و آنتی‌بادی‌هایی را ترشح می‌کنند، که آن آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند. هر لنفوسیت B فعال شده، در طحال یا گره‌های لنفاوی تشکیل کلونی از سلول‌ها می‌کنند که تولید آنتی‌بادی یکسانی می‌کند که آنتی‌بادی مونوکلونال نامیده می‌شود. به دلیل این‌که آنتی‌ژن‌های طبیعی دارای چندین اپی‌توپ می‌باشند، مجاورت جانور با یک آنتی‌ژن معمولاً باعث تحریک تشکیل کلونی‌های متعدد لنفوسیت B می‌گردد که هر کدام آنتی‌بادی‌های متفاوتی را تولید می‌کنند. مخلوط حاصله، آنتی‌بادی‌هایی هستند که اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند و پلی‌کلونال نامیده می‌شود. این آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در خون گردش می‌نمایند و می‌توان آنها را به صورت مجموعه‌ای استخراج کرد.

اگرچه آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برای بسیاری از آزمایشات متعدد مفید می‌باشند اما برای بسیاری از آزمایشات و کاربردهای پزشکی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضروری می‌باشد. متأسفانه به خاطر دو دلیل مهم تخلیص بیوشیمیایی هیچ یک از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از خون امکان‌پذیر نمی‌باشد غلظت هر آنتی‌بادی بسیار کم است، و تمامی آنتی‌بادی‌ها ساختار مولکولی پایه مشابهی دارند (شکل ۱۹ـ۳ را ملاحظه کنید).

به دلیل این‌که طول عمر لنفوسیت‌های B محدود است، کشت

1- Apical
2- Basal
3- Lateral
4- RNA interference
5- Determinant



▲ **شکل تجربی ۳۴ـ۹ سلول‌های Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) که در ظروف ویژه کشت داده می‌شود سیستم آزمایشی مفیدی در مطالعه سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد.** زمانی که سلول‌های MDCK بر روی یک فیلتر غشایی منفذدار که یک سمت آن با کلاژن و سایر اجزای بازال لامینا پوشیده شده است رشد داده می‌شود اپی‌تلیوم قطبیده تشکیل می‌دهند. با استفاده از ظروف کشت ویژه که در این‌جا نشان داده شده است، محیط کشت بخش‌های مختلف فیلتر را (بخش رأسی و بازال تک لایه) می‌توان به‌طور تجربی دستکاری کرد و حرکت مولکول‌ها از عرض لایه را نشان داد. اتصالات سلولی که سلول‌ها را به یکدیگر مرتبط می‌سازد تنها در زمانی که محیط رشد حاوی Ca^{2+} کافی باشد، تشکیل می‌گردد.

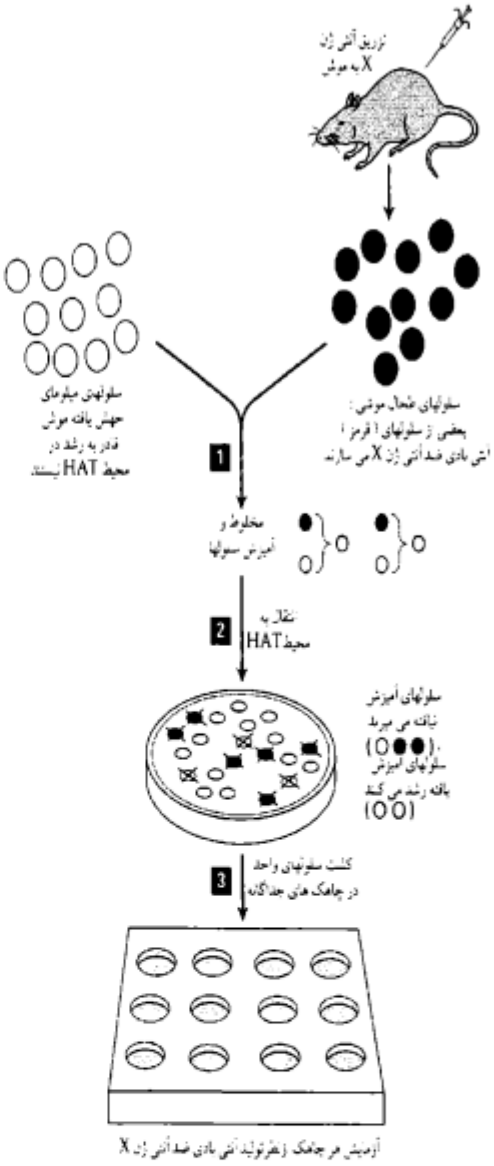
اولیه آنها جهت تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مفید نمی‌باشد. بنابراین گام اول در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال تولید سلول‌های نامیرای سازنده آنتی‌بادی می‌باشد. این نامیرایی با آمیزش لنفوسیت‌های B نرمال یک حیوان ایمنی شده، با یک سلول ترانسفورم شده، محقق می‌گردد. لنفوسیت‌های نامیرای تولید شده که سلول‌های میلوما نامیده می‌شوند توانایی تولید و سنتز پلی‌پپتید سنگین (H) و سبک (L) آنتی‌بادی‌ها را ندارند (شکل ۱۹ـ۳ را ملاحظه کنید). در هنگام ادغام، غشای پلاسمایی دو سلول با یکدیگر ترکیب شده و باعث می‌شود سیتوزول و اندامک‌های آنها به هم آمیخته گردد. ادغام سلولی با استفاده از گلیکوپروتئین‌های معین ویروسی یا پلی‌اتیلن‌گلیکول صورت می‌گیرد. بعضی از سلول‌های ادغام یافته متحمل تقسیم سلولی شده و هسته‌های آنها با یکدیگر آمیخته می‌شود. سلول‌های حاصله (سلول‌های هیبرید زنده) تک هسته‌ای هستند که دارای کروموزوم‌های هر دو «والد» می‌باشند. در اثر ادغام دو سلول که از نظر ژنتیکی متفاوت هستند سلول هیبریدی تولید می‌شود که دارای ویژگی‌های جدید می‌باشد. برای مثال ادغام یک سلول میلومایی با یک سلول سازنده آنتی‌بادی طحال رت یا موش سلول هیبریدی بنام **هیبریدوما** تولید می‌کند که تکثیر یافته و ایجاد کلونی می‌نماید. سلول‌های هیبریدوما همانند سلول‌های میلوما، سریعتر رشد می‌کند و نامیرا هستند. هر هیبریدوما آنتی‌بادی مونوکلونالی می‌سازد که توسط والد لنفوسیت B آن کد می‌گردد.

گام دوم در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال جداسازی یا گزینش سلول‌های هیبریدوما از سلول‌های والد ادغام نیافته یا آنهایی که با خودشان ادغام یافته‌اند، می‌باشد. در عمل گزینش معمولاً مخلوط سلول‌ها را در محیط کشت ویژه‌ای به نام **محیط گزینش**[1] کشت می‌دهد و سلول‌های هیبریدوما به دلیل کسب ویژگی‌های جدید رشد می‌کنند. هر گاه سلول‌های میلوما دارای جهش مهارکننده یک مسیر متابولیکی باشند، محیط گزینش برای آنها کشنده خواهد بود اما برای لنفوسیت‌های همراه آنها که فاقد جهش هستند کشنده نیست. در سلول‌های هیبرید نامیرا، ژن فعال لنفوسیت نبود فراورده ژن جهش یافته را جبران می‌کند و بنابراین سلول‌های هیبریدوما در محیط گزینش قادر به رشد خواهند بود. از آنجایی که لنفوسیت‌های استفاده شده در آمیزش نامیرا نیستند و تقسیم سریع ندارند، تنها سلول‌های هیبریدوما در محیط گزینش قادر به رشد و تکثیر خواهند بود و بنابرین به راحتی می‌توان آنها را از مخلوط اولیه سلولی جدا کرد.

شکل ۳۵ـ۹ روش عمومی تولید و گزینش هیبریدوما را نشان می‌دهد. در این مورد، لنفوسیت‌های B نرمال موجود در نمونه سلول‌های طحال با سلول‌های میلومایی که در محیط کشت *HAT*، محیط کشت گزینشی رایج، قادر به رشد نیستند آمیخته می‌شوند. بدلایلی که در بالا اشاره شد تنها هیبریدهای میلوما ـ لنفوسیت می‌توانند در محیط HAT رشد کنند. بنابراین، محیط گزینشی باعث تفکیک سلول‌های هیبریدوما از دو نوع سلول والدی و سلول‌هایی که با خودشان آمیزش یافته‌اند، می‌گردد. سرانجام کلون‌های هیبریدومای گزینش شده به منظور تولید آنتی‌بادی دلخواه مورد آزمایش قرار می‌گیرند؛ هر کلونی که آنتی‌بادی تولید می‌کند در محیط کشت بزرگ رشد داده می‌شود و از آن مقدار فراوانی آنتی‌بادی مونوکلونال خالص به دست می‌آید.

از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌طور معمول در کروماتوگرافی تمایلی به منظور جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها از مخلوط آنها استفاده می‌گردد (شکل ۳۷ـ۳ c را ملاحظه کنید). هم‌چنین از آنها در نشاندار کردن و بنابراین مکان‌یابی پروتئین خاص در سلول‌های ویژه

1- Selection medium



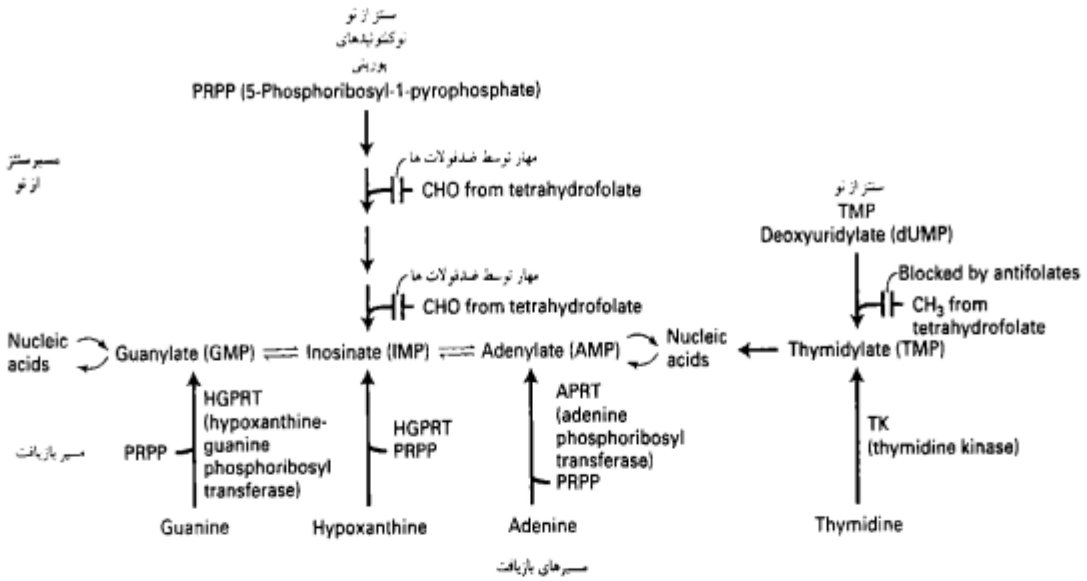
یک بافت یا سلول‌های کشت داده شده به کمک تکنیک‌های میکروسکوپ ایمونوفلورسانس یا در اجزای سلولی ویژه به کمک ایمونوبلاتینگ استفاده می‌شود (شکل ۳ـ۳۸ را ملاحظه کنید). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هم‌چنین ابزارهای مهم تشخیصی و درمانی در پزشکی می‌باشند. به عنوان مثال، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونالی که به سموم مترشحه از پاتوژن‌های باکتری متصل می‌گردد و آن را غیرفعال می‌کند، در درمان بیماری‌ها استفاده می‌گردد. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دیگری وجود دارند که به پروتئین‌های سطحی سلول‌های توموری متصل می‌شوند. از این آنتی‌بادی‌های ضد تومور به‌طور وسیع در درمان سرطان استفاده می‌شود، مثلاً از آنتی‌مونوکلونال ضد رسپتور جهش یافته Her2، که در بعضی از سرطان‌های سینه بیشتر بیان می‌گردد، در درمان آن استفاده می‌گردد (فصل ۱۶، شکل ۱۸ـ۱۶ را ملاحظه کنید).

◀ شکل تجربی ۳۵ـ۹ (شکل رنگی) تولید هیبریدومای سازنده آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه پروتئین ویژه به کمک آمیزش سلولی و گزینش سلولی. مرحله (❶): سلول‌های میلومای نامیرا که فاقد HGPRT، آنزیم ضروری برای رشد در محیط HAT، هستند با سلول‌های طحال تولیدکننده آنتی‌بادی حیوانی که با آنتی‌ژن X ایمن‌سازی شده است، آمیزش داده می‌شود. سلول‌های طحال می‌توانند HGPRT بسازند. مرحله (❷): زمانی که سلول‌ها در محیط HAT قرار گرفتند سلول‌های آمیزش نیافته و سلول‌هایی که خود آمیزش یافته‌اند نمی‌توانند رشد کنند: سلول‌های جهش یافته میلوما به دلیل این‌که نمی‌توانند پورین‌ها را از طریق مسیر متابولیکی «بازیافت[1]» وابسته به HGPRT بسازند (شکل ۳۶ـ۹ را ملاحظه کنید)، و سلول‌های طحال به دلیل این‌که در محیط کشت طول عمر محدودی دارند. بنابراین تنها سلول‌های آمیزش یافته حاصل از سلول میلوما و سلول طحالی می‌توانند در محیط HAT زنده بمانند و کلونی به نام کلونی هیبریدوما تولید کنند. هر هیبریدوما تنها یک آنتی‌بادی واحدی را می‌سازد. مرحله (❸): با آزمایش کلون‌ها می‌توان آنهایی که آنتی‌ژن X را شناسایی می‌کنند تعیین کرد. بعد از این‌که هیبریدومای سازنده آنتی‌بادی موردنظر تعیین گردید می‌توان با کشت مقدار انبوهی از آن آنتی‌بادی تولید کرد.

در جداسازی سلول‌های هیبرید به‌طور معمول محیط HAT استفاده می‌گردد

اصول گزینش HAT نه تنها در درک چگونگی جداسازی سلول‌های هیبریدوما مهم می‌باشد بلکه در درک روش‌های رایج گزینشی مثل گزینش سلول‌های بنیادی جنینی (ES) که در تولید موش‌های ناک‌آوت شده، استفاده می‌شود نیز مهم می‌باشد (شکل ۴۰ـ۵ را ملاحظه کنید). محیط HAT دارای هیپوگزانتین (پورین)، آمینوپترین، و تیمیدین می‌باشد. بسیاری از سلول‌های جانوری می‌توانند نوکلئوتیدهای پورین و پیریمیدین را از ترکیبات ساده کربنی و نیتروژنی سنتز کنند (شکل ۳۶ـ۹، بالا). آنتاگونیست‌های اسید فولیک شامل آمتوپترین و آمینوپترین این مسیرهای بیوشیمیایی را مهار می‌کنند؛ آنها با گروه‌های متیل و فرمیل آزاد شده از اسید تتراهیدروفولیک، در مراحل اولیه سنتز گلیسین، مونوفسفات‌های نوکلئوزیدی پورین و تیمیدین مونوفسفات تداخل ایجاد می‌کنند. این داروها به دلیل این‌که واکنش‌های تتراهیدروفولات، (شکل فعال اسید

1- Salvage



▲ **شکل ۳۶ـ۹ (شکل رنگی) مسیرهای از نو و بازیافت سنتز نوکلئوتیدها.** سلول‌های جانوری می‌توانند طی مسیرهای از نو (آبی) نوکلئوتیدهای پورینی (AMP، GMP، IMP) و تیمیدیلات (TMP) را از ترکیبات ساده‌تر سنتز کند. همان‌طور که در قسمت فوقانی دیاگرام نشان داده شده است در چند واکنش نیاز به انتقال گروه متیل یا فرمیل (CHO) از شکل فعال تتراهیدروفولات (مثل N^5، N^{10} ـ متیلن تتراهیدروفولات) وجود دارد. ضد فولات‌هایی مثل آمینوپترین و آمتوپترین، فعال شدن مجدد تتراهیدروفولات را مهار کرده و از سنتز پورین و تیمیدیلات ممانعت می‌کند. بسیاری از سلول‌های جانوری هم‌چنین می‌توانند در تولید بازهای پورین یا نوکلئوزیدها و تیمیدین از مسیرهای بازیافت (قرمز) بهره‌مند شوند. هر گاه این پیش‌سازها در محیط کشت باشند، علیرغم حضور ضد فولات‌ها، سلول‌های نرمال رشد خواهند کرد. علی‌رغم این، سلول‌هایی که فاقد یکی از آنزیم‌های ـ HGPRT، APRT، یا TK مسیرهای بازیافت می‌باشند، در محیط دارای ضد فولات‌ها رشد نخواهند کرد.

فولیک)، را مهار می‌کنند به ضد فولات‌ها[1] معروف می‌باشند.

با وجود این بسیاری از سلول‌ها به دلیل داشتن آنزیم‌هایی که نوکلئوتیدهای ضروری را از بازهای پورین و تیمیدین سنتز می‌کنند به ضد فولات‌ها مقاوم هستند (شکل ۳۶ـ۹ پایین). دو آنزیم درگیر در مسیرهای بازیافت نوکلئوتیدی[2]، آنزیم‌های تیمیدین کیناز (TK) و هیپوگزانتین ـ گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) می‌باشند. سلول‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها در محیط HAT که دارای پورین و تیمیدین هستند توانایی رشد دارند در حالی که سلول‌هایی که فاقد این آنزیم‌ها هستند قادر به این عمل نیستند.

سلول‌هایی که دارای جهش در TK هستند و نمی‌تواند TK فعال تولید کنند را می‌توان به دلیل مقاوم بودن به آنالوگ سمی تیمیدین ۵ ـ بروموداکسی یوریدین جداسازی نمود. سلول‌هایی که دارای TK هستند این ترکیب را به ۵ ـ برموموداکسی یوریدین مونوفسفات تبدیل می‌کنند که آن هم به نوبه‌خود به وسیله سایر آنزیم‌ها به یک نوکلئوزید تری‌فسفات تبدیل می‌گردد. آنالوگ تری‌فسفات توسط آنزیم DNA پلیمراز وارد DNA می‌شود و بدین طریق اثر سمی خود را بر جای می‌گذارد. این مسیر در جهش‌یافته‌های TK^- مهار می‌شود و بنابراین به اثرات سمی ۵ ـ بروموداکسی یوریدین مقاوم هستند. به‌طور مشابه می‌توان سلول‌هایی که فاقد آنزیم HGPRT هستند، مثل رده‌های سلولی میلومای $HGPRT^-$ که در تولید هیبریدوما استفاده می‌گردد، به دلیل مقاوم بودن به آنالوگ گوانین ۶ ـ تیوگوانین جداسازی نمود. اگرچه در محیط HAT آمینوپترین از سنتز از نو[3] پورین‌ها و TMP ممانعت می‌کند سلول‌های نرمال می‌توانند رشد کنند زیرا تیمیدین موجود در محیط به داخل سلول رفته و توسط TK به TMP تبدیل می‌گردد و هیپوگزانتین توسط HGPRT به پورین‌های قابل استفاده تبدیل می‌گردد. به عبارت دیگر، سلول‌های TK^- و $HGPRT^-$ بدلیل اینکه آنزیم مسیر بازیافت‌کننده را ندارند در محیط HAT نمی‌توانند رشد کنند. با وجود این، هیبریدهای

1- Antifolates

2- Nucleotide salvage pathways

3- de novo

حاصله از آمیزش این دو جهش‌یافته ژن نرمال TK را از والد $HGPRT^-$ و ژن نرمال HGPRT را از والد TK^- به ارث می‌برند. بنابراین هیبریدها می‌توانند هر دو آنزیم مسیر بازیافت را تولید کرده و می‌توانند در محیط HAT رشد کنند.

نکات کلیدی بخش ۹.۵

جداسازی، کشت، و تمایز سلول‌های جانداران پرسلولی

- با استفاده از فلوسایتومتری می‌توان سلول‌ها را براساس نوری که پخش می‌کنند یا فلورسانسی که نشر می‌کنند، شناسایی کرد. دسته کننده سلول فعال شده توسط فلورسانس (FACS) در جداسازی انواع سلول‌های مختلف مفید می‌باشد (شکل ۲۸ـ۹ و ۲۹ـ۹).
- برای رشد سلول‌های مهره‌داران، محیط کشت باید دارای اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب، و پپتیدها یا فاکتورهای رشد پروتئینی باشد که فاکتورهای رشد را سرم تأمین می‌کند.
- بیشتر سلول‌های مهره‌داران تنها زمانی که به یک پایه با بار منفی متصل شوند، رشد می‌کنند، پایه با اجزا ماتریکس خارجی سلول پوشیده می‌شود.
- سلول‌های اولیه که مستقیماً از بافت جانوری مشتق می‌شود در محیط کشت پتانسیل رشد محدودی دارند و ممکن است به سوش سلولی تبدیل گردند (شکل ۳۱ـ۹ را ببینید). بعضی از سلول‌های اولیه به سلول‌های ویژه تمایز می‌یابند.
- سلول‌های تبدیل شده که از تومورهای جانوری مشتق می‌شوند یا به‌طور خودبه‌خودی از تبدیل شدن سلول‌های اولیه به وجود می‌آیند، در محیط کشت به‌طور نامحدودی رشد می‌کند و تشکیل رده‌های سلولی را می‌دهند.
- بسیاری از رده‌های سلولی را می‌توان در محیط کشت به سلول‌های عضلانی، چربی، اپی‌تلیال و سلول‌های دیگر تمایز داد. این سلولها به‌طور وسیعی در مطالعات زیست‌شناسی استفاده می‌شود (اشکال ۳۰ـ۹، ۳۲ـ۹ و ۳۳ـ۹ را ملاحظه کنید).
- با آمیزش سلول نامیرای میلوما و لنفوسیت B، سلول هیبریدی تولید می‌شود که می‌تواند به‌طور نامحدودی تکثیر یافته و تشکیل کلونی به نام کلونی هیبریدوما نماید (شکل ۳۵ـ۹ را ملاحظه کنید). به دلیل این‌که هر سلول لنفوسیت B تولید آنتی‌بادی‌های ویژه برای یک شاخص آنتی‌ژنی (اپی‌توپ) می‌کند، یک سلول هیبریدوما تنها می‌تواند آنتی‌بادی مونوکلونال سنتز شده توسط لنفوسیت B والدی را بسازد.
- محیط HAT محیط رایج در جداسازی سلول‌های هیبریدوما و انواع سلول‌های هیبرید دیگر می‌باشد.

چشم‌اندازی به آینده

میکروسکوپ نوری یک ابزار مهم در زیست‌شناسی سلولی می‌باشد. می‌توان تصاویری از میانکنش بین پروتئین‌ها، حرکات، یا مکانیک فرایندهای مختلف سلولی بدست آورد. با استفاده از نشانه‌ها و برچسب‌های فلورسنت می‌توان ۵ یا ۶ نوع مولکول مختلف را همزمان مشاهده کرد. هر چقدر پروتئین‌های بیشتری نشاندار گردد، میانکنش‌های پیچیده میان پروتئین‌ها و اندامک‌های داخل سلولی بهتر مطالعه خواهند شد.

پیشرفت‌های اخیر در میکروسکوپ نوری زمینه‌های جدیدی در تحقیقات باز کرده است. به عنوان مثال با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس دو فوتونی می‌توان پروتئین‌های فلورسنت (مثل GFP که توسط ژن گزارشگر بیان می‌شود) را در نمونه‌های بافتی ضخیم مشاهده کرد. با استفاده از این تکنولوژی ویژگی‌های سلول‌ها را به‌طور جداگانه می‌توان در بافت‌های جانوری زنده بررسی نمود.

اگرچه حد تفکیک میکروسکوپ نوری تقریباً (۲۰۰nm) ۰/۲μm می‌باشد با استفاده از میکروسکوپ‌های جدید فلورسانسی مثل STED (تخلیه نشر تحریکی) می‌توان دو شیئی فلورسنت را تا حد ۲nm≃ تفکیک کرد. برای مثال، ما دیدیم که وزیکول‌های سیناپتیک کوچک (قطر ۴۰nm) که به‌طور متراکم بسته‌بندی شده‌اند را نمی‌توان با میکروسکوپ‌های فلورسانس موجود تفکیک نمود. علی‌رغم این، به کمک STED می‌توان این وزیکول‌ها را مشاهده کرد. هم‌چنین این تکنیک محققان را قادر می‌سازد که مولکول‌های پروتئینی فلورسنت واحدی را در غشاها یا اندامک‌های تخلیص شده شناسایی کنند. یک نوع دیگر میکروسکوپ فلورسانس، بنام میکروسکوپ فلورسانس انعکاسی درونی کلی TIR[1] به محققان اجازه می‌دهد که پروتئین‌های نشاندار با تک فلوروکروم را در سطح سلول‌های زنده شناسایی کنند.

با گسترش و بهبود تکنولوژی کشت سلول می‌توان هم سلول‌های اولیه و هم رده‌های کشت داده شده را به‌طور طبیعی‌تر و در ژل‌های سه‌بعدی مولکول‌های ماتریکس خارج مطالعه کرد. با این تکنیک می‌توان سلول‌هایی مثل سلول‌های کبدی و تولیدکننده هورمون را چند روز به حالت تمایز یافته حفظ کرد و بسیاری از انواع آزمایشات را روی آنها انجام داد. همچنین مهندسان زیستی، بافت‌های مصنوعی را براساس ساختار سه‌بعدی لایه‌های سلول‌های مختلف سنتتیک ساخته‌اند. چنین بافت‌های مصنوعی جایگزین

1- Total internal reflection (TIR)

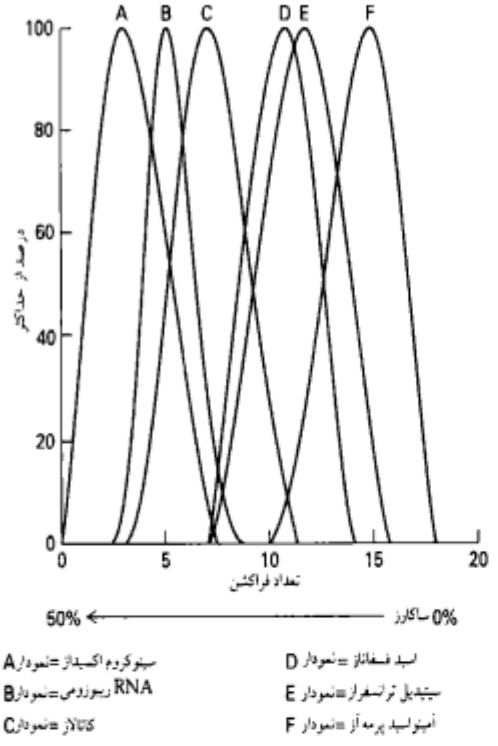
مناسبی برای بافت‌های آسیب‌دیده بیماران، افراد جراحت‌دیده و پیر خواهد شد.

به‌طور موازی، به منظور کشت تعداد محدود سلول در مقادیر میکرولیتری بر روی اسلاید شیشه‌ای، که از چاهک‌ها یا کانال ریز ساخته شده است، محققان از تکنیک‌های ریز سازنده[1] پیشرفته استفاده خواهند کرد. به کمک این تکنیک، مواد و محلول‌ها در مقادیر نانولیتر استفاده خواهد شد؛ سپس پاسخ‌های سلولی را می‌توان توسط میکروسکوپ نوری شناسایی کرد و توسط نرم‌افزارهای پردازش تصویر آنالیز نمود. در این نوع مطالعات می‌توان سلول‌ها را با میلیون‌ها ترکیب شیمیایی مختلف غربالگری کرد؛ بنابراین کشف داروهای جدید، شناسایی فنوتیپ سلول‌های جهش یافته (مثل سلول‌های توموری) و ابداع مدل‌های جامع فرایندهای سلولی را تسهیل خواهد کرد. بنابراین پیشرفت‌های موجود در مهندسی زیستی نه تنها درک ما را از فعالیت سلول‌ها و بافت‌ها بیشتر می‌کند بلکه کیفیت سلامت انسانی را نیز افزایش می‌دهد.

سرانجام، میکروسکوپ الکترونی ابزار مهم و برجسته‌ای در مطالعه ساختار ماشین‌های چند پروتئینی در in vitro و in situ می‌باشد. با روش‌های توموگرافی و روش‌های بازسازی شده خودکار می‌توان مدل‌های ساختاری برای پروتئین‌های سلولی که نمی‌توان آنها را با کریستالوگرافی اشعه X تعیین کرد، فراهم کرد. به کمک مدل‌های سه‌بُعدی مولکول‌های موجود در سلول می‌توان میانکنش‌های بیوشیمیایی دقیق بین پروتئین‌ها را بررسی و تفسیر کرد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

سلول‌های کبدی موش هموژنیزه شده و هموژنژات تحت سانتریفیوژ تعادلی با شیب چگالی ساکارز قرار گرفت. فراکشن‌های حاصله از این شیب ساکارز از لحاظ مولکول‌های مارکر (مانند مولکول‌های محدود به اندامک خاص) بررسی شدند. نتایج این آزمایش و بررسی در شکل نشان داده شده است. مولکول‌های مارکر عملکردهای زیر را دارند: سیتوکروم اکسیداز آنزیمی است که در فرایندی که ATP در تجزیه هوازی و کامل گلوکز و اسیدهای چرب تولید می‌شود، درگیر است؛ RNA ریبوزومی بخشی از ریبوزوم‌های سنتزکننده پروتئین می‌باشد؛ کاتالاز، تجزیه پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند؛ اسید فسفاتاز باعث هیدرولیز استرهای مونوفسفری در pH اسیدی می‌شود؛ سیتیدیل ترانسفراز در بیوسنتز فسفولیپیدها درگیر است؛ و آمینو اسید پرمئاز حامل غشایی اسیدهای آمینه از عرض غشا می‌باشد.



a) مولکول‌های مارکر را نامگذاری کنید و شماره فراکشنی که غالباً در هر یک از اجزای زیر فراوان می‌باشد، ذکر کنید: لیزوزوم‌ها؛ پراکسیزوم‌ها؛ میتوکندری‌ها؛ غشای پلاسمایی؛ شبکه اندوپلاسمی خشن؛ شبکه اندوپلاسمی صاف.

b) آیا شبکه اندوپلاسمی خشن چگالی بیشتر یا کمتری نسبت به شبکه اندوپلاسمی صاف دارد؟ چرا؟

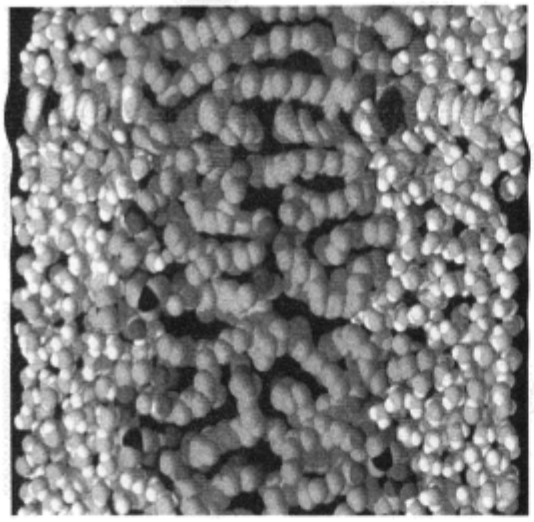
c) یک روش متفاوتی پیشنهاد کنید که در آن بتوان مشخص کرد که کدام فراکشن در کدام اندامک غنی است.

d) چگونه اضافه کردن یک دترجنت به هموژنات که با حل کردن لیپیدها و اجزای پروتئینی باعث تجزیه غشا می‌شود، نتایج شیب چگالی تعادلی را تغییر می‌دهد؟

1- Microfabrication

فصل ۱۰

ساختار غشاهای زیستی



مدل مولکولی یک فسفولیپید دو لایه‌ای که به وسیله آب احاطه شده است و توسط محاسبات دینامیک مولکولی تعیین شده است

رئوس مطالب

۱-۱۰ غشاهای زیستی: ترکیبات لیپیدی و سازمان‌یابی ساختاری

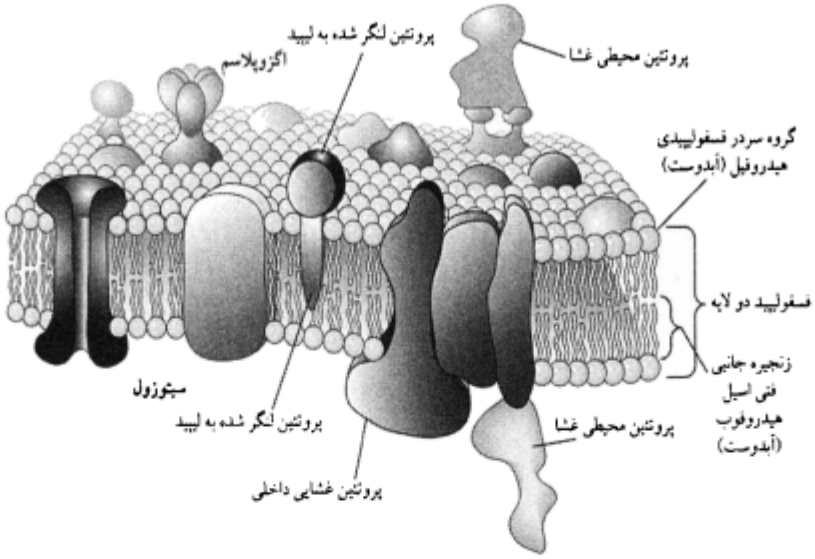
۲-۱۰ غشاهای زیستی: ترکیبات پروتئینی و اعمال پایه

۳-۱۰ فسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و کلسترول: سنتز و حرکت درون سلولی

غشاها در جنبه‌های گوناگون عملکرد و ساختمان سلول دخالت دارند. **غشاء سلولی** مشخص‌کننده سلول بوده و محیط خارج را از داخل جدا می‌کند. غشاء هم چنین در یوکاریوت‌ها مشخص‌کننده اندامک‌های داخل سلولی از قبیل هسته و لیزوزوم است. این غشاهای زیستی دارای یک طرح پایه (یک فسفولیپید دو لایه) هستند اما آنها بی‌حرکت نبوده و عملکردشان مانع مبادله از یک قسمت نمی‌شود. هر غشاء سلولی دارای گروهی از پروتئین‌هاست که باعث انجام عملکردهای اختصاصی زیادی می‌شوند (شکل ۱-۱۰).

پروکاریوت‌ها به عنوان کوچک‌ترین و ساده‌ترین سلول‌ها دارای طول ۱-۲ μm هستند و توسط یک غشا پلاسمایی احاطه شده‌اند. آنهادر اغلب موارد شامل اجزاء داخل سلولی دارای غشاء نیستند (شکل ۱-۲a را ملاحظه کنید). بنابراین این غشاء پلاسمایی تک لایه شامل صدها نوع مختلف از پروتئین‌هاست که مناسب عملکردهای سلول هستند. برای نمونه بعضی از این پروتئین‌ها سنتز ATP و شروع همانندسازی DNA را کاتالیز می‌کنند. انواع زیادی از **پروتئین‌های حامل غشایی** وجود دارند که غشاء را قادر به ورود یون‌های خاص، قندها، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها از راهی به جز غشای دولایه‌ای نفوذناپذیر به سلول کرده و محصولات متابولیکی خاص را خارج می‌کنند.

غشای پلاسمایی در سلول‌های یوکاریوت (شکل ۲-۱۰) محلی برای تولید ATP یا سنتز DNA نیست. غشای پلاسمایی یوکاریوت‌ها دارای پروتئین‌های حامل غشایی فراوانی است که باعث می‌شود یون‌ها و مولکول‌های کوچک به طور انتخابی وارد و خارج شوند. **گیرنده‌ها** در غشاء پلاسمایی پروتئین‌هایی هستند که سلول را قادر به شناسایی بسیاری از پیام‌های شیمیایی فرستاده شده از سلول‌های مجاور توسط محیط می‌کنند. این پیام‌ها تنظیم‌کننده متابولیسم می‌باشند و یا به طور خاص در طول رشد برای بیان ژن لازم هستند. خاصیت دیگر پروتئین‌های غشاء پلاسمایی این است که سلول را قادر به چسبیدن به سلول‌های دیگر و به ترکیبات ماتریکس خارج سلولی فیبری احاطه کننده می‌کند. بسیاری از پروتئین‌های غشاء پلاسمایی به ترکیبات **اسکلت سلولی** می‌چسبند. این ترکیبات مجموعهٔ فشرده‌ای از رشته‌های پروتئینی بوده و در سیتوزول نفوذ کمی داشته و باعث حافظت مکانیکی غشاء سلولی می‌شوند. این میانکنش‌ها برای پذیرفتن شکل خاص سلول و برای انواع بسیاری از حرکات سلولی ضروری‌اند. غشاء پلاسمایی در سه بُعد خمیده، پیچ خورده و منعطف می‌شود. بعضی از قطعاتی که به سوی داخل کشیده می‌شوند اجزایی از محیط خارج سلولی هستند که در وزیکول‌های داخل سلولی قرار می‌گیرند (شکل ۲-۹ را ملاحظه کنید). در ویروس‌هایی همچون HIV که از سمت غشاء سلول به سوی خارج جوانه می‌زنند خودشان با یک تکه از غشاء پلاسمایی که حاوی پروتئین خاص ویروسی است پوشیده شده‌اند (شکل ۳-۱۰).

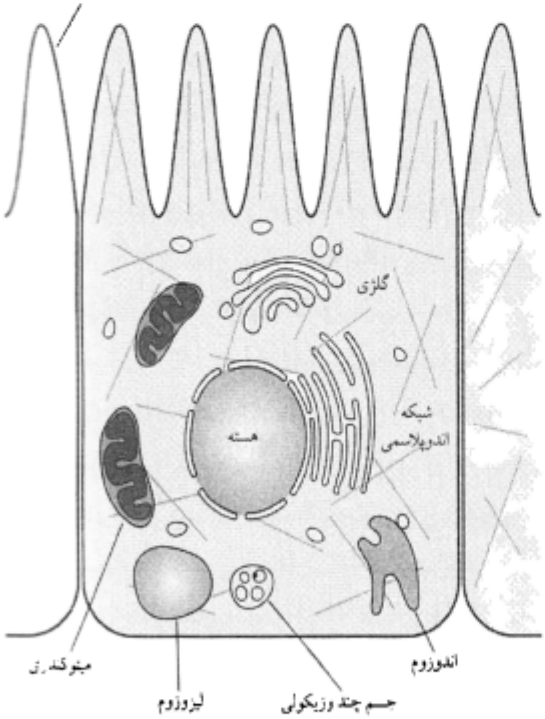


▲ **شکل ۱-۱۰ مدل موزاییک سیال از غشاء پلاسمایی** یک فسفولیپید دولایه‌ای با ضخامت حدود ۳nm که یک طرح پایه از همه غشاهای سلولی است. پروتئین‌های غشایی به هر غشاء سلولی مجموعه‌ی واحدی از عملکردها را می‌دهند. پروتئین‌های سراسری فاصله غشاء دولایه‌ای را طی می‌کنند و اغلب به صورت دایمر یا الیگومرهایی با نظم زیاد هستند. پروتئین‌های متصل شده توسط لیپید به یک لایه غشاء توسط یک زنجیره هیدروکربنی طویل که به طور کووالان اتصال یافته است متصل می‌شوند. پروتئین‌های محیطی توسط میانکنش‌های غیرکووالانسی با پروتئین‌های سراسری یا لیپیدهای غشایی ارتباط برقرار می‌کنند.

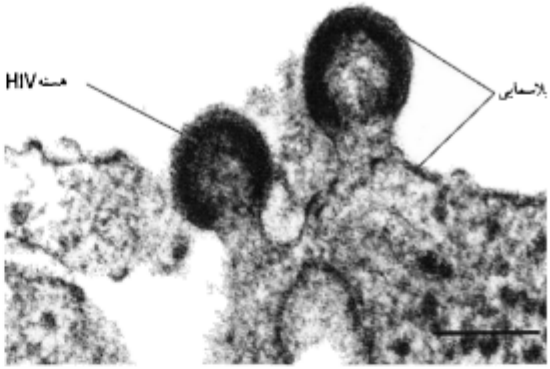
هر اندامک در سلول یوکاریوتی (شکل ۲-۱ و ۲-۱۰ و ۴-۱۰) شامل پروتئین‌های تکمیلی منحصر به فردی است که تعدادی از آنها در غشاء قرار دارند و بقیه در محیط آبکی فضای داخلی، یعنی لومن قرار گرفته‌اند و این پروتئین‌ها اندامک را قادر به انجام عملکردهای خاص سلولی می‌کنند.

برای مثال pH داخلی لیزوزوم، که یک اندامک حاوی آنزیم‌های تجزیه کننده زیادی است در حدود ۵ است. در مقابل pH سیتوزولی و قسمت‌های محلول سیتوپلاسم ۷/۲ است. غشای لیزوزوم شامل پمپ‌های هیدروژنی مصرف‌کننده ATP است که انرژی هیدرولیز پیوندهای فسفوانیدریدی ATP را برای پمپ پروتون از سیتوزول به لومن برای کاهش pH مورد استفاده قرار می‌دهند.

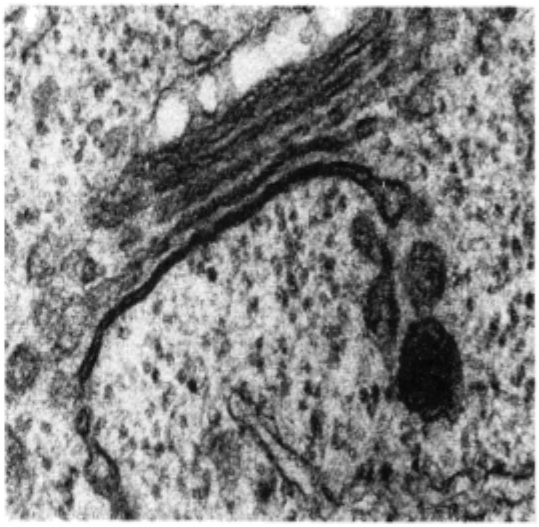
ما توضیح غشاهای زیستی را از بحث در مورد ترکیبات لیپیدی شروع می‌کنیم. این ترکیبات نه تنها شکل و عملکرد غشاء را تحت تأثیر قرار می‌دهند بلکه نقش مهمی در اتصال پروتئین‌ها به غشاء و تغییر در فعالیت‌های پروتئین‌های غشاء و القای پیام‌ها به سیتوپلاسم بازی می‌کنند. سپس ساختمان پروتئین‌های غشا را بحث می‌کنیم. بسیاری از پروتئین‌ها از قبیل پروتئین‌های حامل و گیرنده دارای قطعات طویلی هستند که در هسته هیدروکربنی فسفولیپید دو لایه‌ای فرو می‌روند و ما روی این گروه‌های اصلی پروتئین‌های غشایی تأکید داریم. در پایان در مورد این که چگونه فسفولیپیدها و کلسترول در



▲ **شکل ۲-۱۰: غشاهای سلولی.** غشای سلولی خارج سلول را مشخص کرده و حرکت مولکول‌ها بین سیتوزول و محیط خارج سلولی را کنترل می‌کند. انواع مختلف اندامکها و وزیکول‌های کوچکتر با غشاهای دقیقی احاطه شده‌اند که عملکردهای خاصی از قبیل بیان ژن، تولید انرژی، سنتز غشا و انتقال داخل سلولی را انجام می‌دهند.



▲ **شکل ۳-۱۰ غشای سلول‌های یوکاریوت دارای ساختار پویایی است.** یک میکروگراف الکترونی از غشا پلاسمایی یک سلول آلوده به HIV نشان می‌دهد که ذرات HIV به داخل محیط کشت جوانه می‌زنند و هسته ویروسی از سلول جوانه می‌زند و توسط یک غشا که از غشا پلاسمایی سلول مشتق شده است احاطه می‌شود.



▲ **شکل ۴-۱۰ غشاهای روی هم چیده شده از دستگاه گلژی.** به شکل غیر منظم و منحنی مانند این غشاها توجه کنید.

سلول سنتز شده و در اندامک‌ها و بسیاری از غشاها توزیع می‌شوند بحث می‌کنیم. کلسترول یک جزء اساسی غشای پلاسمایی در همه سلول‌های حیوانی است اما زیادی آن برای موجودات سمّی است.

۱-۱۰ غشاهای زیستی: ترکیب لیپیدی و سازمان‌یابی ساختاری

در فصل دو آموختیم که فسفوگلیسریدها واحدهای ساختمانی اصلی در اغلب غشاهای زیستی اند. فسفوگلیسریدها هم مثل دو گروه اصلی دیگر لیپیدهای غشایی یعنی اسفنگولیپیدها و کلسترول‌ها (شکل ۵-۱۰)، مولکول هایی آمفی‌پاتیک هستند که شامل دو قسمت با ویژگی‌های شیمیایی کاملاً متفاوتند. دم‌های هیدروکربنی زنجیره جانبی اسید چرب در فسفوگلیسریدها و فسفولیپیدها آبگریز است و قسمت نزدیک به آب یعنی گروه سر به طور قوی آبدوست بوده و تمایل دارند با مولکول‌های آب میانکنش دهند. در مقابل استروئیدهایی از قبیل استرول (به استثنای یک گروه هیدروکسیل آبدوست) به طور عمده آبگریزند. سه نوع فسفولیپید دارای ویژگیهای ضروری برای شکل دادن غشا هستند و در عملکردهای سلول نقش‌های مختلفی را بازی می‌کنند.

فسفولیپیدها به طور خود به خودی به صورت دو لایه، شکل می‌گیرند

طبیعت آمفی‌پاتیک فسفولیپیدها که هدایت کننده میانکنش‌های آن‌هاست، نقش تعیین کننده‌ای در ساختمان غشاهای زیستی دارد. وقتی یک مخلوط فسفولیپیدی به طور مکانیکی در محلولهای آبی پخش شود، فسفولیپیدها به یکی از این سه شکل مجتمع می‌شوند: **میسل‌های کروی، لیپوزوم و دو لایه فسفولیپیدی** که دو مولکول ضخیم می‌باشند (شکل ۶-۱۰). نوع ساختمانی که توسط یک فسفولیپید خالص یا مخلوطی از فسفولیپیدها شکل می‌گیرد به چندین فاکتور بستگی دارد: طول زنجیره اسید چرب، درجه اشباع آن‌ها و دما. در هر سه نوع ساختمان، اثرات آبگریزی باعث اجتماع زنجیره‌های اسید چرب و جدا شدن مولکول‌های آب از هسته می‌شود. میسل‌ها به ندرت از فسفوگلیسریدهای طبیعی شکل می‌گیرند. عموماً زنجیره‌های اسید چرب برای قرار گرفتن در داخل میسل به شدت بزرگند. بنابراین میسل‌ها در صورتی شکل می‌گیرند که یکی از دو زنجیره اسید چرب از فسفوگلیسرید به وسیله هیدرولیز حذف شود و یک لیزوفسفولیپید شکل بگیرد. عموماً شوینده‌ها و صابون‌ها در محلولهای آبی میسل‌هایی را تشکیل می‌دهند که به صورت سرسرهٔ توپی کوچکی رفتار می‌کنند. بنابراین محلولهای صابونی یک حس لغزندگی را القاکرده و ویژگی‌های لیز کنندگی دارند.

در وضعیت‌های مناسب، ترکیبات فسفولیپیدی حاضر در سلول به طور خود به خودی به صورت دو لایه فسفولیپیدی شکل می‌گیرند. هر لایه فسفولیپیدی در این ساختار لاملار، **لایه**[1] نامیده می‌شود. زنجیره‌های اسید چرب در هر لایه برخورد خود را با آب به حداقل می‌رسانند که این کار را با ردیف کردن خودشان به طور محکم با همدیگر در مرکز دو لایه و تشکیل یک هسته آبگریز که ۳-۴nm

1- Leaflet

ضخامت دارد انجام می‌دهند (شکل ۶b-۱۰). فشردگی نزدیک دم‌های غیر قطبی توسط میانکنش‌های واندروالسی بین زنجیره‌های هیدروکربنی پایدار می‌شود. پیوندهای هیدروژنی و یونی میانکنش سرهای قطبی در گروههای فسفولیپیدی با یکدیگر و با آب را پایدار می‌کنند. قطعات نازک غشای سلول‌ها توسط تترااکسید اسمیوم[1] رنگ‌آمیزی شده است. این رنگ به طور قوی به گروه سر قطبی فسفولیپیدها متصل می‌شود و توسط میکروسکوپ الکترونی ساختمان دو لایه‌ای را نشان می‌دهد (شکل ۶a-۱۰). برش عرضی از یک غشا منفرد رنگ‌آمیزی شده با تترااکسیداسمیوم به صورت یک قسمت ریل راه آهن به نظر می‌رسد: دو خط تیره نازک (کمپلکس گروه سر رنگ‌آمیزی شده) با یک منطقه شفاف یکنواخت بین این دو در حدود ۲nm (دم آبگریز).

یک دو لایه فسفولیپیدی می‌تواند ابعاد نامحدودی از میکرومتر (μm) تا میلی متر (mm) در قسمت طول یا عرض را دارا بوده و می‌تواند محتوی دهها میلیون مولکول فسفولیپیدی داشته باشد. به دلیل هسته آبگریز، دو لایه از نظر زیستی نسبت به نمکها، قندها و بعضی دیگر از مولکول‌های آبدوست کوچک نفوذناپذیر است. فسفولیپید دو لایه‌ای، واحد دو پایه ساختمانی در همه غشاهای زیستی است ولی غشاها دارای مولکول‌های دیگری (مثل کلسترول، گلیکولیپید، پروتئین‌ها) هم هستند. غشاهای زیستی دارای یک هسته آبگریزند که دو محلول آبی را از هم جدا کرده و به عنوان یک سر نفوذپذیر عمل می‌کند.

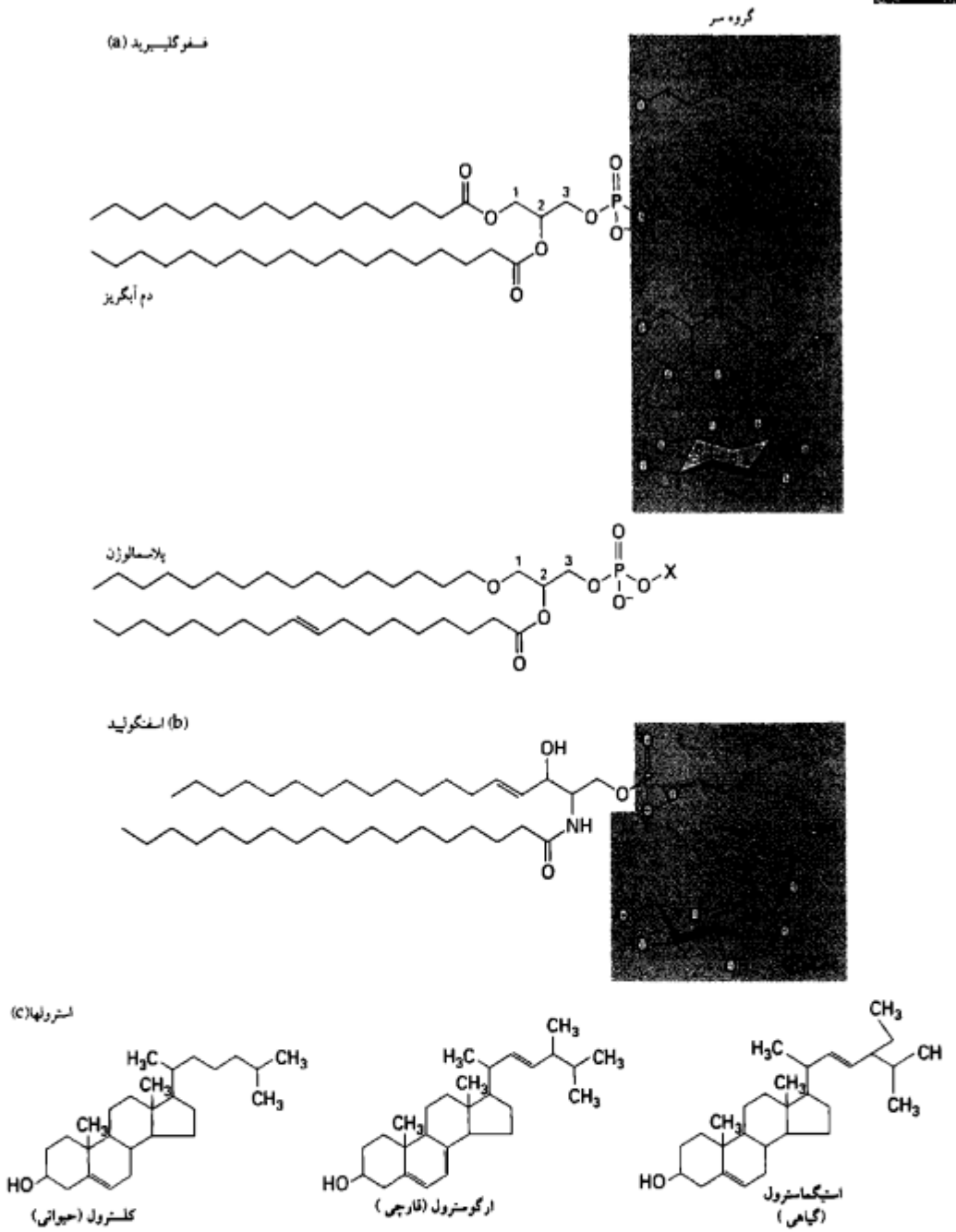
دو لایه فسفولیپیدی یک بخش پوشاننده را تشکیل می‌دهد که فضای آبی داخل را احاطه می‌کند

فسفولیپیدهای دو لایه‌ای عموماً در آزمایشگاهها با آزمایشات ساده‌ای قابل دستکاری اند. اینها همچنین به طور شیمیایی فسفولیپیدهای خالص یا مخلوطهای لیپیدی ترکیبات یافت شده در غشای پلاسمایی را مورد استفاده قرار می‌دهند (شکل ۷-۱۰). مطالعات روی این دو لایه نشان می‌دهد که آنها دارای سه ویژگی مهم می‌باشند. اول، هسته آبگریز یک سدّ نفوذناپذیر است که مانع انتشار مواد محلول در آب (آبدوست) از بین غشا می‌شود. به طور عمده این عملکرد سدّ ساده به وسیله حضور پروتئین‌های غشایی قابل تنظیم است که میانجی انتقال مولکول‌های ویژه از بین این غشای غیر قابل نفوذند. دومین ویژگی غشا، استحکام و پایداری آن است. ساختار دو لایه‌ای به وسیله میانکنش‌های آبگریز و واندروالس بین زنجیره‌های لیپیدی حفظ می‌شود. حتی اگر محیط آبی خارج سلول به میزان زیادی از نظر قدرت یونی و pH تغییر کند غشای دو لایه‌ای ویژگی‌های خود را به طور قوی حفظ می‌کند. سوم اینکه همه دو لایه‌ای‌های فسفولیپیدی به طور خود به خودی ترکیبات پوشاننده‌ای را تشکیل می‌دهد که فضاهای آبی داخل را از بیرون جدا می‌کند. یک لبه از یک فسفولیپید دو لایه که در شکل ۶b-۱۰ نشان داده شده است با هسته هیدروکربنی از دو لایه که در معرض محلول آبی قرار گرفته است ناپایدار است؛ زنجیره‌های جانبی اسیدهای چرب در معرض قرار گرفته در صورتی که در مجاورت آب نباشد و با دیگر زنجیره‌های اسید چرب (اثر آبگریز فصل ۲) احاطه شوند از نظر انرژتیکی حالت پایدارتری دارند. بنابراین در محلول آبی لبه‌های صفحات دو لایه فسفولیپیدی به طور خود بخود پوشیده می‌شود و یک دو لایه‌ای کروی که ترکیب مرکزی آبی را احاطه می‌کند، تشکیل می‌دهند. لیپوزوم نشان داده شده در شکل ۶-۱۰ یک مثال از این ساختارهاست که برش عرضی آن دیده می‌شود.

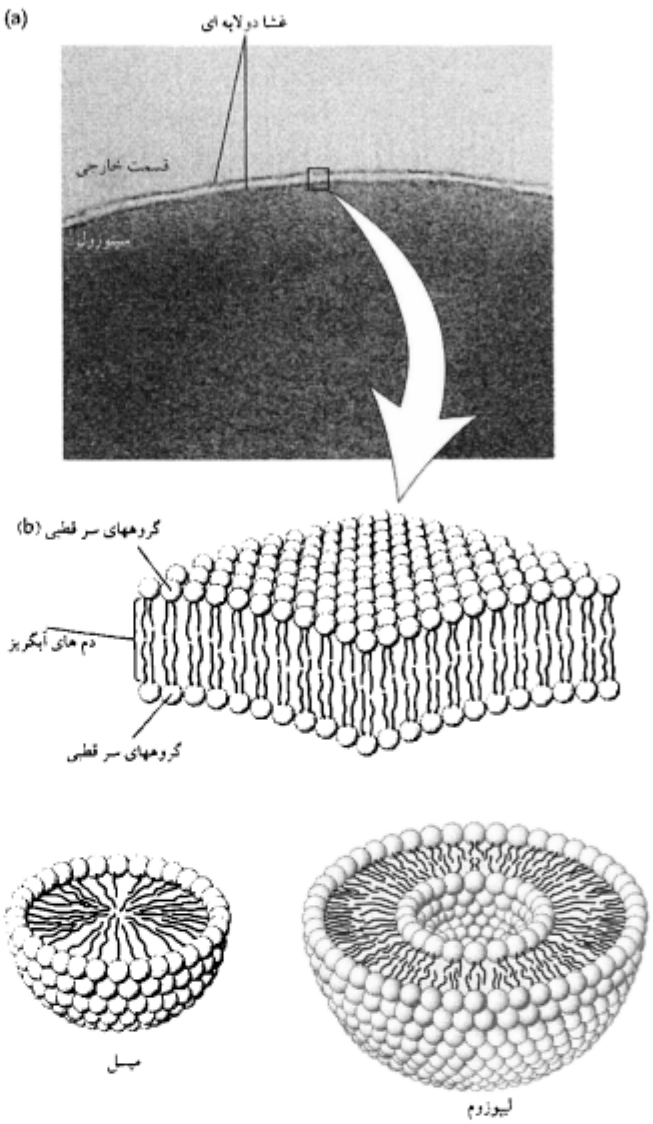
این ویژگی‌های شیمی فیزیکی از یک دو لایه فسفولیپیدی، دارای مفاهیم مهمی برای غشاهای سلولی است: غشا در یک سلول نمی‌تواند لبه هایی با زنجیره‌های اسید چرب هیدروکربنی در معرض قرار گرفته داشته باشد. همه غشاها ترکیبات خود را شبیه به طرح پایه لیپوزوم شکل می‌دهند. به علت این‌که همه غشاهای سلولی احاطه کننده یک سلول کامل یا یک ترکیب داخلی هستند بنابراین دارای یک سطح داخلی[2] (سطحی که جهت آن به سوی داخل ترکیبات است) و یک سطح خارجی[3] (سطح در تماس با محیط) است می‌باشند.

عموماً ما دو سطح از یک غشای سلولی را به صورت **سطح سیتوزولی و سطح اگزوپلاسمی** معرفی می‌کنیم. این نامگذاری در مشخص کردن معادل‌های شکل‌شناسی سطوح در غشاهای مختلف همان طور که در شکلهای ۸-۱۰ و ۹-۱۰ نشان داده شده، مفید می‌باشد. برای مثال سطح اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی دور از سیتوزول، به سوی فضای خارج سلولی یا محیط خارج است و حدود خارج سلول را مشخص می‌کند. به طور مشابه برای اندامکها و وزیکول هایی که با یک غشا منفرد احاطه شده‌اند سطح سیتوزولی در برخورد با سیتوزول است. سطح اگزوپلاسمی همیشه دور از سیتوزول است و در این مورد در خارج اندامک در مقابل فضای آبی داخلی یا لومن است. داخل یا لومن وزیکول‌ها از نظر شکل‌شناسی معادل فضای

1- Osmium tetraoxide 2- Internal face
3- External face



▲ **شکل ۵-۱۰ (شکل رنگی) سه گروه از لیپیدهای غشایی.** (a) اغلب فسفوگلیسریدها از گلیسرول ۳ - فسفات (قرمز) که شامل دو زنجیره اسید چرب استریفیه شده می‌باشد مشتق شده است که دم آبگریز و گروه سر قطبی استریفیه شده با فسفات را تشکیل می‌دهد. اسیدهای چرب از نظر طول و اشباع بودن (نداشتن پیوند دوگانه) یا نبودن (پیوندهای تکی، دوگانه یا سه گانه) می‌توانند بسیار متفاوت باشند. در فسفاتیدیل کولین (PC) گروه سر، کولین است. هم‌چنین مولکول‌های چسبیده به گروه فسفات در سه گروه عمومی دیگر فسفوگلیسرول‌ها یعنی فسفاتیدیل اتانول آمین (PE)، فسفاتیدیل سرین (PS) و فسفاتیدیل اینوزیتول (PI) نشان داده شده است. پلاسمالوژن‌ها شامل یک زنجیره اسیدچرب اشباع شده هستند که توسط پیوند استری به گلیسرول چسبیده است و دارای یک اتصال به صورت پیوند اتری هم هستند. این محتویات شبیه گروه سر در فسفوگلیسریدها هستند. (b) اسفنگولیپیدها از اسفنگوزین (قرمز) و یک الکل آمینی با یک زنجیره هیدروکربنی طویل مشتق شده‌اند. زنجیره‌های مختلف اسیدهای چرب توسط پیوند آمیدی به اسفنگوزین‌ها متصل شده‌اند. اسفنگومیلین‌ها (SM) که شامل یک گروه سر فسفوکولینی هستند جزء فسفولیپیدها به شمار می‌آیند. اسفنگولیپیدهای دیگر، گلیکولیپیدهایی با یک باقی مانده منفرد قندی یا انشعابات الیگوساکاریدی هستند که به اسکلت اسفنگوزین متصل شده‌اند. برای مثال ساده‌ترین گلیکولیپید، گلوکوزیل سر بروزید (GlcCer) است که دارای یک گلوکز در گروه سر است. (c) استرول اصلی در حیوانات (کلسترول)، قارچها (ارگوسترول) و گیاهان (استیگماسترول) از نظر ساختاری به طور جزئی با هم متفاوتند اما همه آن‌ها به عنوان اجزای کلیدی غشای سلولی به کار می‌روند ساختمان پایه استروئیدها یک هیدروکربن چهار حلقه‌ای (زرد) است. گروه منفرد هیدروکسیل معادل گروه سر قطبی در دیگر لیپیدهاست. حلقه الحاقی و زنجیره هیدروکربنی کوچک دم آبگریز را تشکیل می‌دهند.



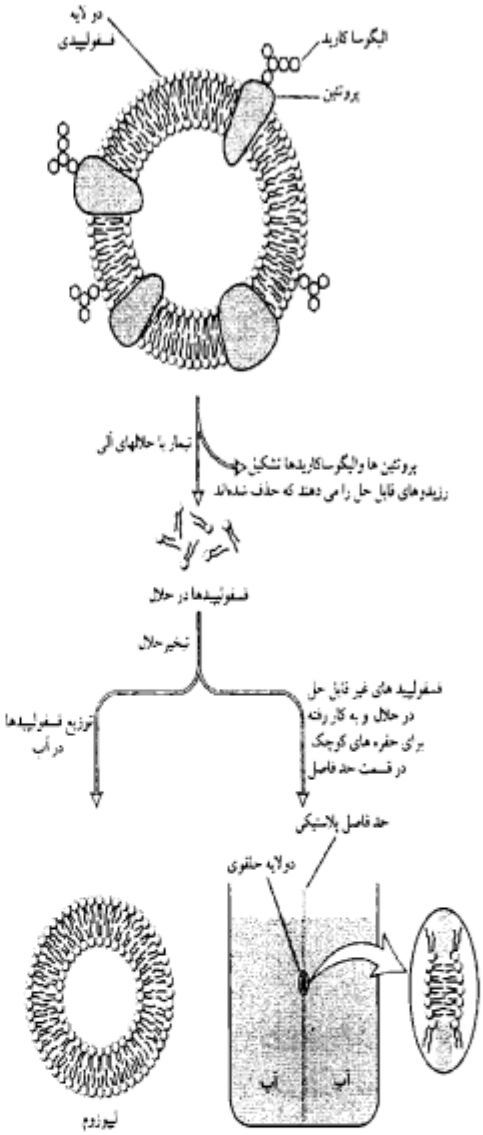
◀ شکل ۶-۱۰ ساختار دو لایه‌ای غشاهای زیستی. میکروگراف الکترونی از یک مقطع نازک سراسر یک غشای گلبول قرمز که با تتراکسید اسمیوم رنگ‌آمیزی شده است. غشا با ویژگی «قسمت ریل راه آهن» دلالت بر وجود دو لایه قطبی دارد که با ساختار دو لایه‌ای غشاهای فسفولیپیدی سازگار است. (b) تصویر شماتیک دو لایه فسفولیپیدی به صورتی که گروه قطبی به سمت خارج قرار گرفته است و از دم اسیدهای چرب آبگریز در برابر آب محافظت می‌کند. نیروی به هم پیوستن دو لایه توسط اثرات آبگریز و میانکنش‌های واندروالس بین دم اسیدهای چرب تولید می‌شود (فصل دو). (c) نمای برش عرضی از دو ساختار دیگر که به وسیله توزیع فسفولیپیدها در آب شکل گرفته‌اند. یک میسل کروی دارای یک سطح داخلی آبگریز است که به طور کامل از زنجیره‌های اسید چرب تشکیل شده است. یک لیپوزوم کروی از یک دو لایه فسفولیپیدی که یک مرکز آبی را احاطه کرده، تشکیل شده است.

خارج سلولی است و این فهم وزیکول هایی که به وسیله آندوسیتوز از غشا پلاسمایی به دست می‌آیند را ساده‌تر می‌کند. نتیجه این فرایند این است که سطح خارجی غشای پلاسمایی، سطح داخلی غشای وزیکول می‌شود و در وزیکول، سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی همان سطح سیتوزولی باقی می‌ماند (شکل ۹-۱۰ را ملاحظه کنید). دو غشای مجزا، سه اندامک هسته، میتوکندری و کلروپلاست را احاطه می‌کند که سطح اگزوپلاسمی هر غشا در برخورد با فضای بین دو غشاست. این مطلب با مراجعه به فرضیه درون همزیست[1] بهتر قابل فهم است. در فصل یک بحث شد که فرض می‌کنیم که میتوکندری و کلروپلاست در مراحل تکامل زودتر از سلول‌های یوکاریوتی به وسیله فراگیر شدن نیروی باکتری در فسفریلاسیون اکسیداتیو یا فتوسنتز به ترتیب به وجود آمده‌اند (شکل ۲۰-۶ را ملاحظه کنید.) بنابراین سطح اگزوپلاسمی غشای داخلی میتوکندری از سطح اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی باکتری اجدادی مشتق شده و سطح اگزوپلاسمی غشای خارجی میتوکندری از سطح اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی اجدادی مشتق شده که دو سطح در برخورد با فضای بین غشایی‌اند.

غشاهای طبیعی در انواع مختلف سلول‌ها شکلهای مختلفی دارند که مکمل عملکرد سلول است (شکل ۱۰-۱۰ و شکلهای ۳-۱۰ و ۴-۱۰ را ملاحظه کنید). سطح انعطاف‌پذیر و صاف غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز باعث می‌شود که آنها از بین مویرگ‌های نازک عبور کنند. بعضی سلول‌ها دارای یک غشای پلاسمایی با امتداد استوانه‌ای دراز هستند که **مژک**[2] یا **تاژک**[3] نامیده می‌شوند که به صورت شلاق مانند، زنش دارند. این حرکت باعث می‌شود مایع در سراسر سطح یک صفحه سلولی جریان یابد یا سلول اسپرم به سوی تخمک

1- Embosymbiont hypthesis

2- Cilium 3- Flagellum



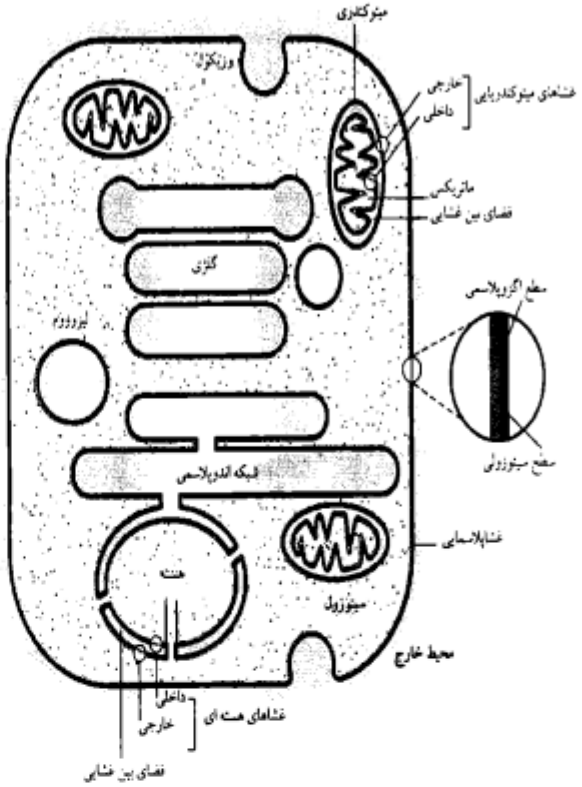
▲ **شکل تجربی ۷-۱۰ تشکیل و مطالعه دو لایه فسفولیپیدی خالص.** (بالا) برای آماده سازی غشای زیستی تیمار حلال آلی مثل مخلوطی از کلروفورم و متانول (۳:۱) لازم است که به طور انتخابی فسفولیپیدها و کلسترول‌ها را حل می‌کنند. پروتئین‌ها و کربوهیدراتها به صورت غیر قابل حل باقی می‌مانند. حلال به وسیله تبخیر حذف می‌شود. (پایین سمت چپ) اگر لیپیدها به طور مکانیکی در آب توزیع شوند آن‌ها به طور خود به خود لیپوزوم را تشکیل می‌دهند که برش عرضی آن با یک قسمت آبی در مرکز نشان داده شده است. (پایین سمت راست) یک دو لایه‌ای صاف به صورت برش عرضی نشان داده شده است که تحت یک حفره کوچک در یک قسمتی که دو فاز آبی را از هم جدا می‌کند قابل تشکیل است. از این قبیل دو لایه‌ای‌ها می‌توان برای مطالعه حرکت حل شونده از یک محلول به طرف دیگر غشا استفاده کرد.

شناکند. غشاها ساختارهای پویایی هستند. شکل ۳-۱۰ جوانه زدن ویروس HIV از سطح یک سلول انسانی را نشان می‌دهد. در سلول‌های عفونی، پروتئین‌های ویروسی خاص در غشا پلاسمایی قرار می‌گیرند و قطعات غشا پلاسمایی هسته ویروسی یا نوکلئوکپسید را می‌پوشانند که شامل ژنوم RNA ویروسی به صورت جوانه‌های ویروسی سلول است. سپس ویروس پوشیده شده با غشا از غشا پلاسمایی بیرون کشیده شده و به محیط اطراف رها می‌شود. ازغشاهای سلولی داخلی، مثل دستگاه گلژی (شکل ۴-۱۰ را ملاحظه کنید.) دائماً وزیکول‌های غشایی به سمت سیتوزول جوانه می‌زند. سپس این وزیکول‌های غشایی برای انتقال محتویات لومنی از یک اندامک به دیگری با غشاهای دیگر ادغام می‌شوند(فصل ۱۴).

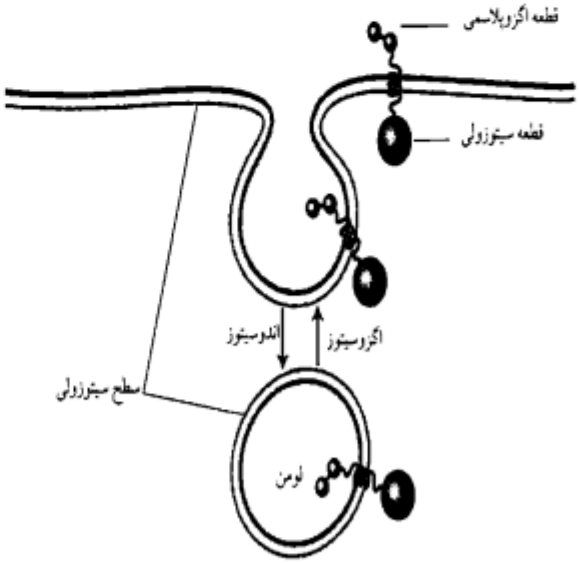
غشاهای زیستی شامل سه گروه اصلی لیپیدی می‌باشند.

همان طور که در بالا گفته شد، یک غشای زیستی از سه گروه لیپیدهای آمفی‌پاتیک تشکیل شده است: فسفوگلیسریدها، اسفنگولیپیدها و استروئیدها که از نظر ساختار شیمیایی، فراوانی و عملکرد در غشا متفاوتند.

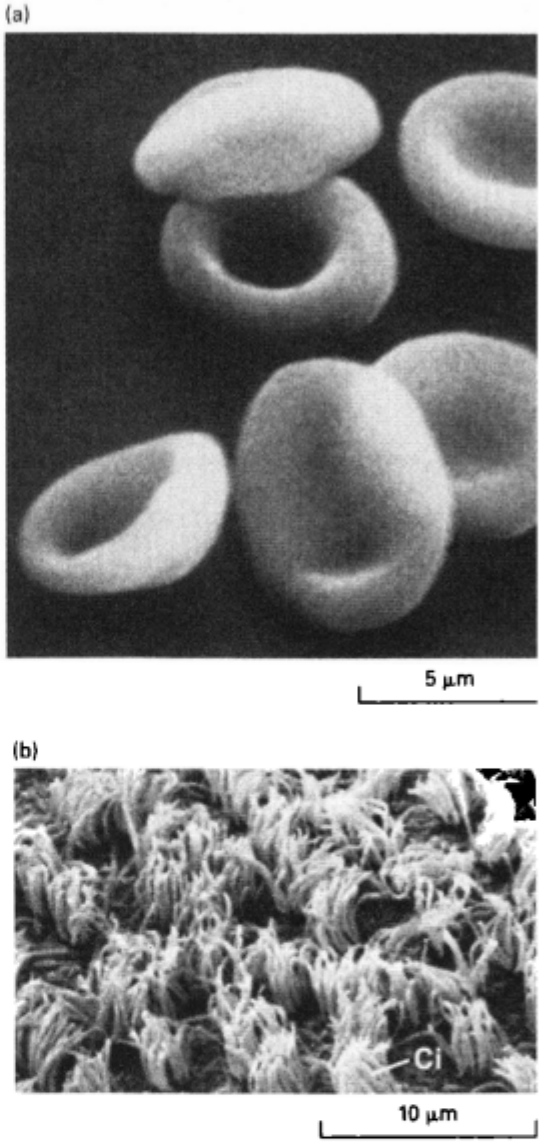
فسفوگلیسریدها فراوان‌ترین گروه لیپیدها در اغلب غشاها هستند که از گلیسرول ـ۳ـ فسفات مشتق شده‌اند (شکل ۵a-۱۰ را ملاحظه کنید). یک مولکول فسفوگلیسرید شاخص از یک دم آبگریز شامل دو زنجیره اسید چرب استریفیه شده با دو گروه هیدروکسیل در فسفات گلیسرول و یک گروه سر قطبی که به گروه فسفات چسبیده، تشکیل شده است. دو زنجیره اسید چرب در تعداد کربن (عموماً ۱۶ یا ۱۸) و درجه اشباع شدگی (صفر یا یک یا دو پیوند دو گانه) متفاوت می‌باشند. یک فسفوگلیسرید بر طبق حالت گروه سر طبقه بندی می‌شود. در فسفاتیدیل کولین‌ها که فراوان‌ترین فسفولیپید در غشای پلاسمایی هستند گروه سر شامل کولین و یک الکل با بار مثبت است که با فسفات دارای بار منفی استریفیه شده است. در فسفوگلیسیریدهای دیگر یک مولکول دارای OH مثل اتانول آمین، سرین و قندهای مشتق از اینوزیتول به گروه فسفات متصل است. گروه فسفات دارای بار منفی با گروههای باردار مثبت یا گروه هیدروکسیل در قسمت سر به طور قوی با آب واکنش می‌دهند. در pH خنثی، بعضی فسفوگلیسریدها (مثل فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین) بار الکتریکی خالص ندارند و گروه دیگر (مثل فسفاتیدیل اینوزیتول و فسفاتیدیل سرین) دارای بار الکتریکی خالص مثبت یک هستند. با وجود این گروههای قطبی سر در همه فسفولیپیدها می‌توانند با همدیگر در ساختار دو لایه‌ای مشخصی متراکم شوند.



◀ شکل ۸-۱۰ (شکل رنگی). سطوح غشا سلولی. غشای پلاسمایی یک غشای دو لایه‌ای منفرد پوشاننده سلول است. در این تصویر که به میزان زیادی شماتیک است سیتوزول در داخل (نقطه چین سبز) و محیط خارج (ارغوانی) مشخص کننده سطوح سیتوزولی (قرمز) و اگزوپلاسمی (سیاه) در دو لایه‌اند. وزیکولها و بعضی اندامکها دارای یک غشای منفردند و فضای آبی داخل آنها (ارغوانی) از نظر شکل‌شناسی معادل با خارج سلول است. سه اندامک هسته، میتوکندری و کلروپلاست (نشان داده نشده) به وسیله دو غشا احاطه شده‌اند که دو غشا توسط یک فضای بین غشایی کوچک از هم جدا شده‌اند. سطوح اگزوپلاسمی غشاهای داخلی و خارجی در اطراف این اندامکها مجاور فضای بین غشایی بین آنهاست. برای سادگی داخل غشای آبگریز در این تصویر نشان داده نشده است.



◀ شکل ۹-۱۰ (شکل رنگی). سطوح غشا سلولی در طول جوانه زنی و الحاق حفظ می‌شوند. سطوح غشایی قرمز سطوح سیتوزولی اند و سیاه سطوح اگزوپلاسمی است. در طول اندوسیتوز یک قسمت از غشای پلاسمایی به سمت سیتوزول جوانه می‌زند و سرانجام به صورت یک وزیکول مجزا در می‌آید. در طول این فرآیند سطح سیتوزولی از غشا پلاسمایی در برخورد با سیتوزول باقی می‌ماند و سطح اگزوپلاسمیک غشای وزیکول جدید در برخورد با لومن است. در طول اگزوسیتوز، یک وزیکول داخل سلولی به غشاپلاسمایی ملحق می‌شود و لومن وزیکول (سطح اگزوپلاسمی) با محیط خارج سلولی میانکنش می‌دهد. پروتئین‌هایی که در طول غشا قرار دارند در طول جوانه زدن وزیکولها و حوادث الحاقی جهت نامتقارنشان را حفظ می‌کنند به ویژه همان قسمتی که همیشه در برخورد با سیتوزول است.

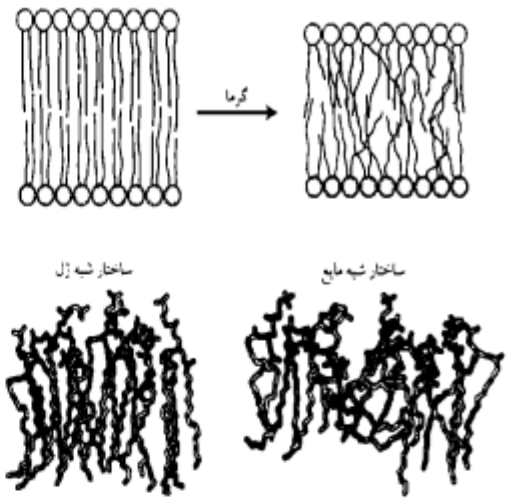


▲ **شکل ۱۰-۱۰ تنوع غشاهای زیستی در انواع مختلف سلول‌ها.** (a) همان طور که در این تصویر الکترونی می‌بینید یک غشای انعطاف‌پذیر و صاف سطح سلول‌های گلبولهای قرمز دیسکی شکل را می‌پوشاند. (b) طرح پر یا مژه (Ci) از سلول‌های اپندیمال که بطن‌های مغزی را می‌پوشانند.

پلاسمالوژن‌ها یک گروه از فسفوگلیسریدها هستند که شامل یک زنجیره اسید چرب که به کربن شماره دو گلیسرول توسط یک پیوند استری چسبیده است و یک زنجیره هیدروکربنی طویل که به کربن شماره یک گلیسرول توسط یک پیوند اتری (C-O-C) و به ندرت پیوند استری چسبیده است می‌باشد. فراوانی پلاسمالوژن‌ها در بین بافت‌ها و گونه‌ها متفاوت است اما در بافت‌هایی همچون مغز و قلب زیاد هستند. علاوه بر پایداری شیمیایی پیوند اتری در پلاسمالوژن‌ها در مقایسه با پیوندهای استری، یا اختلافات جزئی در ساختار سه بعدی شان در مقایسه با فسفوگلیسریدهای دیگر، هنوز اهمیت فیزیولوژیکی آنها شناخته نشده است.

گروه دوم از لیپیدهای غشایی **اسفنگولیپیدها** هستند. همه این ترکیبات از اسفنگوزین که یک الکل آمین دار با یک زنجیره هیدروکربنی طویل است مشتق شده‌اند و شامل یک زنجیره طویل‌اسید چرب چسبیده به یک آمیدی که به گروه آمین اسفنگوزین متصل است می‌باشد. اسفنگولیپیدها شبیه به فسفوگلیسریدها دارای یک سر قطبی حاوی فسفات هستند. در اسفنگومیلین (فراوان‌ترین اسفنگولیپید)، فسفوکولین به گروه هیدروکسیل اسفنگوزین متصل است (شکل ۵b-۱۰ را ملاحظه کنید). بنابراین اسفنگومیلین یک فسفولیپید است و ساختار کلی آن کاملاً با فسفاتیدیل کولین مشابه است. اسفنگومیلین از نظر شکل به فسفوگلیسریدها شباهت دارد و می‌تواند دو لایه‌ای‌های مخلوط با آنها تشکیل دهد. اسفنگولیپیدها دیگر، **گلیکولیپیدهای** آمفی‌پاتیک هستند که گروه سر قطبی آنها قندی است که اتصال آن از طریق گروه فسفات نیست. گلوکوزیل سربروزیدها ساده‌ترین گلیکواسفنگولیپیدها هستند که شامل یک واحد منفرد گلوکز در اتصال با اسفنگوزین است. گلیکواسفنگولیپیدهای پیچیده به نام گانگلیوزیدها دارای یک یا دو انشعاب زنجیره قندی (الیگوساکاریدها) شامل گروههای اسید سیالیک است که به اسفنگوزین متصل شده است. گلیکولیپیدها ۱۰-۲ ٪ از کل لیپیدهای غشای پلاسمایی را تشکیل می‌دهند و در بافتهای عصبی فراوان‌اند.

کلسترول و آنالوگ‌های آن سه گروه مهم از لیپیدهای غشایی و **استروئیدها** را تشکیل می‌دهند. ساختار پایه استروئیدها یک هیدروکربن چهار حلقه‌ای است. ساختار پایه استرولها در مخمر (ارگوسترول) و فیتواسترول‌های گیاهی (مثل استیگماسترول) به طور جزیی با کلسترول که استرول اصلی در حیوانات است، تفاوت دارد. (شکل ۵c-۱۰ را ملاحظه کنید). اختلافات کوچک در مسیرهای بیوسنتز و ساختار استرول‌های حیوانی و قارچی، پایه ساخت داروهای ضد قارچی هستند که به طور رایج مورد استفاده قرار می‌گیرند. کلسترول شبیه به دو استرول دیگر دارای یک هیدروکسیل جایگزین شده روی یک حلقه است. اگر چه به طور کلی کلسترول از نظر ترکیب، هیدروکربن است ولی ترکیبی آمفی‌پاتیک بوده که گروه هیدروکسیل آن می‌تواند با آب میانکنش دهد. کلسترول به طور خاص در غشا پلاسمایی سلول‌های پستانداران فراوان است اما در سلول‌های پروکاریوتی و گیاهان وجود ندارد. بیش از ۵۰-۳۰ ٪ از لیپیدهای غشاهای پلاسمایی گیاهان از استروئیدهای معین منحصر به گیاهان تشکیل شده‌اند. بین ۹۰-۵۰ درصد کلسترول در سلول‌های پستانداران



▲ **شکل ۱۱-۱۰ شکل ژل و مایع از دو لایه‌ای فسفولیپیدی.**(بالا) تصویر انتقال ژل به مایع. فسفولیپیدها با زنجیره اسید چرب اشباع طویل دارای نظم بالایی هستند و در دو لایه‌ای شبیه ژل دم‌های غیر قطبی در دو لایه هم پوشانی کمی دارند. گرما باعث می‌شود دم‌های غیر قطبی بی نظم شوند و یک انتقال از ژل به مایع در یک محدوده دمایی به شدت القا می‌شود. به موازات بی‌نظم شدن زنجیره‌ها، ضخامت دو لایه کم می‌شود. (پایین) مدل مولکولی تک لایه‌های فسفولیپیدی در حالتهای ژل و مایع که توسط محاسبات دینامیک مولکولی تعیین شده است.

در غشا پلاسمایی و وزیکولهای مرتبط حضور دارند. کلسترول و استرول‌های دیگر برای شکل دادن یک ساختار دو لایه‌ای بر روی خودشان به شدت آبگریزند. در عوض استرول‌ها در غلظت‌های یافت شده در غشاهای طبیعی بین مولکول‌های فسفولیپیدها قرار می‌گیرند و با غشاهای زیستی ترکیب می‌شوند.

کلسترول علاوه بر نقش ساختاری در غشاها، در چندین مولکول فعال زیستی مهم نقش پیش‌ساز[1] را دارد. کلسترول پیش‌ساز اسیدهای صفراوی است که در کبد ساخته می‌شوند و به حل شدن چربی‌های غذایی برای هضم و جذب در روده کمک می‌کنند. همچنین کلسترول پیش‌ساز هورمونهای استروئیدی است که به وسیله سلول‌های درون ریز (غده آدرنال، تخمدان، بیضه‌ها) تولید می‌شوند. ویتامین D نیز در پوست و کلیه از کلسترول تولید می‌شود. عملکرد کلیدی دیگر کلسترول اضافه شدن کووالانسی به پروتئین هجهوگ است که یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در رشد جنین می‌باشد (فصل ۱۶).

اغلب لیپیدها و بیشتر پروتئین‌ها در غشاهای زیستی به طور جانبی حرکت می‌کنند

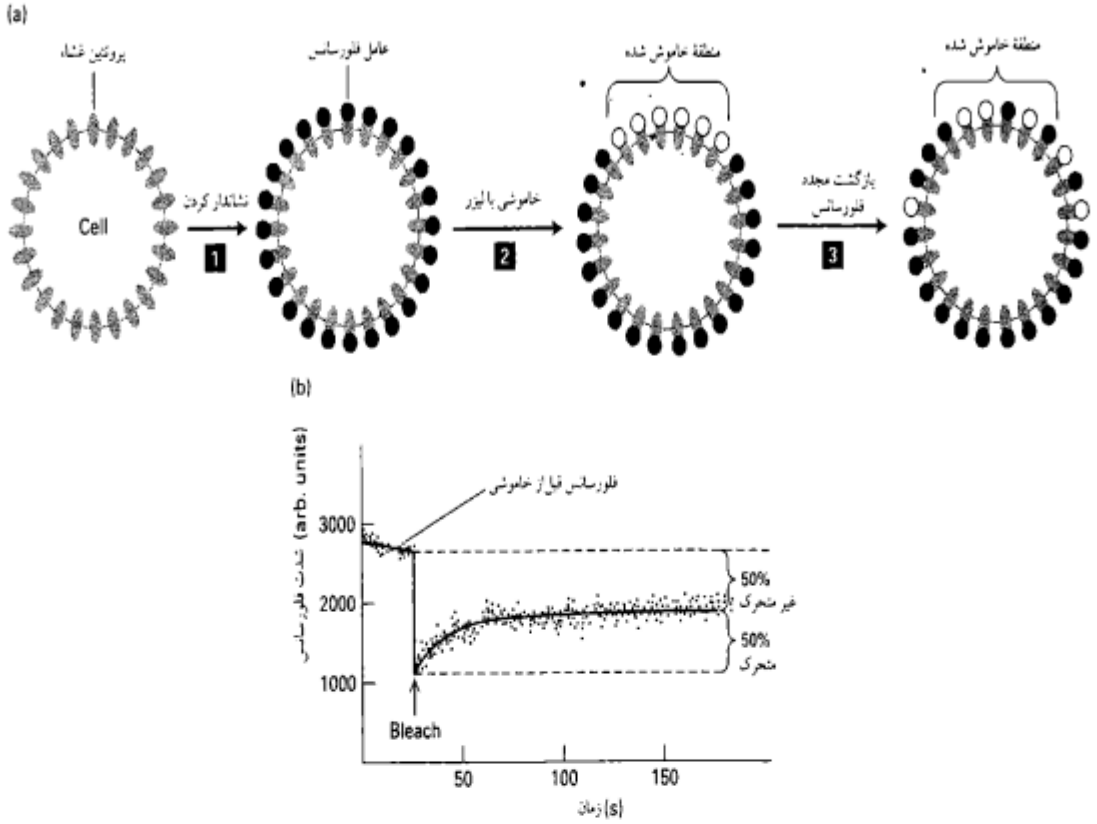
در طرح دو بعدی از یک دو لایه‌ای، حرکت دمایی باعث می‌شود مولکول‌های لیپید به طور آزادنه حول محور طولی خود بچرخند و به طور جانبی در هر لایه منتشر شوند. به دلیل همین حرکات جانبی یا چرخشی است که زنجیره‌های اسید چرب در بخش داخل آبگریز دو لایه باقی می‌مانند. یک مولکول لیپید شاخص در غشاهای طبیعی و مصنوعی با مولکول‌های مجاورش در یک لایه، در حدود 10^7 بار در هر ثانیه تغییر مکان می‌دهد و چند میکرومتر در هر ثانیه در دمای $37^\circ C$ انتشار دارد. این سرعت انتشار نشان می‌دهد که ویسکوزیته دو لایه ۱۰۰ مرتبه از ویسکوزیته آب بزرگتر است و در حدود ویسکوزیته روغن زیتون است. گرچه انتشار لیپیدها در غشای دو لایه از انتشار آن‌ها در محلولهای آبی کمتر است ولی لیپیدهای غشایی در طول یک غشای باکتریایی شاخص ($1\mu m$) تنها در یک ثانیه منتشر می‌شوند و در طول یک سلول حیوانی حدود ۲۰ ثانیه طول می‌کشد. وقتی غشاهای فسفولیپیدی خالص که به طور مصنوعی تولید شده و حالت مایع دارند تا دمای زیر $37^\circ C$ سرد شوند لیپیدها یک فاز انتقال از حالت شبه مایع به حالت شبه ژل (نیمه جامد) را انجام می‌دهند که شبیه به انتقال مایع به جامد (یخ زدن آب) می‌باشد (شکل ۱۱-۱۰). در زیر دمای انتقال فاز، سرعت انتشار قطرات لیپیدی دارای شیب تندی می‌شود. در دماهای فیزیولوژیک معمولی قسمتهای داخلی آبگریز غشاهای طبیعی عموماً دارای ویسکوزیته پایین هستند و سختی آن‌ها شبیه به مایعات است. در مقابل سختیِ شبیه به ژل در دماهای پایین‌تر مشاهده می‌شود.

فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها در غشاهای دو لایه‌ای خالص به طور جانبی چرخیده و حرکت می‌کنند اما به طور خود به خودی مهاجرت یا حرکت زیگزاگی از یک لایه به لایه دیگر ندارند. سد انرژی برای این حرکت بسیار بالاست و نیاز به حرکت گروه سر قطبی از محیط‌های آبی سراسر هسته هیدروکربنی دو لایه به محلولهای آبی در طرف دیگر دارد. پروتئین‌های غشایی خاص بحث شده در فصل ۱۱ برای حرکت از یک لایه به لایه دیگر نیاز به لیپیدهای غشایی و دیگر مولکول‌های قطبی دارند.

حرکات جانبی لیپیدها و پروتئین‌های خاص غشای پلاسمایی توسط تکنیکی به نام بازیافت فلورسانس بعد از خاموشی نوری[2]

1- Precursor

2- Fluorescence Recovery After Photobleaching



▲ **شکل تجربی ۱۲-۱۰ آزمایش‌های بازیافت فلورسانس بعد از خاموشی نوری (FRAP) می‌تواند مقدار کمّی حرکات پروتئین‌ها و لیپیدها در غشای پلاسمایی را نشان دهد.** (a) مراحل آزمایش. مرحله ❶ سلول‌ها ابتدا با یک عامل فلورسانس نشان دار می‌شوند که به طور یکنواخت به یک پروتئین یا لیپید خاص غشایی پیوند می‌شود. مرحله ❷ سپس یک نور لیزر در یک منطقه کوچک از سطح متمرکز می‌شود و به طور غیر قابل برگشت عاملهای پیوند شده خاموش می‌شوند و سپس فلورسانس در منطقه شرح داده شده کاهش می‌یابد. مرحله ❸ در این زمان فلورسانس در منطقه خاموش شده افزایش می‌یابد زیرا مولکول‌های فلورسانس سطح که خاموش نشده‌اند به داخل منتشر می‌شوند و آنهایی که خاموش شده‌اند به قسمت خارج منتشر می‌شوند میزان جبران فلورسانس در منطقه خاموش شده متناسب با کسری از مولکول‌های نشان داری است که در غشا حرکت می‌کنند. (b) نتایج آزمایشات FRAP با سلول‌های تومور کبدی انسان که با آنتی بادی فلورسانس مخصوص پروتئین گیرنده آسیالوگلیکوپروتئین تیمار شده است، نتایج نشان می‌دهد که ۵۰ ٪ فلورسانس به منطقه خاموش شده برمی‌گردند یعنی ۵۰ ٪ از مولکول‌های گیرنده در منطقه غشایی مشخص حرکت می‌کنند و ۵۰ ٪ ساکن هستند. به علت اینکه سرعت بازیافت فلورسانس متناسب با سرعت حرکت مولکول‌های نشان دار در منطقه خاموش شده است ضریب انتشار یک پروتئین یا لیپید در غشا می‌تواند با این اطلاعات محاسبه شود.

(FRAP) قابل کمی شدن است. فسفولیپیدهایی که دارای یک جایگزین فلورسانس هستند برای دیدن حرکات لیپیدی استفاده می‌شوند. برای پروتئین‌ها یک آنتی بادی منوکلونال خاص بر علیه دُمین اگزوپلاسمی پروتئین طراحی شده است که فقط دارای یک محل برای اتصال به آنتی ژن بوده به یک رنگ فلورسانس چسبیده است. با این روش که در شکل ۱۲-۱۰ توصیف شده است سرعت حرکت مولکول‌های غشایی (ضریب انتشار) و نسبت مولکول هایی که دارای حرکت جانبی هستند قابل تعیین است.

نتایج مطالعات FRAP با فسفولیپیدهای دارای نشان فلورسانس نشان می‌دهد که در غشای پلاسمایی فیبروبلاستها، همه فسفولیپیدها به طور آزادانه در فواصل حدود ۰/۵ μm حرکت می‌کنند اما اغلب در فواصل طولانی قابل انتشار نیستند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که مناطق غنی از پروتئین در غشای پلاسمایی در حدود ۱ μm از مناطق غنی از لیپید که حاوی فسفولیپیدهای غشایی عمده است جدا می‌شود. فسفولیپیدها به طور آزادانه در این قبیل مناطق منتشر می‌شوند اما از یک منطقه غنی از لیپید به منطقه مجاور

جدول ۱ - ۱۰ ترکیبات لیپیدی اصلی غشاهای زیستی

منبع / موقعیت	ترکیبات			
	PC	PE+PS	SM	کلسترول
غشای پلاسمایی (گلبول‌های قرمز انسان)	۲۱	۲۹	۲۱	۲۶
غشای میلین (اعصاب انسان)	۱۶	۳۷	۱۳	۳۴
غشای پلاسمایی (E.coli)	۰	۸۵	۰	۰
غشای شبکه آندوپلاسمی (موش صحرایی)	۵۴	۲۶	۵	۷
غشای گلژی (موش صحرایی)	۴۵	۲۰	۱۳	۱۳
غشای داخلی میتوکندری (موش صحرایی)	۴۵	۴۵	۲	۷
غشای خارجی میتوکندری (موش صحرایی)	۳۴	۴۶	۲	۱۱
موقعیت در لایهٔ اولیه	اگزوپلاسمی	سیتوزولی	اگزوپلاسمی	هر دو

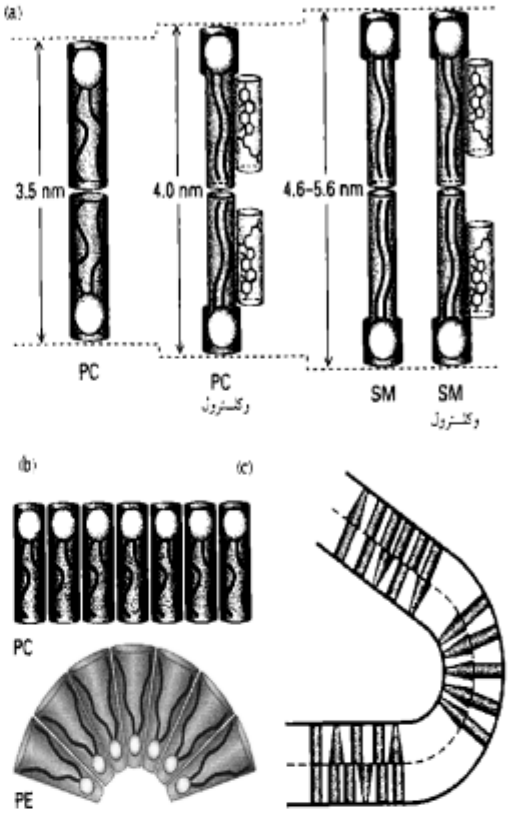
PC = فسفاتیدیل کولین، PE = فسفاتیدیل اتانول آدمین، PS = فسفاتیدیل سرین، SM = اسفنگومیلین.

نمی‌توانند منتشر شوند. به علاوه سرعت انتشار جانبی لیپیدها در غشای پلاسمایی حدوداً کمتر از فسفولیپیدهای دو لایه خالص است. ثابت‌های انتشار 10^{-8} cm^2/s و 10^{-7} cm^2/s به ترتیب مخصوص غشاهای پلاسمایی و دو لایه لیپیدی هستند. این اختلاف پیشنهاد می‌کند که شاید لیپیدها همان‌طور که اخیراً ثابت شده است به طور محکم اما به صورت برگشت‌ناپذیر به پروتئین‌های اینتگرال معینی در بعضی غشاها متصل شده‌اند (شکل ۱۷-۱۰ قسمت پایین را ملاحظه کنید).

اجزای لیپیدی تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی غشا قرار دارند

یک سلول محتوی انواع زیادی از غشاهاست که ویژگی آن توسط مخلوط شدن اختصاصی پروتئین‌ها و لیپیدها حاصل می‌شود. نتایج جدول ۱-۱۰ نشان دهنده اختلاف در ترکیبات لیپیدی غشاهای مختلف زیستی است. در این اختلافات چندین پدیده نقش دارند. برای مثال اختلاف در نسبت فراوانی فسفوگلیسریدها و اسفنگولیپیدهای بین غشاها در شبکه آندوپلاسمی (ER) که فسفولیپیدها در آن سنتز می‌شوند و دستگاه گلژی که اسفنگولیپیدها در آن سنتز می‌شوند، وجود دارد. نسبت اسفنگومیلین به عنوان درصد کلی از لیپیدهای غشایی فسفردار شده، در غشاهای گلژی حدود شش برابر بالاتر از غشاهای ER است. در موارد دیگر، حرکات غشا از یک قسمت سلولی به قسمت دیگر می‌تواند به طور انتخابی غشاهای معینی را از نظر لیپیدهایی چون کلسترول غنی کند. با توجه به محیط‌های مختلف در سرتاسر یک موجود، انواع مختلف سلول‌ها غشاهایی با ترکیبات لیپیدی مختلف تولید می‌کنند. برای مثال سلول‌های روده غشاهایی دارند که با محیط‌های خشن یعنی مواد غذایی که هضم می‌شوند رو به رو هستند و دارای نسبت اسفنگولیپید به فسفوگلیسرید به کلسترول به صورت ۱:۱:۱ هستند که این نسبت در سلول‌هایی که فشردگی کمتری دارند به صورت ۱: ۱/۵: ۰/۵: می‌باشد. به طور نسبی بالا بودن غلظت اسفنگولیپیدها در سلول‌های روده‌ای باعث افزایش استحکام به دلیل توسعه پیوند هیدروژنی به وسیله گروه OH آزاد در بخش اسفنگوزینی می‌شود. (شکل ۵-۱۰ را ملاحظه کنید).

میزان سیالیت غشا به وضعیت و ساختار دم‌های آبگریز فسفولیپیدی و دما بستگی دارد. توجه کنید که میانکنش‌های واندروالسی و اثرات آبگریز باعث می‌شوند دم‌های غیر قطبی فسفولیپیدها با هم تجمع پیدا کنند و زنجیره‌های اسید چرب اشباع و طولانی بیشترین تمایل به تجمع و تراکم به طور محکم با همدیگر در حالت شبیه به ژل را دارند. فسفولیپیدهای دارای زنجیره اسید چرب کوتاه که دارای منطقه سطحی حداقل بوده و میانکنش‌های وان‌دروالس در آن‌ها کم است، دو لایه بیشتر به صورت مایع است. بنابراین خمیدگی‌ها در زنجیره اسید چرب سیس اشباع نشده (فصل دو) باعث می‌شود میانکنش‌های وان‌دروالس با دیگر لیپیدها استحکام کمتری داشته باشد و سیالیت دو لایه بیشتر شود. پس زنجیره‌های اشباع به صورت صاف قرار گرفته و به طور محکمتری با همدیگر متراکم می‌شوند. کلسترول در نگهداشتن سیالیت مناسب در غشاهای طبیعی مهم است. این خاصیت برای رشد سلول‌های طبیعی و تولید مثل ضروری است. کلسترول حرکات تصادفی گروه سر فسفولیپیدها در قسمت خارجی هر لایه را محدود می‌کند، اما اثرش



▲شکل ۱۳-۱۰ اثر اجزای لیپیدی روی ضخامت و انحنای دو لایه. (a) یک دو لایه‌ای با اسفنگومیلین خالص (SM) ضخیم‌تر از یک دو لایه‌ای که از فسفوگلیسریدی مثل فسفاتیدیل کولین (PC) شکل گرفته است می‌باشد. کلسترول دارای یک اثر منظم کننده لیپیدی روی دو لایه‌ای فسفوگلیسریدی است که ضخامت را افزایش می‌دهد اما روی ضخامت دو لایه‌ای SM منظم اثری ندارد. (b) فسفولیپیدهایی مثل PC دارای یک شکل استوانه‌ای هستند و تک لایه‌ای‌های کم و بیش صافی را تشکیل می‌دهند. آنهایی که دارای گروه سر کوچکتر مثل فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) هستند، شکل مخروطی دارند. (c) یک دو لایه‌ای غنی از PC در لایه اگزوپلاسمی و PE در سطح سیتوزولی که در بسیاری از غشاهای طبیعی دیده می‌شود انحنای طبیعی دارد.

روی حرکت دم‌های فسفولیپیدی طویل به غلظت آن بستگی دارد. در غلظتهای طبیعی کلسترول در غشا پلاسمایی، میانکنش حلقه استروئید با دم‌های هیدروکربنی طویل فسفولیپیدها، این لیپیدها را تثبیت کرده و بنابراین سیالیت غشای زیستی کاهش می‌یابد. در غلظتهای کم کلسترول حلقه استروئیدی جدا شده و دم‌های فسفولیپیدی توزیع می‌یابند که باعث می‌شود غشا به طور مقطعی سیال‌تر شود.

اجزای لیپیدی یک دو لایه‌ای، ضخامت غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در عوض توزیع اجزای دیگر غشا از قبیل پروتئین‌ها در یک غشای خاص را هم تحت تأثیر قرار می‌دهند. نتایج مطالعات بیوفیزیکی روی غشاهای مصنوعی نشان می‌دهد که اسفنگومیلین بیشتر با حالت شبه ژل در ارتباط است و باعث ضخیم‌تر شدن دو لایه از فسفولیپیدها می‌شود (شکل ۱۳a-۱۰). کلسترول و مولکول‌های دیگری که سیالیت غشا را کاهش می‌دهند باعث افزایش ضخامت غشا می‌شوند. دم‌های اسفنگومیلین باعث استحکام مناسب می‌شوند. به علاوه کلسترول روی ضخامت یک دو لایه اسفنگومیلینی اثری ندارد.

ویژگی‌های دیگر وابسته به اجزای لیپیدی یک دو لایه، انحنای غشا است که به نسبت اندازه گروه‌های سر قطبی و دم‌های غیر قطبی تشکیل دهنده فسفولیپیدها بستگی دارد. لیپیدها با دم‌های طویل و گروههای سر بزرگ دارای شکل استوانه‌ای هستند و گروههای سر کوچک به شکل مخروطی هستند (شکل ۱۰۱۳b). در نتیجه دو لایه‌ای تشکیل شده از لیپیدهای استوانه‌ای نسبتاً صاف هستند. در عوض در آن‌هایی که شامل تعداد زیادی لیپیدهای مخروطی هستند دو لایه، شکل انحنادار دارد (شکل ۱۳c-۱۰). این اثر اجزای لیپیدی روی انحنای دو لایه، نقش مهمی را در تشکیل غشاهای دارای انحنای بالا بازی می‌کند. این قبیل مکانها مثلاً در جوانه‌های ویروسی (شکل ۳-۱۰ را ملاحظه کنید) و تشکیل وزیکول‌های داخلی از غشاهای پلاسمایی (شکل ۹-۱۰ را ملاحظه کنید) و در پایداری تخصصی ساختارهای غشایی از قبیل میکروویلی‌ها دیده می‌شود. چندین پروتئین به سطح فسفولیپید دو لایه‌ای چسبیده و باعث می‌شود غشا دارای انحنا گردد. این پروتئین‌ها در تشکیل وزیکول‌های حامل که از یک غشای دهنده جوانه می‌زنند، مهم است (فصل ۱۴).

اجزای لیپیدی در لایه‌های اگزوپلاسمی و سیتوزولی متفاوتند

یکی از ویژگی‌های همه غشاها این است که اجزای لیپیدی در طول دو لایه نامتقارنند. بنابراین اغلب فسفولیپیدهایی که در دو لایه غشا حضور دارند عموماً در یک لایه یا لایه دیگر فراوان ترند. برای مثال در غشا پلاسمایی گلبولهای قرمز و سلول‌های کلیه سگ که در محیط کشت رشد کرده است، اغلب اسفنگومیلین و فسفاتیدیل کولین (دو لایه‌ای هایی با سیالیت کمتر) در لایه اگزوپلاسم یافت می‌شوند و در مقابل، فسفاتیدیل اتانول آمین، فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اینوزیتول که تشکیل دو لایه‌ای‌های سیالتری را می‌دهند ترجیحاً در لایه سیتوزولی قرار می‌گیرند. این تفکیک لیپیدی در طول دو لایه، انحنای غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (شکل ۱۳c-۱۰ را ملاحظه کنید.)

به طور غیر مشابه فسفولیپیدهای خاص و کلسترول نسبتاً به طور یکنواخت در دو لایه غشاهای سلولی توزیع شده‌اند. نسبت فراوانی یک فسفولیپید خاص در دو لایه از غشا پلاسمایی را می‌توان از طریق آزمایش بر روی استعداد هیدرولیز فسفولیپید توسط **فسفولیپازها** (آنزیم هایی که پیوندهای مختلف در پایانه آبگریز فسفولیپیدها را می‌شکنند) تعیین کرد (شکل ۱۴-۱۰). وقتی فسفولیپازها به محیط خارجی اضافه شوند نمی‌توانند از غشا عبور کنند و بنابراین آن‌ها تنها گروه سر لیپیدهایی که در سطح اگزوپلاسمی قرار دارند را می‌شکنند. فسفولیپیدها در لایه سیتوزولی در مقابل هیدرولیز محافظت می‌شوند زیرا آنزیم‌ها نمی‌توانند به سطح سیتوزولی غشا پلاسمایی نفوذ کنند.

چگونگی به دست آمدن توزیع نامتقارن فسفولیپیدها در لایه‌های غشایی هنوز ناشناخته است. توجه کنید که در دو لایه‌ای فسفولیپیدی خالص، مهاجرت و حرکت زیگزاکی از یک لایه به لایه دیگر به طور خود به خودی انجام نمی‌شود. یک نتیجه درست اولیه از عدم تقارن در توزیع فسفولیپیدها این است که این لیپیدها در شبکه آندوپلاسمی و گلژی سنتز می‌شوند. اسفنگومیلین در سطح لومنی (اگزوپلاسمی) گلژی که سطح اگزوپلاسمای غشای پلاسمایی را تشکیل خواهد داد ساخته می‌شود. در مقابل فسفوگلیسریدها روی سطح سیتوزولی غشای ER که از نظر شکل‌شناسی با سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی یکسان است ساخته می‌شود. (شکل ۸-۱۰ را ملاحظه کنید).

به طور واضح این توضیحات برای مکان ارجح فسفاتیدیل کولین در لایه اگزوپلاسمی کافی نیست. حرکت این فسفوگلیسرید و شاید فسفوگلیسریدهای دیگر از یک لایه به لایه دیگر در بعضی غشاهای طبیعی توسط پروتئین انتقالی مصرف کننده ATP به نام **فیلیپاز** که در فصل ۱۱ بحث می‌شود کاتالیز می‌گردد.

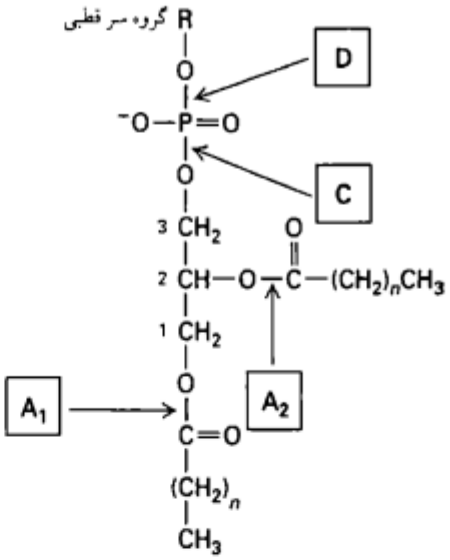
مکان‌های ارجح لیپیدها روی یک سطح از دو لایه برای تنوع عملکرد غشاهای پایه لازم است. برای مثال گروههای سر در همه شکلهای فسفریله شده فسفاتیدیل اینوزیتول با سیتوزول در تماسند. تحریک بسیاری از گیرنده‌های سطحی سلول به وسیله هورمونهای مربوطه باعث فعال شدن آنزیم سیتوزولی فسفولیپاز C می‌شود که سپس می‌تواند پیوند فسفواینوزیتول به دی‌اسیل گلیسرول را تجزیه کند. همان طور که در فصل ۱۵ خواهیم دید فسفواینوزیتولهای قابل حل در آب و دی اسیل گلیسرول‌های اضافه شده به غشا در مسیرهای پیام‌رسانی خارج سلولی، بسیاری از حالت‌های متابولیسم سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین فسفاتیدیل سرین به طور طبیعی در لایه سیتوزولی غشای پلاسمایی فراوان‌تر است. در مرحله آغازین تحریک پلاکت‌ها، فسفاتیدیل سرین‌ها به وسیله آنزیم فیلیپاز به میزان مختصر به سطح اگزوپلاسمی تغییر مکان می‌دهند و در اینجا فسفاتیدیل سرین‌ها، آنزیم‌های شرکت کننده در انعقاد خون را فعال می‌کنند.

کلسترول و اسفنگولیپیدها با پروتئین‌های مخصوص در میکرودومین‌های غشایی مجتمع می‌شوند

لیپیدهای غشایی به طور تصادفی (مخلوطهای یکنواخت) در هر لایه غشای دو لایه‌ای توزیع نشده‌اند. در سازماندهی لایه‌ها کشف شد که لیپیدهایی که بعد از استخراج از غشا پلاسمایی توسط شوینده‌های غیر یونی باقی می‌مانند، کلسترول و اسفنگومیلین است. علت این‌که این دو لیپید در دو لایه‌ای‌هایی که سیالیت کمتر و نظم بیشتری دارند یافت می‌شوند این فرضیه است که آنها به صورت میکرودمین‌هایی به نام **رَفتهای لیپیدی** شکل گرفته‌اند که به وسیله فسفولیپیدهای سیالتر دیگر احاطه می‌شوند که به آسانی توسط شوینده‌ها استخراج می‌شوند. بعضی مدارک بیوشیمیایی و میکروسکوپی وجود رفتهای لیپیدی را تأیید می‌کند که در غشاهای طبیعی دارای ابعاد ۵۰nm هستند. رَفتها توسط متیل بتاسیکلودکسترین[1] که به طور اختصاصی کلسترولهای خارج غشایی را استخراج می‌کند یا توسط آنتی‌بیوتیکهایی مثل فیلیپین[2] که کلسترول متراکم شده در غشا را جدا می‌کند، قابل جداسازی‌اند. این قبیل یافته‌ها نشان دهنده اهمیت کلسترول در حفظ بی عیب این رفت‌هاست و حضورشان در کمپلکس‌های کلسترول و اسفنگومیلین باقی مانده بعد از حذف شوینده‌ها قابل تشخیص است. رَفتهای لیپیدی در غشای پلاسمایی، تمهیدی برای غنی کردن زیر واحدهای پروتئینی غشای پلاسمایی مثل آنهایی که در پیام‌های خارج سلولی حساس قرار می‌گیرند و به سیتوزول انتقال داده می‌شوند، است. بنابراین به وسیله آوردن بسیاری از پروتئین‌های کلیدی در محدوده این کمپلکس‌های لیپیدی، پروتئین پیام‌رسان توسط گیرنده‌های سطحی سلول شناخته شده و در نتیجه فعال شدن حوادث سیتوزولی آسانتر رخ می‌دهد. با این حال چیزهای زیادی برای آموختن درباره ساختار و عملکردهای زیستی رَفتهای لیپیدی باقی مانده است.

1- Methyl - β - cyclodextrin

2- Filipin



▲ **شکل ۱۴-۱۰ (شکل رنگی) ویژگی فسفولیپازها.** هر نوع فسفولیپاز یک پیوند حساس را که با رنگ قرمز نشان داده شده است می‌شکند. اتم‌های کربن گلیسرول با اعداد کوچک نشان داده شده‌اند. در سلول‌های سالم فقط فسفولیپیدها در لایه اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی توسط فسفولیپاز محیط اطراف شکسته می‌شوند. فسفولیپاز C یک آنزیم سیتوزولی بوده و فسفولیپیدهای معینی را در لایه سیتوزولی غشای پلاسمایی می‌شکند.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۰

غشاهای زیستی: ترکیبات لیپیدی و سازمان‌یابی ساختاری

- سلول‌های یوکاریوتی توسط یک غشای پلاسمایی از محیط خارج جدا شده و به بخشهای داخلی در سلول سازمان‌یابی شده است (اندامکها و زیکولها).
- فسفولیپیدهای دولایه‌ای به عنوان واحد اصلی ساختار تمام غشاهای زیستی دارای دو صفحه لیپیدی با سطوح آبدوست و مرکز آبگریز می‌باشد که به مولکول‌های محلول در آب و یونها نفوذناپذیر است.
- ترکیبات لیپیدی اصلی غشاهای زیستی شامل فسفوگلیسرول‌ها، اسفنگولیپیدها و استرول هایی مثل کلسترول می‌باشد (شکل ۵-۱۰ را ملاحظه کنید).
- بسیاری از لیپیدها و اکثر پروتئین‌ها در غشاهای زیستی به صورت جانبی حرکت می‌کنند.
- غشاها بسته به حرارت و ترکیبات آن می‌توانند متحمل فازهای گذرا از حالت سیال تا شبه ژل شوند.
- غشاهای سلول‌های مختلف ترکیبات لیپیدی متفاوت دارند (جدول ۱-۱۰ را ملاحظه کنید) فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها در دو صفحهٔ غشای دولایه‌ای به صورت نامتقارن توزیع شده‌اند در حالیکه کلسترول در دو صفحه تقریباً به صورت یکسان وجود دارد.
- غشاهای زیستی طبیعی یک حالت ویسکوز با ویژگیهای شبه مایع دارد. در حالت کلی، سیالیت غشاء توسط اسفنگولیپیدها و کلسترول کاهش و توسط فسفوگلیسرول‌ها افزایش می‌یابد. ترکیبات لیپیدی غشاء همچنین بر ضخامت آن تأثیر می‌گذارد (شکل ۳-۱۰ را ملاحظه کنید).
- رفتهای لیپیدی میکرودمین‌های حاوی کلسترول، اسفنگولیپیدها و برخی از پروتئین‌های غشایی هستند که صفحه‌ای را در دو لایه ایجاد می‌کنند. این تجمعات ممکن است پیام‌رسانی توسط برخی از گیرنده‌های غشای پلاسمایی را تسهیل کند.

۱۰-۲ غشاهای زیستی: ترکیبات پروتئینی و عملکردهای پایه

پروتئین‌های غشایی به وسیله مکانشان که در داخل یا در سطح دو لایه فسفولیپیدی قرار گرفته‌اند تعریف می‌شوند. با این حال هر غشای زیستی دارای همان ساختمان پایه و لایه‌ای است که پروتئین‌های مرتبط با غشاهای خاص مسئول فعالیت‌های مشخص هستند. نوع و مقدار پروتئین‌های مرتبط با غشاهای زیستی به نوع سلول و موقعیت تحت سلولی آن بستگی دارد. برای مثال غشای داخلی میتوکندری ۷۶٪ پروتئین دارد اما غشاهای میلینی که آکسونهای عصبی را احاطه می‌کند تنها ۱۸٪ پروتئین دارند. مقدار زیاد فسفولیپیدهای میلینی، عصب را از نظر الکتریکی از محیط عایق می‌کند که در فصل ۲۳ بحث خواهیم کرد. اهمیت پروتئین‌های غشائی از یافته‌هایی مشخص می‌شود که پیشنهاد می‌کند یک سوم همه ژنهای مخمر پروتئین‌های غشایی را رمزدهی می‌کنند. نسبت فراوانی ژنها برای پروتئین‌های غشایی در موجودات پر سلولی یا ارگانیسم‌هایی که پروتئین غشایی در آنها دارای عملکرد اضافی در الحاق سلولی است، بزرگتر می‌باشد. دو لایه لیپیدی یک محیط آبگریز دو بعدی را برای پروتئین‌های غشایی ارائه می‌دهد. بعضی پروتئین‌ها دارای قطعاتی هستند که به هسته آبگریز غشای فسفولیپیدی اضافه می‌شوند و دیگر پروتئین‌ها در ارتباط با لایه سیتوزولی یا اگزوپلاسمی دو لایه هستند. عموماً دُمین‌های پروتئینی در سطح خارجی سلولی غشای پلاسمایی به مولکول‌های خارج

سلولی مثل پروتئین‌های پیام‌رسان خارجی، یونها و متابولیت‌های دیگر (مثل گلوکز و اسیدهای چرب) و پروتئین‌های در روی سلول‌ها دیگر یا محیطهای خارجی چسبیده‌اند. قطعات پروتئینی در درون غشای پلاسمایی دارای عملکردهای متنوع هستند و شامل آنهایی که کانالها و حفره هایی را در پروتئین‌های انتقال دهنده تشکیل می‌دهند بوده و مولکول‌ها و یونها را به داخل یا خارج سلول منتقل می‌کنند. دُمین هایی که در سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی قرار می‌گیرند دارای عملکردهای وسیعی از پروتئین‌های اسکلتی لنگری تا شروع کننده مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی می‌باشند. در بسیاری از موارد، عملکرد یک پروتئین غشایی و شکل زنجیره پلی پپتیدی آن در غشا، پایه‌های شباهت با دیگر پروتئین هایی که به خوبی شناخته شده‌اند را پیشگویی می‌کند.

در این قسمت ویژگی‌های طرح‌های ساختمانی پروتئین‌های غشایی و بعضی عملکردهای اصلی شان را توضیح می‌دهیم. ساختار چندین پروتئین برای کمک به درک مسیرهایی که پروتئین‌های غشایی با غشاها میانکنش می‌دهند را توصیف می‌کنیم. توصیف کاملتر ویژگی‌های انواع مختلف پروتئین‌های غشایی در فصل بعدی آمده است که روی ساختار و فعالیت در زمینه عملکردهای سلولی آنها تمرکز دارد.

پروتئین‌ها با غشاها به سه طریق مختلف میانکنش می‌دهند

پروتئین‌های غشایی را بر مبنای میانکنش بین پروتئین و غشا در سه گروه می‌توان دسته‌بندی کرد: داخلی[1]، **متصل شده به لیپید**[2] و **محیطی**[3]. (شکل ۱-۱۰ را ملاحظه کنید). پروتئین‌های داخلی غشا، پروتئین‌های گذرنده از غشائی هم نامیده می‌شوند که در طول دو لایه فسفولیپیدی قرار داشته و شامل سه قطعه هستند. دُمین‌های اگزوپلاسمی و سیتوپلاسمی دارای سطح خارجی آبدوست بوده و با محلول آبی در سطوح اگزوپلاسمی و سیتوپلاسمی غشا میانکنش می‌دهند. این قطعات از نظر ساختاری و موقعیت اسید آمینه‌ای به قطعات دیگر پروتئین‌های محلول در آب شباهت دارند. در مقابل قطعاتی که در طول غشا قرار دارند، معمولاً حاوی اسیدهای آمینه آبگریز زیادی هستند که زنجیره‌های جانبی آنها به سمت بیرون بر آمده است و با هسته هیدروکربنی آبگریز در دو لایه فسفولیپیدی میانکنش می‌دهند. همه پروتئین‌های گذرنده از غشاء دارای اطلاعات شرح داده شده زیر هستند: دُمین گذرنده از غشاء از یک یا تعداد بیشتری مارپیچ آلفا یا صفحات چند تایی β تشکیل شده است. به دلیل اینکه این قطعات باید در داخل غشا قرار گیرند سنتز ریبوزومی و پیرایش بعد از ترجمه در پروتئین‌های داخلی غشا نسبت به پروتئین‌های حلال در سیتوزول، متفاوت بوده و جداگانه در فصل ۱۳ و ۱۴ بررسی خواهد شد.

پروتئین‌های غشایی متصل شده به لیپید با یک یا تعداد بیشتری لیپید دارای پیوند کووالانسی هستند. قطعات آبگریز لیپیدهای چسبنده، در یک لایه از غشا جاگرفته‌اند و پروتئین‌ها را به غشا متصل می‌کنند. خود زنجیره‌های پلی پپتیدی به دو لایه لیپیدی وارد نمی‌شوند.

پروتئین‌های محیطی غشا مستقیماً با هسته آبگریز دو لایه لیپیدی میانکنش ندارند. در عوض آن‌ها به طور غیر مستقیم با پروتئین‌های داخلی یا پروتئین‌های غشایی متصل شده با لیپید یا مستقیماً با گروه سر قطبی لیپید میانکنش می‌دهند. هم چنین پروتئین‌های محیطی می‌توانند با سطوح اگزوپلاسمی و سیتوپلاسمی هم پیوند برقرار کنند. علاوه بر این‌که پروتئین‌ها به طور محکم با دو لایه ارتباط دارند، فیلامنت‌های سیتواسکلتی معمولاً از طریق یک یا تعداد بیشتری پروتئین محیطی (تطبیق دهنده) با پیوندهای سست‌تری با سطح سیتوزولی ارتباط برقرار می‌کنند. این قبیل ارتباطات با اسکلت سلولی یک نقش حفاظتی برای غشاهای سلولی فراهم کرده و به تعیین شکل سلول و ویژگی‌های مکانیکی آن کمک می‌کند و در ارتباط بین دو مسیر داخل و خارج سلولی (فصل ۱۷) نقش دارد. در پایان اینکه پروتئین‌های محیطی روی سطح خارجی غشای پلاسمایی و دُمین اگزوپلاسمی در پروتئین‌های غشایی داخلی، اغلب به اجزاء ماتریکس خارج سلولی یا دیواره سلولی احاطه کننده باکتری‌ها و سلول‌های گیاهی می‌چسبند و یک سطح بینابینی اصلی بین سلول و محیط ایجاد می‌کنند.

اغلب پروتئین‌های گذرنده از غشا دارای مارپیچ آلفای گذرنده از غشا هستند.

پروتئین‌های محلول، صدها ساختار مجزای چین خورده به طور موضعی یا موتیف را نشان می‌دهند (شکل ۹-۳ را ملاحظه کنید). در مقایسه مجموعه ساختارهای چین خورده در دُمین‌های گذرنده از غشاء پروتئین‌های غشایی داخلی از مارپیچ‌های آلفای آبگریز تشکیل شده‌اند. پروتئین‌های دارای دُمین‌های آلفا هلیکس گذرنده از غشا به طور پایدار به غشا اضافه شده‌اند زیرا از نظر انرژتیکی

1- Integral
2- Lipid - anchored
3- Peripheral

میانکنش‌های آبگریز و واندروالسی زنجیره‌های آبگریز داخلی در دُمین‌ها با لیپیدهای خاص و احتمالاً میانکنش‌های یونی با سر قطبی فسفولیپیدها مطلوب هستند.

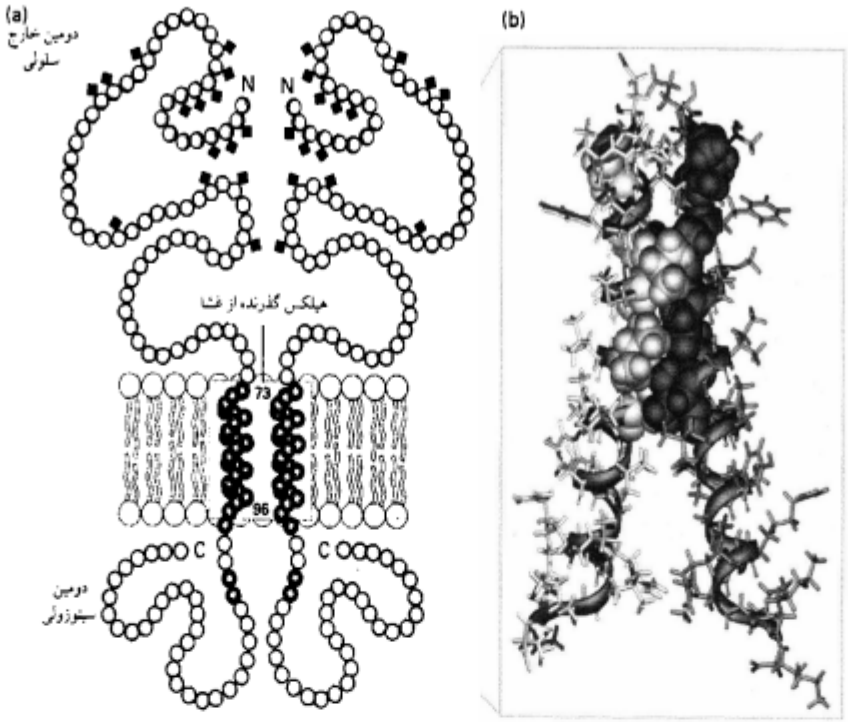
یک دمین منفرد آلفا هلیکس برای تشکیل پروتئین غشایی داخلی در درون غشا کافیست. بیشتر غشاها بیش از یک مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء دارند. به طور شاخص یک مارپیچ آلفای قرار گرفته در غشا از یک قطعه توالی شامل ۲۵-۲۰ اسید آمینه آبگریز (بدون بار) تشکیل شده است (شکل ۱۴-۲ را ملاحظه کنید). طول پیش بینی شده در مورد یک مارپیچ آلفا (۳/۷۵nm) برای عبور هسته هیدروکربنی از یک دو لایه لیپیدی کافی است. این مارپیچ‌ها در بسیاری از پروتئین‌های غشایی با طرح غشا عمود هستند در صورتی که در سایر پروتئین‌ها، مارپیچ‌ها غشا را به طور مایل طی می‌کنند. زنجیره‌های جانبی آبگریز به سمت بیرون از مارپیچ برآمدگی دارند (شکل ۱۵-۱۰) و میانکنش‌های واندروالسی با زنجیره‌های اسید چرب در دو لایه تشکیل می‌دهند. در مقابل، پیوندهای پپتیدی آمیدی آبدوست در داخل آلفا هلیکس وجود دارد (شکل ۴-۳ را ملاحظه کنید). هر گروه کربونیل (C=O) یک پیوند هیدروژنی با اتم هیدروژن آمید اسید آمینه رزیدوی چهارم به سمت انتهای C مارپیچ تشکیل می‌دهد. این گروههای قطبی از درون آبگریز غشا محافظت می‌شوند. برای درک بهتر ساختار پروتئین‌های دارای دُمین‌های مارپیچ آلفا، در مورد سه نوع مختلف از این پروتئین‌ها بحث می‌کنیم: گلیکوفورین A، G پروتئین جفت شده با گیرنده و آکواپورین‌ها (کانالهای آب / گلیسرول).

گلیکوفورین A، پروتئین اصلی در غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز، پروتئین غشایی است که یک بار از غشا عبور می‌کند و دارای تنها یک مارپیچ آلفا گذرنده از غشاست (شکل ۱۵-۱۰). مارپیچ‌های آلفای گذرنده از غشاء از یک پلی پپتید گلیکوفورین A با مارپیچ‌های آلفای گذرنده از غشاء مشابه در یک گلیکوفورین A دیگر ارتباط دارد و یک دایمرکویل کویل را تشکیل می‌دهد (شکل ۱۵b-۱۰). این قبیل میانکنش‌های آلفا هلیکس‌های گذرنده از غشا، یک مکانیسم عمومی برای ایجاد پروتئین‌های دوتایی غشایی بوده و بسیاری از پروتئین‌های غشایی به وسیله میانکنش بین مارپیچ‌های گذرنده از غشاء، الیگومرها (دو یا تعداد بیشتری پلی پپتید که توسط پیوندهای غیر کوالان با هم بر هم کنش می‌دهند) را تشکیل می‌دهند.

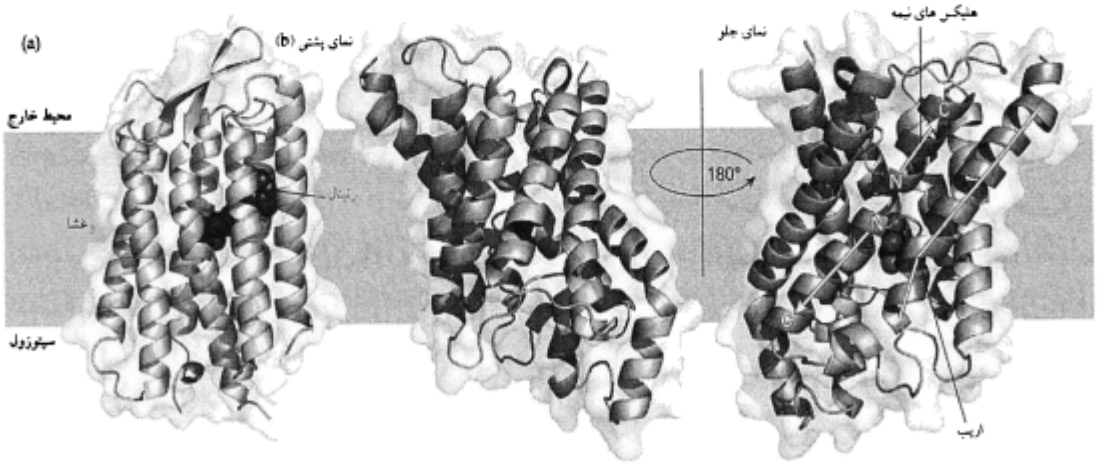
یک گروه بزرگ و مهم از پروتئین‌های داخلی با هفت آلفا هلیکس گذرنده از غشا وجود دارد که شامل خانواده بزرگی از G پروتئین‌های همراه با گیرنده‌های سطح سلول بوده و در فصل ۱۵ بحث خواهد شد. یک پروتئین گذرنده از غشاء که چند بار از غشا عبور می‌کند و ساختارآن از نظر جزئیات مولکولی شناخته شده است باکتریورودوپسین می‌باشد. این پروتئین در غشا باکتری‌های فتوسنتزی معینی یافت می‌شود و ساختار عمومی همه این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۱۶a-۱۰).

جذب نور توسط گروه رتینال که به طور کووالان به این پروتئین متصل شده است باعث تغییر کنفورماسیون در پروتئین شده و باعث پمپ شدن پروتون از سمت سیتوزول غشا باکتری به فضای خارج سلولی می‌شود. شیب پروتون ایجاد شده در امتداد غشا، برای سنتز ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد (فصل ۱۲). در باکتریورودوپسین هایی با ساختار قدرت تفکیک بالا، موقعیت همه اسیدهای آمینه، رتینال و لیپیدهای احاطه کننده به طور واضح مشخص است و شاید این استثنایی باشد که همه اسیدهای آمینه در خارج قطعات گذرنده از غشا در باکتریورودوپسین آبگریز هستند و از نظر انرژتیکی برای آنها مطلوب است که با هسته هیدروکربنی لیپید دو لایه‌ای احاطه کننده میانکنش دهند.

آکواپورین‌ها یک خانواده بزرگ از پروتئین‌های حفاظت شده هستند که آب، گلیسرول و مولکول‌های آبدوست دیگر را از طریق غشاهای زیستی عبور می‌دهند. آن‌ها چندین جنبه ساختاری پروتئین‌های غشایی که چندبار از غشا عبور می‌کنند را نشان می‌دهند. آکواپورین‌ها تترامری شامل چهار زیر واحد منفردند. هر یک از چهار زیر واحد دارای شش مارپیچ آلفای گذرنده از غشا هستند. به علت شباهت‌های ساختاری آکواپورین‌ها، ما روی یکی از آن‌ها تمرکز می‌کنیم که دارای ساختاری است که به خوبی توسط مطالعات پراش اشعه X مطالعه شده است (شکل ۱۶b-۱۰). این آکواپورین‌ها دارای مارپیچ گذرنده از غشاء طویل با یک پیچش در قسمت میانی و دارای دو مارپیچ آلفا که تنها به نیمی از غشا نفوذ می‌کند است. انتهای N این مارپیچ‌ها رو به روی هم قرار گرفته (Nهای زرد در شکل) و با همدیگر غشا را به صورت اریب طی می‌کنند. بنابراین بعضی مارپیچ‌های جا گرفته در غشا و ساختارهای غیر کروی که ما بعداً با آن‌ها مواجه می‌شویم داخل دو لایه را طی نمی‌کنند و ما در فصل ۱۱ خواهیم دید که این مارپیچ‌های کوچک در آکواپورین‌ها، قسمتی از حفره انتخابی آب ـ گلیسرول در قسمت میانی هر زیر واحد را تشکیل می‌دهند. این موارد، گوناگونی‌های قابل توجهی را در مسیرهای میانکنش مارپیچ آلفای گذرنده از غشا با دو لایه لیپیدی و با دیگر قطعات پروتئینی برجسته می‌کند. خاصیت میانکنش‌های پروتئین با فسفولیپید با جزئیات زیاد در ساختار آکواپورین مختلف و آکواپورین



▲ **شکل ۱۵-۱۰ (شکل رنگی) ساختار گلیکوفورین A؛ یک پروتئین تیپیک گذرنده از غشاء با یک بار عبور از غشا.** (a) شکل گلیکوفورین دایمری نشان دهنده طرحهای توالی اصلی و ارتباطش با غشاست. ۲۳ اسید آمینه منفرد به صورت آلفا هلیکس در طول غشاست که هر مونومر از اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی آبگریز (بدون بار) تشکیل شده است (کره‌های قرمز و سبز). گلیکوفورین به وسیله اتصال گروه‌های سر در فسفولیپید که بار منفی دارند و اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین دارای بار مثبت (کره‌های آبی) که نزدیک قسمت سیتوزولی هلیکس هستند به غشا متصل می‌شود. دو دُمین خارج سلولی و سیتوزولی از نظر اسیدهای آمینه بار دار و غیر باردار قطبی غنی هستند. دُمین خارج سلولی به شدت گلیکوزیله شده است و زنجیره جانبی کربوهیدرات (قسمتهای سبز) به اسیدهای آمینه ویژه سرین، ترئونین و آسپاراژین چسبیده است. (b) مدل مولکولی دُمین گذرنده از غشاء دایمر گلیکوفورین با اسیدهای آمینه ۷۳ تا ۹۶ منطبق است. زنجیره جانبی آبگریز آلفا هلیکس در یک مونومر در قسمت صورتی نشان داده شده است و در دیگر مونومرها سبز است. اسیدهای آمینه به صورت ساختارهای فضا پر کن نشان داده شده‌اند که در میانکنش‌های واندروالسی داخل مولکولی شرکت کرده‌اند ودایمر کویل کویل را استحکام بخشیده‌اند.



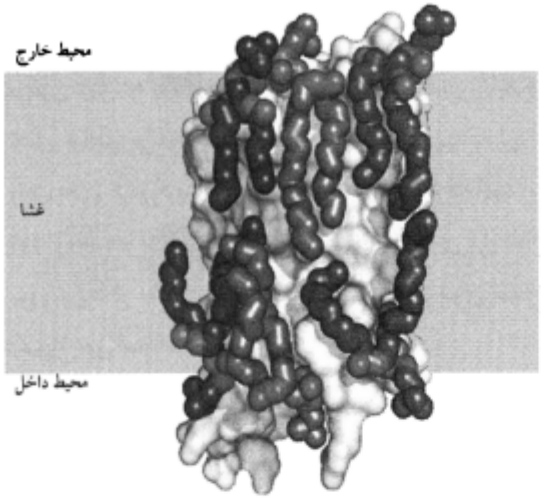
▲ **شکل ۱۶-۱۰ (شکل رنگی). مدل‌های ساختاری از دو پروتئین غشایی که چند بار از غشا عبور می‌کنند.** (a) باکتریورودوپسین یک گیرنده نوری در نوعی باکتری است. هفت مارپیچ آلفا آبگریز در باکتریورودوپسین، دو لایه لیپیدی را تقریباً به صورت عمود با غشا طی می‌کند. یک مولکول رتینال (سیاه) به صورت کووالانسی به یک مارپیچ جذب کننده نور چسبیده است. گروه بزرگ G پروتئین‌های همراه شده با گیرنده در سلول‌های یوکاریوتها هم دارای هفت مارپیچ آلفا گذرنده از غشاست و ساختار سه بعدی آنها با باکتریورودوپسین مشابه است. (b) دو تصویر از کانال گلیسرول، GlpF دارای چرخش 180^0 نسبت به همدیگر در طول یک محور عمود با غشاست. دقت کنید که چند آلفا هلیکس گذرنده از غشا دارای زاویه اریب هستند دو هلیکس که تنها به نیمی از غشا نفوذ می‌کنند (ارغوانی با فلش‌های زرد) و یک مارپیچ طویل گذرنده از غشا با یک شکستگی یا تغییر شکل در وسط (ارغوانی با خط زرد). مولکول گلیسرول در هسته آبدوست به رنگ قرمز است. ساختار تقریباً در هسته هیدروکربنی غشا قرار دارد. با توجه به این، صفحه ۳mm هیدروکربنی پروتئین، به صورت عمود با طرح غشا می‌باشد.

صفر نشان داده شده است (شکل ۱۷-۱۰). آکواپورین صفر فراوان‌ترین پروتئین در غشا پلاسمایی سلول‌های فیبری سازندهٔ لنز چشم پستانداران است. این همانند دیگر آکواپورین‌ها یک تترامر شامل چهار زیر واحد یکسان است. سطح پروتئین یا یک گروه از محلهای اتصال شده یکنواخت برای مولکول‌های فسفولیپید پوشیده نشده است. در عوض زنجیره‌های جانبی اسید چرب به طور محکم در مقابل پروتئین‌های سطح خارجی آبگریز غیر منظم متراکم شده‌اند. بعضی از زنجیره‌های اسید چرب به طور صاف بوده و به صورت کاملاً ترانس قرار گرفته‌اند (فصل ۲)، در حالی که زنجیره‌های دیگر با میانکنش محکم با زنجیره جانبی آبدوست روی سطح پروتئین‌ها به هم چسبیده‌اند. بعضی گروههای سر لیپیدی با سطح غشا موازی هستند و لیپیدهای دیگر زاویه راست با غشا دارند. بنابراین میانکنش‌های خاص بین فسفولیپیدها و پروتئین‌های گذرنده از غشا می‌تواند وجود داشته باشد و عملکرد بسیاری از پروتئین‌های غشایی به وسیله انواع خاص فسفولیپیدهای موجود در دو لایه تحت تأثیر قرار می‌گیرند.

چند رشته β در پورین‌ها شبکه‌های گذرنده از غشا تشکیل می‌دهند

پورین‌ها یک گروه از پروتئین‌های گذرنده از غشاء بوده و ساختارشان به طور اساسی از دیگر پروتئین‌های داخلی پایه در دمین‌های گذرنده از غشاکه مارپیچ آلفا هستند متفاوت است. چند نوع از پورین‌ها در غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند E.coli و در غشای خارجی میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها یافت شده است. غشا خارجی، یک باکتری روده‌ای را از عوامل آسیب زا همانند آنتی بادی‌ها، نمکهای صفراوی و پروتئازها حفظ می‌کند اما به مولکول‌های کوچک آبدوست شامل غذاها اجازه جذب و به مواد زائد اجازه انهدام را می‌دهد.

انواع مختلف پورین‌ها در غشا خارجی یک سلول E.coli کانال هایی برای عبور انواع خاص دی ساکاریدها یا مولکول‌های کوچک دیگر همانند یون‌هایی چون فسفات را فراهم می‌کند. توالی اسید آمینه‌های پورین‌ها شامل هیچکدام از قطعات آبگریز طویل خاص پروتئین‌های داخلی با دمین‌های آلفا هلیکس گذرنده از غشا نیست. کریستالوگرافی اشعه X نشان می‌دهد که پورین‌ها از سه زیر واحد همسان تشکیل شده‌اند. در هر زیر واحد، ۱۶ رشته β، صفحه‌ای را تشکیل می‌دهند که به شکل ساختاری شبکه‌ای با یک حفره در مرکز پیچیده شده است (شکل ۱۸-۱۰). یک پورین به طور غیر مشابه با



▲**شکل ۱۷-۱۰ فسفولیپیدهای حلقوی.** دید جانبی از ساختار سه بعدی یک زیر واحد آکواپورین صفر مخصوص عدسی که دارای چهار تترامر مشابه است. در حضور دی میریستویل فسفاتیدیل کولین که یک فسفولیپیدی با زنجیره اسید چرب ۱۴ کربنه اشباع می‌باشد، کریستاله شده است. توجه کنید که مولکول‌های لیپید یک کره دو لایه‌ای در اطراف پروتئین تشکیل داده‌اند. پروتئین‌ها به عنوان یک طرح از سطح نشان داده شده‌اند. مولکول‌های لیپید به شکل فضا پر کن نشان داده شده‌اند. گروههای سر لیپیدی قطبی (خاکستری و زرد) یک دو لایه با ضخامت یکنواخت در اطراف پروتئین تشکیل داده‌اند. می‌توان گفت در غشا زنجیره‌های اسید چرب لیپیدی تمام سطح آبگریز پروتئین را می‌پوشانند؛ تنها منظم‌ترین مولکول‌های لیپیدی در ساختار کریستالوگرافی قابل مشاهده می‌شوند.

یک مولکول تیپیک کروی قابل حل در آب، دارای یک قسمت داخلی آبدوست و یک قسمت خارجی آبگریز است به این معنی که پورین‌ها برعکس هستند. در یک مونومر پورین، گروههای جانبی به سمت بیرون در هر رشته β، آبگریزند و یک دسته شبه نواری غیر قطبی را تشکیل می‌دهند که کناره بیرونی بشکه را احاطه می‌کنند. این رشته آبگریز با گروههای اسید چرب لیپیدهای غشایی یا با مونومرهای پورینی دیگر میانکنش می‌دهند. گروههای جانبی مواجه با داخل یک مونومر پورینی، به طور غالب آبدوست هستند. آنها حفره هایی را به صورت سراسری ایجاد می‌کنند که مولکول‌های کوچک قابل حل در آب از غشا عبور کنند (توجه کنید که آ کواپورین‌هایی که در بالا بحث شد برخلاف نامشان پورین نیستند و حاوی چند مارپیچ آلفا گذرنده از غشا می‌باشند).

زنجیره‌های هیدروکربنی که به طور کووالان متصل شده‌اند باعث اتصال بعضی پروتئین‌ها به غشاها می‌شوند

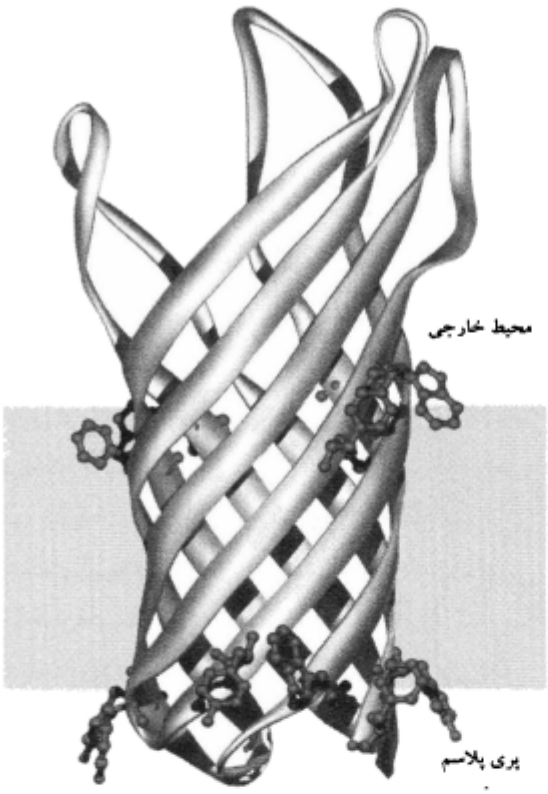
در سلول‌های یوکاریوت چندین نوع لیپید که به طور کووالان

متصل شده‌اند به طور تیپیک باعث اتصال بعضی از پروتئین‌های محلول در آب به یک یا دو لایه دیگر غشاهای پلاسمایی یا دیگر غشای سلولی می‌شوند. در این پروتئین‌های متصل شده به لیپید، زنجیره‌های هیدروکربنی لیپید در داخل دو لایه قرار گرفته است اما خود پروتئین داخل دو لایه نیست. اتصال به لیپید برای قرار دادن پروتئین‌ها در سطح سیتوزولی استفاده شده و برای سطح اگزوپلاسمی استفاده نمی‌شوند.

گروهی از پروتئین‌های سیتوزولی به وسیله یک گروه اسید چرب (مثل میریستات یا پالمیتات) که به طور کووالانسی به انتهایی N یک اسید آمینه گلیسین متصل شده است به سطح سیتوزولی غشاء متصل می‌شوند (شکل ۱۹a-۱۰). نگهداری این قبیل پروتئین‌ها در غشا توسط اتصال آسیل انتهایی N، آسیلاسیون نامیده می‌شود و احتمالاً نقش مهمی را در عملکردهای ارتباطی غشا بازی می‌کنند. برای مثال v-Src، شکل جهش یافته از یک تیروزین کیناز سلولی بوده و باعث القای رشد غیر طبیعی سلول شده و می‌تواند باعث رفتن به سوی سرطانی شدن در مواقعی که انتهایی N دارای میریستیلات باشد شود.

دومین گروه از پروتئین‌های سیتوزولی توسط زنجیره هیدروکربنی چسبیده به یک اسید آمینه سیستئین که در قسمت انتهایی C یا نزدیک آن قرار دارد به غشا متصل شده‌اند (شکل ۱۹b-۱۰). تعدادی از این زنجیره‌ها اتصال‌های پرنیل[1] هستند که از واحدهای ایزوپرن ۵ کربنه ساخته شده‌اند که در ادامه به طور جزئی گفته خواهد شد. واحدهای ایزوپرن در سنتز کلسترول هم استفاده می‌شوند. در این پروتئین‌ها یک فارنسیل ۱۵ کربنه یا گروه ژرانیل ۲۰ کربنه از طریق پیوند تیواتری به گروه SH- از انتهایی C اسید آمینه سیستئین پیوند شده است. در بعضی موارد یک گروه ژرانیل ثانویه یا یک گروه اسید چرب پالمیتات به یک اسید آمینه سیستئین در نزدیک آن متصل شده است. برای مثال Ras، یک GTPase ابرخانواده پروتئینی که در پیام‌رسانی داخل سلولی (فصل ۱۶) نقش دارد، به وسیله یک اتصال دوتایی در سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی قرار می‌گیرد. پروتئین‌های Rab که به ابرخانواده GTPaseها متعلق هستند، به طور مشابهی به سطح سیتوزولی وزیکولهای داخل سلولی به وسیله اتصال‌های پرنیل متصل می‌شوند. این پروتئین‌ها برای الحاق وزیکول‌ها با غشاهای هدف مورد نیاز هستند (فصل ۱۴).

بعضی پروتئین‌های سطح سلول و پروتئین‌های خاص با پلی ساکاریدهایی که به طور کووالانسی به هم متصل شده‌اند و پروتئوگلیکان (فصل ۱۹) نامیده می‌شوند توسط نوع سوم از اتصال‌ها

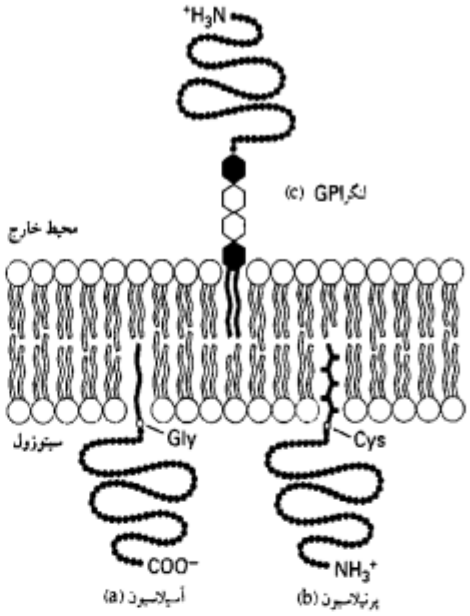


▲ **شکل ۱۸-۱۰ (شکل رنگی). مدل ساختاری از یک زیر واحد Ompx، پورینی که در غشای خارجی *E.coli* یافت شده است.** همه پورینها پروتئین‌های ناقل غشایی تریمر هستند. هر زیر واحد به شکل بشکه است که دارای رشته‌های β که دیواره را تشکیل می‌دهند و یک پورین ناقل غشایی در مرکز است. وضعیت یک رشته از زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک (آبگریز و غیر حلقوی) (زرد) و یک قسمت از زنجیره جانبی آروماتیک (محتویات حلقوی) (قرمز) پروتئین در دو لایه.

به نام گلیکوزیل فسفاتیدیل ـ اینوزیتول (GPI) به سطح اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی پیوند شده‌اند. ساختار دقیق اتصال‌های GPI به میزان زیادی در انواع سلول‌های مختلف متفاوت است اما آنها همیشه حاوی فسفاتیدیل اینوزیتول (PI) هستند که دو زنجیره اسید چرب آن در داخل لیپید دو لایه‌ای شبیه فسفولیپیدهای دو لایه‌ای تیپیک امتداد یافته‌اند و هم‌چنین حاوی فسفواتانول آمین هستند که به طور کووالانسی اتصال را به انتهایی C یک پروتئین متصل کرده است و دارای چندین باقی مانده قندی هم هستند (شکل ۱۹c-۱۰). بنابراین اتصال‌های GPI، گلیکولیپید هستند.

اتصال‌های GPI برای چسبیدن پروتئین‌ها به غشا ضروری هستند. برای مثال آنزیم فسفولیپاز C پیوند فسفات ـ گلیسرول را در

1- Prenyl anchors



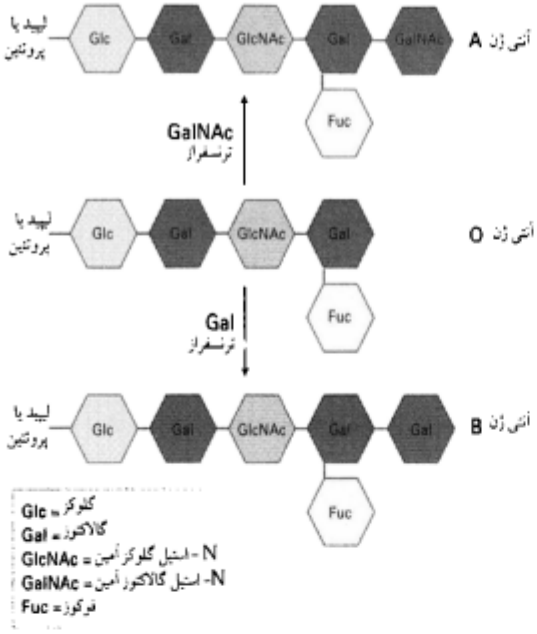
▲ شکل ۱۹-۱۰ (شکل رنگی) اتصال پروتئین‌های غشا پلاسمایی به دو لایه توسط اتصالات غیر کووالانسی گروههای هیدروکربنی

(a) پروتئین سیتوزولی از قبیل v-Src از طریق یک اسید چرب منفرد که به انتهایی N اسید آمینه گلیسین (Gly) پلی پپتید چسبیده است، به غشاء پلاسمایی متصل می‌شوند. میریستات (C_{14}) و پالمیتات (C_{16}) عموماً اتصال‌های اسیدی هستند. (b) دیگر پروتئین‌های سیتوزولی (مانند پروتئین‌های Rab) توسط پرنیلاسیون یک یا دو اسید آمینه سیستئین (Cys) در قسمت c انتهایی یا نزدیک به آن به غشاء متصل شده‌اند. لنگرها گروههای فارنسیل (C_{15}) و ژرانیل ژرانیل (C_{20}) هستند که هر دو غیر اشباعند. (c) لنگر لیپیدی در سطح اگزوپلاسمی غشا پلاسمایی، گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) است. قسمت فسفاتیدیل اینوزیتول (قرمز) در این لنگر شامل دو زنجیره اسید چرب است که در دو لایه امتداد یافته است. واحد فسفواتانول آمین (ارغوانی) در لنگر آن را به پروتئین می‌چسباند. دو شش ضلعی سبز رنگ نشان دهنده واحدهای قند هستند که از نظر تعداد، طبیعت و آرایش در اتصالات مختلف GPI متفاوتند. ساختار کامل یک لنگر GPI مخمر در شکل ۱۴-۱۳ نشان داده شده است.

فسفولیپیدها و اتصال‌های GPI می‌شکنند (اشکال ۱۴-۱۰ را ملاحظه کنید). تیمار سلول‌ها با فسفولیپاز C، پروتئین‌های لنگر شده توسط GPI از قبیل Thy-1 و فسفاتاز قلیایی جفت[1] (PLAP) را از سطح سلول رها می‌کند.

پروتئین‌های گذرنده از غشاء و گلیکولیپیدها به طور نامتقارن در دو لایه قرار گرفته‌اند

هر نوع پروتئین گذرنده غشایی دارای یک جهت خاص است که به



▲شکل ۲۰-۱۰ آنتی ژن‌های گروه خونی ABO انسانی. این آنتی ژن‌ها زنجیره‌های الیگوساکاریدی هستند که به گلیکولیپیدها یا گلیکوپروتئین‌ها در غشا پلاسمایی به طور کووالانسی متصل شده‌اند. قندهای الیگوساکاریدی انتهایی تعیین کننده سه آنتی ژن هستند. حضور یا غیاب گلیکوزیل ترانسفرازها باعث اضافه شدن گالاکتوز (Gal) یا N-استیل گالاکتوز آمین به آنتی ژن O می‌شود و نوع گروه خونی یک فرد را تعیین می‌کند.

عنوان ریخت‌شناسی مربوط به سطح غشا پلاسمایی شناخته‌می‌شود. قطعه سیتوزولی همیشه با سیتوپلاسم برخورد دارد و قطعه اگزوپلاسمی همیشه با طرف مخالف مواجه است. جهت انواع پروتئین‌های گذرنده از غشاء مختلف در طول سنتز آنها تعیین می‌شود و در فصل ۱۳ آن را توصیف خواهیم کرد. پروتئین‌های غشایی هرگز حرکات زیگزاک در طول غشا را نشان نداده‌اند. زیرا این حرکات نیاز به حرکت موقتی اسیدهای آمینه آبدوست از طریق قسمت داخلی آبگریز غشا را دارد که از نظر انرژتیکی نامطلوب است. بنابراین شکل نامتقارن یک پروتئین گذرنده از غشاء که در طول بیوسنتز پروتئین در داخل غشا قرار می‌گیرد در طول زندگی پروتئین در غشا حفظ می‌شود. همان طور که در شکل ۹-۱۰ نشان داده شده است پروتئین‌های غشایی جهت نامتقارن خود را در غشا در طول جوانه زنی غشا و حوادث الحاقی حفظ می‌کنند. یعنی همان قطعه سیتوزولی همیشه با سیتوزول مواجه است و همان قطعه اگزوپلاسمی همیشه در معرض سطح اگزوپلاسمی است.

بسیاری از پروتئین‌های گذرنده از غشاء دارای زنجیره‌های

1- Placental alkaline phosphatase

کربوهیدراتی هستند که به طور کووالانسی به زنجیره‌های جانبی سرین، ترئونین یا آسپاراژین پلی پپتیدی چسبیده‌اند. این قبیل گلیکوپروتئین‌های گذرنده از غشاء همیشه در جهتی قرار می‌گیرند که زنجیره‌های کربوهیدراتی همیشه در دُمین اگزوپلاسمی قرار گیرد (شکل ۱۵-۱۰ را ملاحظه کنید). گلیکولیپیدها که یک زنجیره کربوهیدراتی متصل به اسکلت گلیسرول یا اسفنگوزین دارند همیشه در لایه اگزوپلاسمی قرار گرفته و زنجیره کربوهیدراتی آنها از سطح غشا بیرون زده است. مبانی بیوسنتز برای گلیکوزیله شدن نامتقارن پروتئین‌ها در فصل ۱۴ توضیح داده شده است. گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها به طور خاص در غشای پلاسمایی سلول‌های یوکاریوتی فراوانند. این ترکیبات در غشای داخل میتوکندری، تیغه‌های[1] کلروپلاستها و چندین غشا داخل سلولی دیگر یافت نمی‌شوند. زنجیره‌های کربوهیدراتی گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها در غشا پلاسمایی در داخل فضاهای خارج سلولی امتداد یافته‌اند و آنها برای میانکنش با اجزاء ماتریکس خارج سلولی مثل لکتین‌ها (پروتئین‌هایی که به قندهای خاصی متصلند)، فاکتورهای رشد و آنتی بادی‌ها ارزشمند هستند.

یک نتیجه مهم این گونه میانکنش‌ها با آنتی ژن‌های گروه خونی O و A و B قابل توضیح است. این سه از لحاظ ساختاری به اجزای الیگوساکاریدی از الیگولیپیدها و گلیکوپروتئین‌های معینی بستگی دارند که روی سطح سلول‌های قرمز خون انسان و بسیاری از انواع دیگر سلول‌ها بیان می‌شوند (شکل ۲۰-۱۰). همه انسانها آنزیم هایی برای سنتز آنتی ژن O دارند. اشخاصی با گروه خونی A همچنین دارای یک آنزیم گلیکوزیل ترنسفراز هستند که یک منوساکارید تغییر یافته به نام N استیل گالاکتوز آمین را برای تشکیل آنتی ژن A به آنتی ژن O اضافه می‌کند. آنهایی که دارای گروه خونی B هستند دارای یک ترانسفراز متفاوت هستند که یک گالاکتوز اضافی برای تشکیل آنتی ژن B به آنتی ژن O اضافه می‌کند. در افرادی که دارای هر دو نوع ترانسفراز هستند هر دو آنتی ژن A و B تولید می‌شود (نوع گروه خونی AB). در آنهایی که فاقد هر دو نوع ترانسفراز هستند تنها آنتی ژن O تولید می‌شود (نوع گروه خونی O).

افرادی که سطح گلبولهای قرمز آنها فاقد آنتی ژن A یا آنتی ژن B یا هر دو نوع هستند به طور طبیعی دارای آنتی بادی‌های مخالف با آنتی ژن‌های از دست رفته در سرمشان هستند. بنابراین اگر یک شخص با گروه خونی A یا O خون گروه B را دریافت کند آنتی بادیهای ضد آنتی ژن B به سلول‌های قرمز وارد شده می‌چسبند و شروع به تخریب خواهند کند. برای جلوگیری از این گونه واکنش‌های آسیب زا، نوع گروه خونی و هماهنگی مناسب بین دهنده و گیرنده خون در همه انتقال خونها ضروری است (جدول ۲-۱۰).

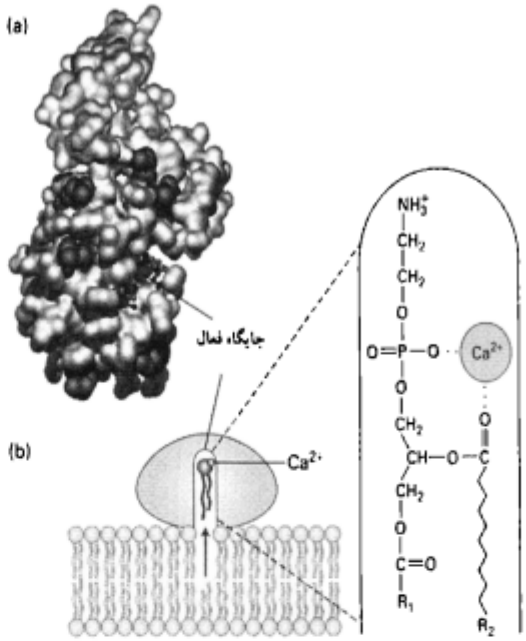
جدول ۲-۱۰.گروه‌های خونی ABO

گروه خونی	آنتی‌ژن‌های روی RBCها	آنتی‌بادی‌های سرم	انواع گروه خونی دریافت‌کننده
A	A	آنتی B	A و O
B	B	آنتی A	B و O
AB	A و B	هیچکدام	همه
O	O	آنتی A و آنتی B	O

موتیف‌های چسبیده به لیپیدها به هدفگیری پروتئین‌های محیطی به غشا کمک می‌کنند

بسیاری از آنزیم‌های محلول در آب از فسفولیپیدهای غشایی به عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند و بنابراین باید به سطح غشا متصل شوند. یک مثال از اینها فسفولیپازها هستند. بسیاری از این آنزیم‌ها برای انجام عمل کاتالیزوری در ابتدا به گروه سر قطبی فسفولیپیدهای غشایی متصل می‌شوند. توجه کنید که فسفولیپازها پیوندهای مختلفی را در گروه سر فسفولیپیدها هیدرولیز می‌کنند (شکل ۱۴-۱۰ را ملاحظه کنید). این آنزیم‌ها دارای نقش مهمی در تجزیه غشاهای سلولی آسیب دیده و مسن هستند و همچنین جزء اجزای فعال در بسیاری از سموم مارها هستند. مکانیسم فعالیت فسفولیپاز A_2 نشان می‌دهد که این قبیل آنزیم‌های محلول در آب می‌توانند به طور برگشت‌پذیر با غشاها واکنش دهند و واکنش‌ها را در بینابین یک سطح محلول آبی و لیپید کاتالیز کنند (شیمی interfacial). وقتی این آنزیم‌ها در یک محلول آبی قرار می‌گیرند جایگاه فعال آنها که حاوی Ca^{2+} است در کانال آستر شده با اسیدهای آمینه آبگریز، پنهان می‌شود. آنزیم به دو لایه فسفولیپیدی که از فسفولیپیدهای دارای بار منفی هستند با میل ترکیبی بالا می‌چسبد (مثل فسفاتیدیل کولین). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که لبه‌های اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین که دارای بار مثبت هستند در اطراف کانالهای کاتالیتیک وارد شده و دارای اهمیت خاصی در چسبیدن بینابینی‌اند. (شکل ۲۱a-۱۰). چسبیدن باعث القای یک تغییر کنفورماسیونی کوچک در فسفولیپاز A_2 می‌شود که چسبیدن به سر فسفولیپیدی را

1- Lamellae



▲ **شکل ۲۱-۱۰ (شکل رنگی). سطح چسبنده بینابینی و مکانیسم عمل فسفولیپاز A_2.** (a) مدل ساختاری آنزیم نشان‌دهنده سطحی است که با یک غشا میانکنش می‌دهد. این سطح اتصالات بینابینی شامل کناره یک اسید آمینه لیزین و آرژینین دارای بار مثبت هستند که حفره با محیط آبی رنگ محل فعالیت کاتالیتیک نشان داده شده است و سوبسترای لیپیدی (ساختار ضخیم قرمز) به آن پیوند شده است. (b) دیاگرام کاتالیز توسط فسفولیپاز A_2 در مدل غشای لیپیدی اسیدهای آمینه باردار مثبت در محل چسبنده بینابینی به گروههای قطبی باردار منفی در سطح غشا می‌چسبند. این اتصال باعث شروع تغییر کنفورماسیونی کوچک و باز شدن یک کانال آستر شده با اسیدهای آمینه آبگریز می‌شود که باعث هدایت دو لایه به محل کاتالیتیک می‌شود و یک فسفولیپید به داخل کانال حرکت می‌کند. یک یون Ca^{2+} متصل شده به آنزیم به گروه سر چسبیده و محل پیوند استری در نزدیک محل کاتالیتیک شکسته می‌شود (قرمز)

تقویت کرده و کانالهای آبگریز را باز می‌کند و یک مولکول فسفولیپید از دو لایه به داخل کانال حرکت می‌کند. Ca^{2+} متصل به آنزیم یا به فسفات گروه سر متصل می‌شود و به این وسیله محل پیوند استری در محل کاتالیتیک شکسته می‌شود (شکل ۲۱b-۱۰).

پروتئین‌ها می‌توانند توسط شوینده‌ها یا محلولهای غلیظ نمکی از غشاها حذف شوند

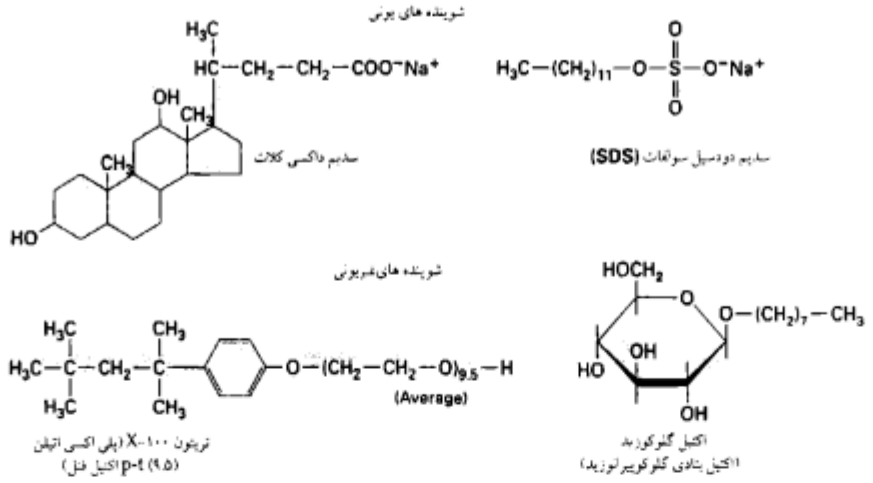
اغلب تخلیص و مطالعه پروتئین‌های غشایی مشکل است که بیشتر به دلیل اتصالات محکمشان با لیپیدهای غشایی و دیگر پروتئین‌های غشاست. این کار به میزان زیادی توسط شوینده‌ها و مولکول‌ها آمفی‌پاتیک آسانتر می‌شود؛ این مواد غشاها را توسط قرار گرفتن در بین دو لایه فسفولیپیدی می‌شکنند و لیپیدها و بسیاری از پروتئین‌های غشایی را حل می‌کنند. قسمت آبگریز یک مولکول شوینده توسط هیدروکربن جذب شده و سریعاً به هم می‌پیوندند. قسمت آبدوست به طور قوی توسط آب جذب می‌شود. بعضی شوینده‌ها محصولات طبیعی هستند ولی اغلب آنها مولکول‌های سنتزی هستند که برای شست و شو و پراکندگی مخلوط روغن و آب توسعه یافته‌اند (شکل ۲۲-۱۰).

شوینده‌های یونی از قبیل دِاُکسی کولات[1] و سدیم دودسیل سولفات[2] (SDS) یک گروه باردار دارند. شوینده‌های غیر یونی از قبیل تریتون X-۱۰۰[3] و اکتیل گلوکوزید[4] فاقد گروه بار هستند. در غلظتهای خیلی کم، شوینده‌ها در آب خالص به صورت مولکول‌های مجزا حل می‌شوند. با افزایش غلظت، مولکول‌ها به شکل میسل‌های کروی تجمع می‌یابند به شکلی که قسمت آبدوست مولکول به سمت بیرون و قسمت آبگریز در مرکز قرار می‌گیرد (شکل ۶c-۱۰ را ملاحظه کنید). غلظت بحرانی میسل[5] (CMC) در تشکیل میسل‌ها ویژگی هر دترجنتی بوده و یک عملکردی از ساختار قسمتهای آبگریز و آبدوست است.

شوینده‌های یونی به ناحیه آبگریز در معرض قرار گرفته پروتئین‌های غشایی و هسته آبگریز پروتئین‌های قابل حل در آب می‌چسبند. این شوینده‌ها هم‌چنین به دلیل داشتن بار، پیوندهای یونی و هیدروژنی را می‌شکنند. برای مثال سدیم دودسیل سولفات در غلظت‌های بالا به طور کامل پروتئین‌ها را با چسبیدن به همه زنجیره‌های جانبی دناتوره می‌کند. این مشخصه‌ای است که در الکتروفورز ژل SDS برجسته است (شکل ۳۵-۳ را ملاحظه کنید). عموماً شوینده‌های غیر یونی پروتئین‌ها را دناتوره نمی‌کنند و در استخراج پروتئین‌ها از غشا قبل از تخلیص پروتئین‌ها مفیدند. این شوینده‌ها به روش‌های متفاوتی در غلظت‌های مختلف عمل می‌کنند؛ در غلظت بالا (بالای CMC)، آنها غشاهای زیستی را با تشکیل میسل‌های مختلط از شوینده و فسفولیپید و پروتئین‌های غشایی داخل حل می‌کنند (شکل ۲۳-۱۰).

این شوینده‌ها در غلظت‌های کم (پایین CMC) به مناطق آبگریز اغلب پروتئین‌های غشایی داخلی چسبیده و آن‌ها را در محلول آبی

1- Deoxycholate 2- Deoxycholate
3- Triton x-100 4- Octylglycoside
5- Critical micelle concentration



▲ **شکل ۲۲-۱۰ (شکل رنگی) ساختار چهار نوع شوینده متعارف.** قسمت آبگریز هر مولکول به رنگ زرد نشان داده شده است. قسمت آبدوست به رنگ آبی است. نمکهای صفراوی سدیم داکسی کولات یک محلول طبیعی‌اند و بقیه سنتزی است. عموماً شوینده‌های یونی باعث دناتوراسیون پروتئین‌ها می‌شوند. و شوینده‌های غیر یونی این کار را انجام نمی‌دهند و در حل شدن پروتئین‌های غشایی داخلی مفیدند.

قابل حل می‌کنند. با تیمار سلول‌های کشت شده با یک بافر محلول نمکی شامل یک شوینده غیر یونی مثل تریتون X-۱۰۰، پروتئین‌های قابل حل در آب و پروتئین‌های غشایی داخلی استخراج می‌شود. بنابراین دُمین‌های طولی غشا از نظر اسیدهای آمینه آبگریز بدون بار غنی‌اند (شکل ۱۵-۱۰ را ملاحظه کنید) و وقتی از غشا جدا شوند قطعات آبگریز تمایل به میانکنش با همدیگر دارند. در نتیجه مولکول‌های پروتینی با هم جمع شده و از محلولهای آبی جدا می‌شوند. قسمتهای آبگریز مولکول‌های شوینده غیر یونی ترجیحاً به قطعات آبگریز پروتئین‌های گذرنده از غشاء می‌چسبند و مانع تجمع پروتئین

می‌شوند و به پروتئین‌ها اجازه می‌دهند که در محلول آبی باقی بمانند پروتئین‌های گذرنده از غشاء حل شده توسط شوینده‌ها توسط کروماتوگرافی تمایلی و دیگر تکنیک‌های مورد استفاده در تخلیص پروتئین‌های قابل حل در آب، تخلیص می‌شوند (فصل ۳).

همان طور که قبلاً بحث شد اغلب پروتئین‌های محیطی توسط میانکنش‌های یونی یا دیگر میانکنش‌های ضعیف با فسفولیپیدهای غشایی پیوند می‌شوند. عموماً پروتئین‌های محیطی توسط محلول‌های قوی یونی (غلظت نمکی بالا) که پیوندهای یونی را می‌شکنند یا توسط مواد شیمیایی که به کاتیونهای دو ظرفیتی مثل Mg^{2+} می‌چسبند از غشا قابل حذفند. به طور غیر مشابه پروتئین‌های داخلی و اغلب پروتئین‌های محیطی در محلول‌های آبی حل می‌شوند و به حل شدن توسط حلالهای غیر یونی نیازی ندارند.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۰

غشاهای زیستی: ترکیبات پروتئینی و اعمال پایه

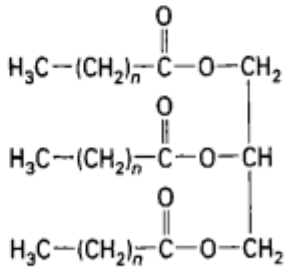
- غشاهای زیستی معمولاً دارای پروتئین‌های اینتگرال (گذرنده از غشاء) و پروتئین‌های محیطی هستند که پروتئین‌های محیطی نمی‌توانند وارد مرکز آبگریز دولایه شوند (شکل ۱-۱۰ را ملاحظه کنید)
- بسیاری از پروتئین‌های انتگرال غشاء دارای یک یا چندین بخش گذار غشایی هیدروفوب مارپیچ‌های α هستند که به دمینهای آبدوست کشیده شده در سمت سیتوزولی و اگزوپلاسمی ختم می‌گردند (اشکال ۱۵-۱۰ و ۱۶-۱۰ را ملاحظه کنید).
- زنجیره‌های جانبی اسیدهای چرب مشابه سرهای لیپیدهای غشایی به طور محکم و نامنظم در اطراف بخشهای آبگریز پروتئین‌های داخلی غشایی قرار می‌گیرند.
- تمام پروتئین‌های گذار غشایی و گلیکولیپیدها به صورت نامتقارن در دو لایه جهت‌گیری کرده‌اند؛ زنجیره‌های کربوهیدراتی به سمت سطح اگزوپلاسمی پروتئین‌ها متصل شده‌اند.
- پورین‌ها برخلاف سایر پروتئین‌های انتگرال داخلی ، حاوی صفحات β گذار غشایی هستند که یک کانال شبیه به بشکه در دو لایه تولید می‌کنند (شکل ۱۸-۱۰ را ملاحظه کنید).
- اسیدهای چرب بلند زنجیر توسط اتصال به برخی از

اسیدهای‌آمینه پروتئین‌ها در یک یا دو طرف لایه لیپیدی لنگر می‌اندازند (شکل ۱۹-۱۰ را ملاحظه کنید).

- اتصال آنزیمهای محلول در آب (مثل فسفولیپاز، کیناز یا فسفاتاز) به سطح غشا، برخی اوقات دسترسی آنزیم به سوبسترا را محدود کرده و برخی اوقات سبب فعال شدن آن می‌شود. این اتصالات معمولاً بواسطهٔ برهمکنش بین بارهای مثبت ریشه‌های بازی در پروتئین و بارهای منفی بر روی گروههای سر فسفولیپیدها در غشای دو لایه‌ای ایجاد می‌شود.
- پروتئین‌های گذار غشایی به طور انتخابی قابل حل بوده و با استفاده از دترژانت‌های غیریونی قابل تخلیص هستند.

۱۰-۳ فسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و کلسترول: سنتز و حرکت داخل سلولی

در این قسمت ما بعضی از چالش‌های خاصی که یک سلول در سنتز و انتقال لیپیدها با آنها رو به روست را بررسی می‌کنیم، این لیپیدها به طور ضعیفی در داخل محلولهای آبی سلول حل می‌شوند. ابتدا بر روی اسیدهای چرب که پیش سازهای فسفولیپیدهایی که اسکلت ساختاری غشاهای سلولی هستند متمرکز می‌شویم. اسیدهای چرب برای آزاد سازی انرژی برای عملکردهای سلولی در میتوکندری اکسید شده (فصل ۱۲) و ذخیره می‌شوند و در جریان خون ابتدا به شکل تری گلیسرید منتقل می‌شوند در تری گلیسرید سه گروه اسید چرب به یک مولکول گلیسرول استریفیه شده است. ما سنتز کلسترول را به دو دلیل مرور خواهیم کرد زیرا کلسترول یک ترکیب مهم غشایی بوده و هم چنین پیش سازی برای هورمونهای استروئیدی مثل تستوسترون و استروژن و ویتامین D که به کنترل متابولیسم کلسیم کمک می‌کند و دیگر لیپیدهای فعال از نظر زیستی می‌باشد.



Triacylglycerol

ما بحث‌مان را از بیوسنتز و حرکت لیپیدها به سمت لیپیدهای اصلی یافت شده در غشاهای زیستی و پیش سازهایشان متمرکز می‌کنیم. در بیوسنتز لیپیدها، پیش سازهای قابل حل در آب در حد فاصل ارتباطات غشایی جمع می‌شوند و سپس به تولیدات لیپیدی غشا تبدیل می‌شوند. حرکات لیپیدی، مخصوصاً ترکیبات غشایی، بین اندامکهای مختلف نکته کلیدی برای نگهداری ترکیب مناسب و خواص غشاها و ساختار کلی سلولی است. اما اطلاعات ما در مورد این قبیل انتقالات لیپیدی داخل سلولی هنوز در مرحله ابتدایی قرار دارد.

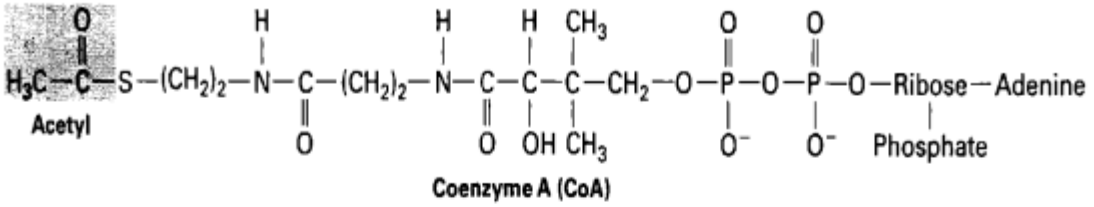
یک اصل پایه در بیوسنتز غشا این است که سلول‌ها غشاهای جدید را تنها توسط گسترش غشاهای موجود سنتز می‌کنند. گرچه بعضی مراحل اولیه در سنتز لیپیدهای غشایی در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد ولی مراحل پایانی به وسیله آنزیم هایی که به غشاهای سلولی از قبل موجود، پیوند شده‌اند کاتالیز می‌شود و محصولات همان طور که آنها تولید شده‌اند در داخل غشاها ترکیب می‌شوند. مدارک برای این پدیده وقتی سلول به طور مختصر در معرض پیش سازهای رادیو اکتیو (مثل فسفات یا اسیدهای چرب) قرار گیرد دیده شده است. همه فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدهای تشکیل دهنده این مواد با غشاهای داخل سلولی ارتباط داشته و انتظار می‌رود که از نظر آبگریز بودن زنجیره‌های اسید چرب هیچکدام در سیتوزول یافت نشوند. بعد از اینکه لیپیدهای غشا تشکیل شدند باید به طور اختصاصی در دو لایه یک غشای معین و بین غشاهای مستقل اندامکهای مختلف در سلول‌های یوکاریوت توزیع شوند. در اینجا ما روی سنتز و توزیع فسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و کلسترول تمرکز می‌کنیم و در فصل ۱۳ چگونگی قرار گرفتن پروتئین‌های غشایی در غشاهای سلولی را بحث می‌کنیم.

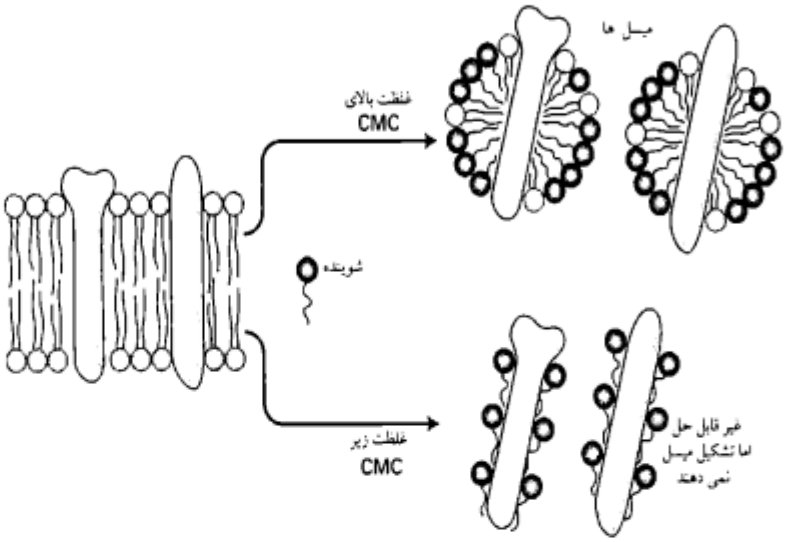
سنتز اسیدهای چرب با واسطه چندین آنزیم مهم صورت می‌گیرد

اسیدهای چرب، ترکیب کلیدی در فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها می‌باشند. آنها هم چنین عامل اتصال تعدادی پروتئین‌ها به غشاهای سلولی‌اند (شکل ۱۹-۱۰ را ملاحظه کنید). بنابراین به طور کلی تنظیم سنتز اسیدهای چرب یک نقش کلیدی در تنظیم سنتز غشا بازی می‌کند. اسیدهای چرب اصلی در فسفولیپیدها شامل ۱۴، ۱۶ و ۱۸ یا ۲۰ اتم کربن هستند و به دو صورت زنجیره‌های اشباع و غیر اشباع وجود دارند.

اسیدهای چرب از دو کربن سازنده واحد استات، CH_3COO^-، سنتز می‌شوند. در سلول‌ها، استات و میانجی‌های دیگر در سنتز اسید چرب با یک مولکول بزرگ محلول در آب به نام کوآنزیم A (CoA) استریفیه می‌شوند. یک مثال از ساختار استیل CoA به صورت زیر است:

استیل کوآیک واسطه مهم در متابولیسم گلوکز، اسیدهای





◀ شکل ۲۳-۱۰ حل شدن پروتئین‌های غشایی داخلی توسط شوینده‌های غیر یونی. یک شوینده در غلظت بالاتر از غلظت بحرانی میسل (CMC)، لیپیدها و پروتئین‌های غشایی داخلی را حل می‌کند و میسل‌های مختلط شامل مولکول‌های شوینده، پروتئین و لیپید تشکیل می‌شود. شوینده‌های غیر یونی (مثل اکتیل گلوکوزیدو تریتون X-۱۰۰) در غلظت زیر CMC، پروتئین‌های غشایی را بدون تشکیل میسل با پوشاندن مناطق طولی غشا حل می‌کنند.

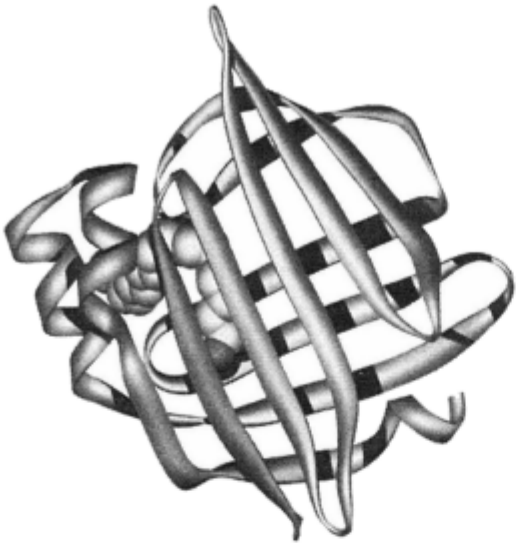
چرب و بسیاری از اسیدهای آمینه است که به طور جزئی در فصل ۱۲ شرح داده می‌شود. این ترکیب هم چنین باعث توزیع گروههای استیل در بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی می‌شود. اسیدهای چرب اشباع (بدون پیوند دوگانه) شامل ۱۴ یا ۱۶ اتم کربن توسط دو آنزیم به نام‌های استیل کوآ کربوکسیلازو اسید چرب سنتاز از استیل کوآ ساخته می‌شوند. در سلول‌های حیوانی این آنزیم‌ها در سیتوزول یافت می‌شوند و در گیاهان در کلروپلاستها وجود دارند. پالمیتوئیل CoA (گروه اسید چرب ۱۶ کربنه که به CoA متصل شده است) می‌تواند توسط اضافه شدن متوالی واحدهای دو کربنه در شبکه آندوپلاسمی (ER) یا گاهی اوقات در میتوکندری تا ۲۴-۱۸ کربن طویل شود.آنزیم‌های دساچوراز در ER قرار گرفته‌اند و پیوندهای دوگانه رادرمحلهای خاصی از بعضی از اسیدهای چرب ایجاد کرده و اسیدهای چرب غیر اشباع را به وجود می‌آورند. برای مثال اولئیل کوآ (اولئات چسبیده به CoA، جدول ۴-۲ را ملاحظه کنید) به وسیله برداشت ۲ اتم هیدروژن از استئاریل کوآ تشکیل می‌شود. در مقابل با آزاد شدن اسیدهای چرب، مشتقات اسیدهای چرب CoA در محلولهای آبی حل می‌شوند زیرا قطعه CoA آبدوست است.

پروتئین‌های سیتوزولی کوچک حرکات اسیدهای چرب را تسهیل می‌کنند

اسیدهای چرب برای انتقال آزادانه و به صورت غیر استریفیه شده از بین سیتوپلاسم سلول (اینها به CoA متصل نیستند) عموماً با پروتئین‌های متصل شونده به اسیدهای چرب (FABPs)[1] پیوند برقرار می‌کنند. FABPs به یک گروه از پروتئین‌های سیتوزولی کوچک که حرکات داخل سلولی بسیاری از لیپیدها را تسهیل می‌کنند تعلق دارند. این پروتئین‌ها شامل یک پوشش احاطه شده آبگریز با صفحات β هستند (شکل ۲۴-۱۰). یک اسید چرب با زنجیره طویل در این قسمت احاطه شده قرار می‌گیرد و به طور غیر کووالان با پروتئین اطراف میانکنش می‌دهد. بیان FABP های سلولی با احتیاجات سلولی برای جذب و رها شدن اسیدهای چرب به طور هماهنگ تنظیم می‌شود بنابراین سطح FABP در

1- Fatty - acid - binding proteins

ماهیچه‌های فعال که اسیدهای چرب را برای تولید ATP مصرف می‌کنند و در آدیپوسیت‌ها[1] (سلول‌های ذخیره کننده چربی) وقتی اسیدهای چرب را برای ذخیره به صورت تری‌گلیسریدها جذب کرده یا آنها را برای استفاده دیگر سلول‌ها رها می‌کنند بالاست. اهمیت FABP در متابولیسم اسیدهای چرب با این مشاهدات برجسته‌تر می‌شود که آنها می‌توانند بیش از ۵ درصد پروتئین‌های سیتوزولی را در کبد بسازند. همچنین غیر فعال کردن ژنتیکی FABP های ماهیچه قلبی باعث می‌شود قلب از یک ماهیچه‌ای که در درجه اول اسیدهای چرب را برای انرژی می‌سوزاند به ماهیچه‌ای تبدیل شود که در درجه اول گلوکز را بسوزاند.



▲ **شکل ۲۴-۱۰ (شکل رنگی) پیوند یک اسید چرب به بسته‌های آبگریز یک پروتئین پیوند شده به اسید چرب. (FABP).** ساختار کریستالی FABP آدیپوسیت‌ها (شکل رشته‌ای) نشان می‌دهد که بسته‌های پیوندی آبگریز از دو صفحه β تشکیل شده‌اند که حدوداً زاویه راست با همدیگر دارند و یک پوسته شبه صدفی را تشکیل می‌دهند. یک اسید چرب (کربن‌های زرد و اکسیژن قرمز) به طور غیر کووالانسی با ریشه‌های اسیدهای آمینه آبگریز این بسته‌ها واکنش می‌دهد.

ترکیب اسیدهای چرب در لیپیدهای غشایی روی غشای اندامکها انجام می‌شود

اسیدهای چرب مستقیماً به فسفولیپیدها تبدیل نمی‌شوند. در سلول‌های یوکاریوت، اسیدهای چرب ابتدا به استرهای CoA تبدیل می‌شوند. سنتز بعدی دی آسیل گلیسرو فسفولیپیدها از کو آنزیم‌های اسیل چرب، گلیسرول ۳ - فسفات و پیش سازهای گروه سر قطبی، توسط آنزیم‌های مرتبط با سطح سیتوزولی غشای ER که معمولاً در سلول‌های حیوانی شبکه آندوپلاسمی صاف است، انجام می‌شود. ER با جزئیات بیشتر در فصل‌های ۹ و ۱۳ توصیف می‌شود. میتوکندری‌ها بعضی از لیپیدهای غشایی خودشان را می‌سازند و بقیه را وارد می‌کنند.

اسفنگولیپیدها از اسفنگوزین که یک الکل آمین دار شامل یک زنجیره هیدروکربنی غیر اشباع طویل است، مشتق شده‌اند (شکل ۵-۱۰). اسفنگوزین در ER ساخته می‌شود و آغاز سنتز آن توسط همراه شدن یک گروه پالمیتوئیل از پالمیتوئیل CoA به سرین است. اضافه شدن بعدی از یک گروه اسید چرب ثانویه به شکل N- اسیل اسفنگوزین (سرامید) است که در ER قرار گرفته است. اضافه شدن بعدی از یک گروه سر قطبی به سرامید در دستگاه گلژی صورت می‌گیرد و حاصل آن اسفنگومیلین است که گروه سر آن فسفریل کولین و گلیکواسفنگولیپیدهای مختلف است. در این گروه سر، ممکن است یک منوساکارید یا تعدادی الیگوساکاریدهای مرکب وجود داشته باشد. (شکل ۵b-۱۰ را ملاحظه کنید).

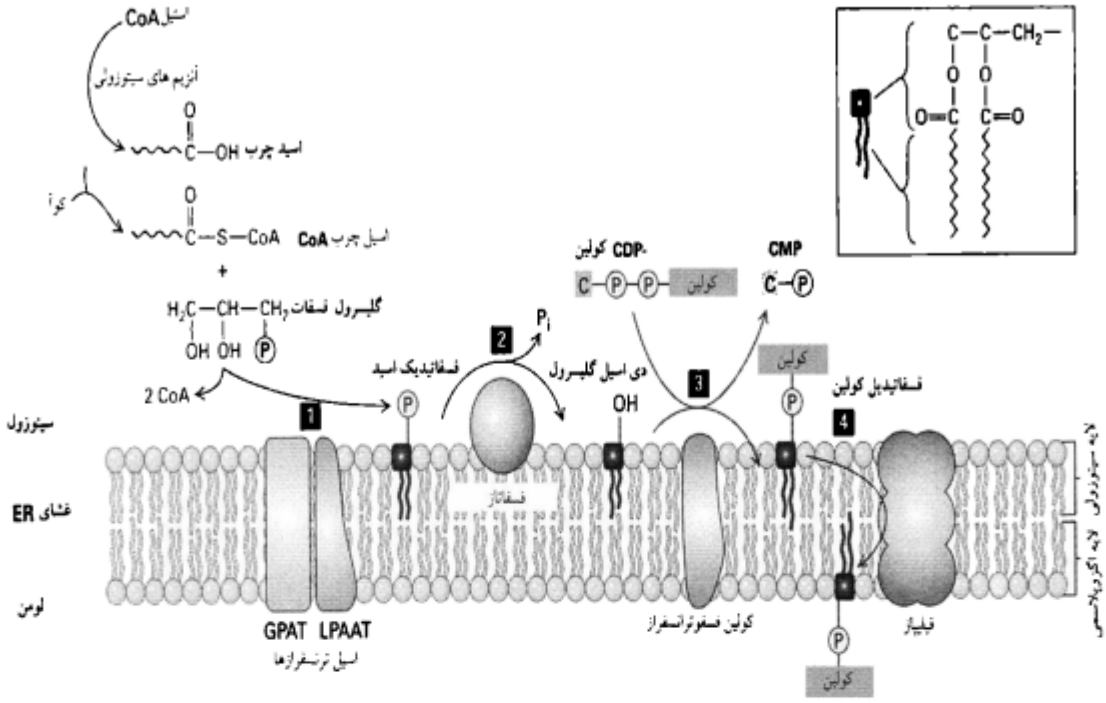
هم چنین سنتز بعضی از اسفنگولیپیدها می‌تواند در میتوکندری صورت گیرد. علاوه بر نقش سرامید به عنوان اسکلت اسفنگولیپیدها، سرامید و محصولات متابولیکی آن، مولکول‌های پیام‌رسان مهمی هستند که می‌توانند رشد سلول، تکثیر، اندوسیتوز، مقاومت در برابر استرس و آپوپتوز را تحت تأثیر قرار دهند.

بعد از اینکه سنتز اسفنگولیپیدها در دستگاه گلژی کامل شد می‌توانند از طریق وزیکولهای میانجی با مکانیسم هایی شبیه به آنچه که در فصل ۱۴ بحث می‌شود به دیگر قسمتهای سلولی منتقل شوند. در مقابل فسفولیپیدها و کلسترول با مکانیسم‌های مختلفی بین اندامک‌ها حرکت می‌کنند که در زیر توصیف می‌شود.

فیلیپاز باعث حرکت فسفولیپیدها از یک لایه غشایی به لایه مخالف می‌شوند

هر چند فسفولیپیدها ابتدا در لایه سیتوزولی غشای ER تشکیل می‌شوند ولی فسفولیپیدهای مختلف در دو لایه غشای ER و دیگر غشاهای سلولی به طور نامتقارن توزیع شده‌اند. همان طور که در بالا گفته شد حرکت زیگزاکی خود به خودی فسفولیپیدها از یک لایه به لایه دیگر بسیار کند صورت می‌گیرد. برای غشای ER که در اثر رشد دو لایه گسترش یافته است و فسفولیپیدها به طور نامتقارن توزیع شده‌اند اجزای فسفولیپیدی باید قادر باشند که به طور سریع و انتخابی

1- Adipocyte



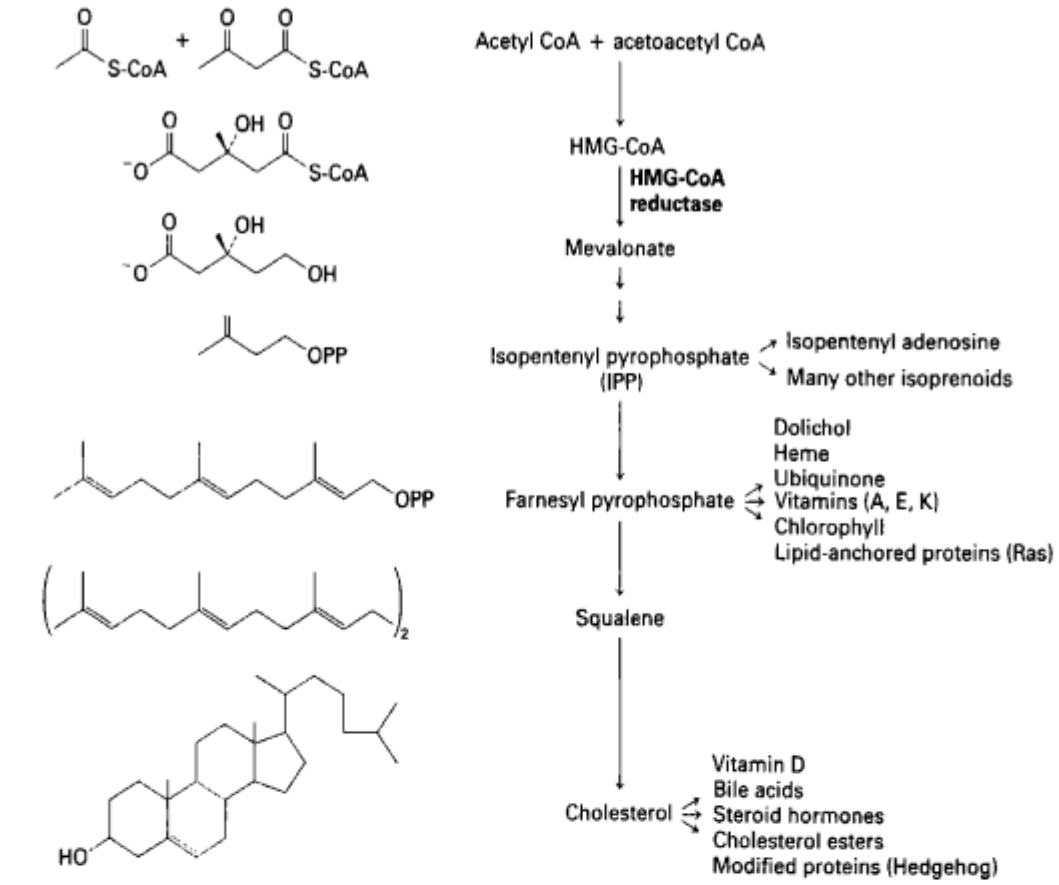
▲ **شکل ۲۵-۱۰ سنتز فسفولیپید.** به علت اینکه فسفولیپیدها مولکول‌های آمفی پاتیکی هستند آخرین مرحله از سنتز چند مرحله‌ای آنها در بینابین یک غشا و سیتوزول قرار می‌گیرد و توسط آنزیمهای در ارتباط با غشا کاتالیز می‌شود. مرحله ❶ : دواسید چرب از اسیل چرب CoA با اسکلت گلیسرول فسفریله شده استریفیه می‌شوند و فسفاتیدیک اسید تشکیل می‌دهند که دو زنجیره هیدروکربنی طویل مولکول را به غشا متصل می‌کند. مرحله ❷ : فسفاتیدیک اسید توسط یک فسفات به دی اسیل گلیسرول تبدیل می‌شود. مرحله ❸: یک گروه سر قطبی (یعنی فسفریل کولین) از سیتیدین دی فسفوکولین (CDP ـ کولین) به گروه هیدروکسیل ساخته شده منتقل می‌شود. مرحله ❹ : پروتئین فیلیپاز حرکت فسفولیپیدها از لایه سیتوزولی که در ابتدا در آن تشکیل شده‌اند را به لایه اگزوپلاسمی کاتالیز می‌کند.

حرکت زیگزاکی از یک لایه غشا به لایه دیگر انجام دهند. گرچه مکانیسم‌های به کار رفته برای تولید و حفظ عدم تقارن فسفولیپیدها به خوبی شناخته نشده است اما این واضح است که فیلیپاز یک نقش کلیدی را بازی می‌کند. همان طور که در فصل ۱۱ بحث خواهد شد این پروتئین‌های غشایی داخلی، انرژی هیدرولیز ATP را برای تسهیل حرکت مولکول‌های فسفولیپیدی از یک لایه به لایه دیگر مورد استفاده قرار می‌دهند.

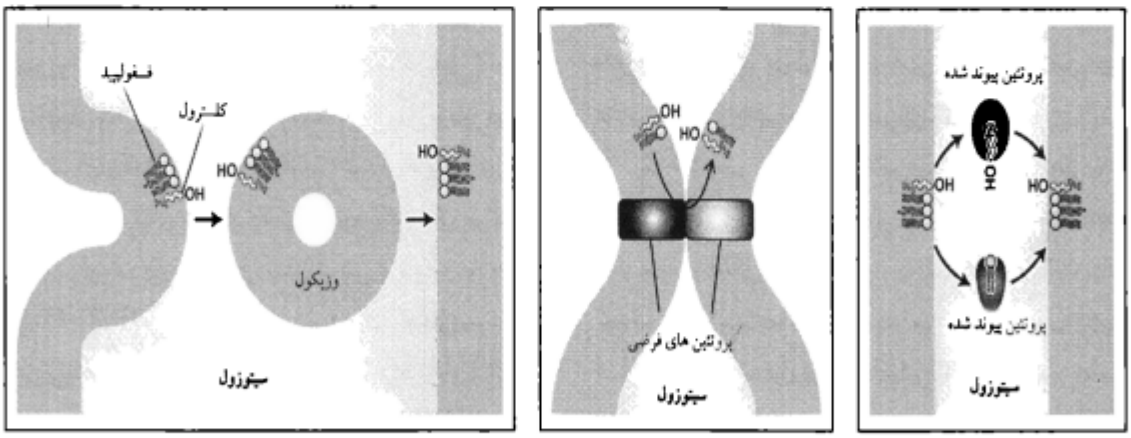
توزیع نامتقارن معمول فسفولیپیدها در لایه‌های غشایی در سلول هایی که پیر شده و دچار آپوپتوز می‌شوند (مثل سلول‌های قرمز خون) از بین می‌رود. برای مثال فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اتانول آمین ترجیحاً در لایه سیتوزولی غشاهای سلولی قرار می‌گیرند. اگر این فسفولیپیدهای آنیونی روی سطح اگزوپلاسمی غشای پلاسمایی به میزان زیادی در معرض قرار گیرند پیامی برای سلول‌های بیگانه خوار برای حذف و تخریب سلول‌های مرده و پیر هستند. آنکسین V یک پروتئینی است که به طور اختصاصی به فسفولیپیدهای آنیونی می‌چسبد و می‌تواند با فلورسانس نشان دار شده و برای آشکار سازی سلول‌های دچار آپوپتوز در سلول‌های محیط کشت و در بافت‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

کلسترول به وسیله آنزیم‌های سیتوزولی و غشای ER سنتز می‌شود

در ادامه ما روی کلسترول به عنوان پایه استرول در سلول‌های حیوانی متمرکز می‌شویم. در اولین مرحله سنتز کلسترول (شکل ۲۶-۱۰)، سه گروه استیل کوآی (استیل CoA) چسبیده به هم تغییر کرده و مولکول ۶ کربنی β ـ هیدروکسی β ـ متیل گلوتاریل کوآ (HMG-CoA) را تشکیل می‌دهد که محل آن در سیتوزول است. تبدیل HMG-CoA به موالونات مرحله کلیدی کنترل کننده سرعت بیوسنتز کلسترول است و به وسیله HMG-CoA ردوکتاز



▲شکل ۲۶-۱۰ مسیر بیوسنتز کلسترول. مرحله تنظیم‌کننده کنترل سرعت در بیوسنتز کلسترول تبدیل β - هیدروکسی β- متیل گلوتاریل A (HMG-CoA) به موالونیک اسید توسط HMG-CoA ردوکتاز که یک پروتئین غشای ER است می‌باشد. سپس موالونات به ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) که دارای ساختار ایزوپرونوئیدی با پنج کربن پایه است تبدیل می‌شود. IPP می‌تواند به کلسترول و بسیاری از لیپیدهای دیگر تبدیل شود. اغلب حد واسطهای پلی ایزوپرنوئیدی در اینجا نشان داده شده‌اند. بعضی از ترکیبات متعدد مشتق از حد واسطهای ایزوپرنوئیدی و خودکلسترول هم نشان داده شده است.



▲شکل ۲۷-۱۰ مکانیسم‌های پیشنهادی برای انتقال کلسترول و فسفولیپید ها بین غشا ها. در مکانیسم (a) وزیکول‌ها، لیپید ها را بین غشا منتقل می‌کنند. در مکانیسم (b) انتقال لیپید نتیجه تماس مستقیم بین غشاهایی است که توسط پروتئین‌های فرورفته در غشا میانجی می‌شوند. در مکانیسم (c) انتقال با واسطه پروتئین‌های کوچک و قابل حل که انتقال لیپید را بر عهده دارند صورت می‌گیرد.

که یک پروتئین غشایی داخلی ER است، کاتالیز می‌شود. با وجود اینکه سوبسترا و محصول این آنزیم هر دو محلول در آب هستند ولی

دُمین کاتالیتیک محلول در آب HMG-CoA ردوکتاز به داخل سیتوزول امتداد یافته است. در حالیکه هشت مارپیچ آلفا گذرنده ازغشاء به طور محکم آنزیم را در غشای ER فرو می‌برد. مارپیچ آلفا گذرنده از غشاء دُمین حساس به استرول را تشکیل داده و فعالیت آنزیم را تنظیم می‌کنند.

وقتی سطح کلسترول در غشای ER بالا است اتصال کلسترول به این دُمین باعث می‌شود پروتئین به دو پروتئین دیگر داخلی غشای ER به نام‌های Insig-1 و Insig-2 بچسبند. اینها به ترتیب باعث القای همزمان HMG-CoA ردوکتاز و تجزیه آن توسط مسیرهای پروتئوزومی می‌شود و تولید موالونات را کاهش می‌دهد که یک میانجی کلیدی در بیوسنتز کلسترول است.

مسدود شدن سرخرگ وابسته به کلسترول **آترواسکلروزیس**[1] نامیده می‌شود که به عنوان رسوب پیش رونده کلسترول و دیگر لیپیدها، سلول‌ها و مواد ماتریکس خارج سلولی در غشای داخلی دیواره یک سرخرگ توصیف می‌شود. نتیجه آن تغییر شکل دیواره سلولی است که به تنهایی یا همراه بالخته خون باعث گرفتگی بخش زیادی از جریان خون می‌شود. آترواسکلروزیس جزء ۷۵٪ از مرگهای وابسته به بیماری‌های قلبی ـ عروقی در آمریکا به حساب می‌آید.

کلسترول بیشتر در کبد سنتز می‌شود. شاید موفق‌ترین داروهای‌ضد آترواسکلروزیس استاتین‌ها[2] هستند. این داروها به HMG-CoA ردوکتاز چسبیده و مستقیماً فعالیت آن را مهار می‌کنند که در نتیجه آن، بیوسنتز کلسترول کاهش می‌یابد. در نتیجه مقدار لیپوپروتئین‌های با دانسیته کم کاهش می‌یابد. این لیپوپروتئین‌ها ذراتی احاطه شده با غشا هستند که شامل کلسترول استریفیه شده با اسیدهای چرب است که اغلب و به طور صحیح «کلسترول بد» نامیده می‌شوند. افزایش این لیپوپروتئین در خون است که باعث القای تشکیل پلاکهای آترواسکلروتیک می‌شوند.

موالونات یک محصول شش کربنی است که به وسیله HMG-CoA ردوکتاز تشکیل می‌شود و طی چندین مرحله به ایزوپرنوئید ۵ کربنی مرکب از ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP) و ایزومر آن یعنی، دی متیل آلیل پیروفسفات (DMPP) تبدیل می‌شود (شکل ۲۶-۱۰ را ملاحظه کنید). این واکنش‌ها توسط آنزیم‌های سیتوزولی کاتالیز می‌شوند. متراکم شدن شش واحد IPP، اسکوآلن را تولید می‌کند که یک حد واسط با زنجیره منشعب ۳۰ کربنی است. آنزیم‌های متصل شده به غشای ER واکنش‌های زیادی را کاتالیز می‌کنند که باعث تبدیل اسکوآلن به کلسترول در پستانداران یا استرولهای وابسته در گونه‌های دیگر می‌شود. یکی از حد واسطها در این مسیر فارنسیل پیروفسفات است که پیش ساز لیپید پرنیل می‌باشد. پرنیل لنگر پروتئین Rab و پروتئین‌های وابسته به سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی است (شکل ۱۹-۱۰ را ملاحظه کنید). فارنسیل پیروفسفات هم چنین پیش سازها مولکول‌های زیستی مهم دیگری هم می‌باشد (شکل ۲۶-۱۰ را ملاحظه کنید).

کلسترول و فسفولیپید ها توسط چندین سیستم بین اندامک‌ها جابه جا می‌شوند

باتوجه به گفته‌های کنونی، مرحله پایانی در سنتز کلسترول و فسفولیپید ها در ER قرار دارد گرچه بعضی از این لیپیدهای غشایی (پلاسمالوژنها) در میتوکندری و پراکسیزوم ها تولید می‌شوند. بنابراین غشای پلاسمایی و دیگر اندامکهای محدود شده با غشاء باید این لیپید ها را به وسیله یک یا تعداد بیشتری فرایندهای انتقالی داخل سلولی به دست آورند. لیپیدهای غشایی با پروتئین‌های غشایی و قابل حل در طول مسیر ترشحی جفت می‌شوند که در فصل ۱۴ توضیح داده می‌شود. وزیکولهای غشا از ER جوانه می‌زنند (شکل ۱۰a-۲۷) و در دستگاه گلژی به غشاها می‌پیوندند و دیگر وزیکول‌های غشایی که از دستگاه گلژی جوانه می‌زنند به غشای پلاسمایی می‌پیوندند. بنابراین چند دسته از مدارک پیشنهاد می‌کند که حرکت بین اندامکی کلسترول و فسفولیپید ها با مکانیسم‌های دیگری وجود دارد. برای مثال مهارکننده‌های شیمیایی مسیر ترشح کلاسیک و جهش‌هایی که مانع حرکت وزیکولی در این مسیر می‌شوند مانع انتقال بین غشایی کلسترول یا فسفولیپید ها نمی‌شود.

یک مکانیسم ثانویه باعث تماس مستقیم پروتئین‌های حد واسط غشاهای ER یا مشتق شده از ER با غشاهای اندامک‌های دیگر می‌شود (شکل ۱۰-۲۷b). در مکانیسم سومی پروتئین‌های کوچک حمل‌کننده لیپید، مبادله فسفولیپید ها یا کلسترول را بین غشاهای مختلف تسهیل می‌کنند (شکل ۱۰-۲۷c). اگرچه این قبیل انتقال پروتئینی در سنجش‌هایی که در محیط آزمایشگاهی[3] صورت گرفته تعیین شده است ولی نقش آن ها در حرکات داخل سلولی اغلب فسفولیپیدها به خوبی مشخص

1- Atherosclerosis 2- Statin
3-Invitro

نشده است. برای مثال، یک جهش حذفی[1] در ژن رمزدهی‌کننده پروتئین انتقال دهنده فسفاتیدیل کولین نشان‌دهنده حالت طبیعی در اکثر موارد است و نشان می‌دهد که این پروتئین برای متابولیسم فسفولیپیدهای سلولی ضروری نیست. همان طور که قبلاً گفته شد اجزای لیپیدی از غشاهای اندامک‌های مختلف به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوتند (جدول ۱ـ۱۰ را ملاحظه کنید). بعضی از این اختلافات به محل‌های مختلف سنتزی بستگی دارند. برای مثال یک فسفولیپید به نام **کاردیولیپین** که در غشا میتوکندری متمرکز شده است تنها در میتوکندری ساخته می‌شود و به میزان کمی به دیگر اندامک‌ها منتقل می‌شود. انتقال متفاوت لیپیدها در تعیین ترکیبات لیپیدی غشاهای سلولی مختلف نقش دارند. برای مثال با وجود اینکه کلسترول در ER ساخته می‌شود غلظت کلسترول (نسبت مولار کلسترول به فسفولیپید) در حدود ۱۳ـ۱/۵ برابر در غشاهای پلاسمایی نسبت به دیگر اندامک‌ها (ER، گلژی، میتوکندری و لیزوزوم) بیشتر است. گرچه مکانیسم‌های مسئول در تثبیت و نگهداری این اختلافات به خوبی درک نشده‌اند ولی می‌بینیم که ترکیبات لیپیدی خاص در هر غشا، تأثیر اصلی بر روی ویژگی‌های فیزیکی و زیستی آن دارد.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۰

فسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و کلسترول: سنتز و حرکت داخل سلولی

- انواع مختلف اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع با طول‌های مختلف جزء ترکیبات فسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها، و تری‌اسیل گلیسرول‌ها می‌باشند.
- اسیدهای چرب توسط آنزیم‌های محلول در آب از استیل کو آنتز شده و توسط طویل شدن و غیراشباع شدن در شبکهٔ آندوپلاسمی (ER) تغییر پیدا می‌کنند.
- مراحل آخر در سنتز گلیسرو فسفولیپیدها، پلاسمالوژن‌ها، و اسفنگولیپیدها توسط آنزیم‌های مرتبط با غشاء که در ابتدا بر روی سطح سیتوزولی ER قرار گرفته‌اند کاتالیز می‌شود.
- هر نوع لیپیدی به‌طور اولیه در غشاهای از قبیل موجودی که آن را ساخته است مشارکت می‌کند.
- بسیاری از انواع فسفولیپیدها در هر دو سطح اگزوپلاسمی یا سیتوزولی غشاء پراکنده شده‌اند. این عدم تقارن به علت عملکرد فسفولیپید فلیپازها در غشاء می‌باشد.
- مراحل اولیه بیوسنتز کلسترول در سیتوزول روی می‌دهد در حالی که مراحل آخر توسط آنزیم‌های مرتبط با غشاء ER کاتالیز می‌شوند.
- مرحله کنترل‌کنندهٔ سرعت در بیوسنتز کلسترول توسط آنزیم HMG-CoA ردوکتاز کاتالیز می‌شود که قسمت‌های گذار غشایی آن در غشای ER قرار گرفته و دارای دمین حساس به استرول است.
- شواهد نشان می‌دهند که انتقال غیروابسته به گلژی وزیکول‌ها، برهم‌کنش‌های مستقیم به واسطهٔ پروتئین بین غشاهای مختلف، حاملین محلول پروتئینی یا هر سه مورد در انتقال داخل ارگانلی کلسترول و فسفولیپیدها نقش دارند.

چشم اندازی به آینده

یک سؤال اساسی در مورد زیست‌شناسی لیپید ها به تولید، نگهداری و عملکرد توزیع نامتقارن لیپید ها در لایه‌های یک غشا و اختلاف در ترکیب لیپیدی غشاها در اندامکهای مختلف مربوط است. مکانیسم‌های اساسی در این پیچیدگی ها چیست و چرا این پیچیدگی ها موردنیاز است؟ هم اکنون می‌دانیم که لیپیدهای معین می‌توانند به طور اختصاصی با پروتئین‌ها برهم کنش داده و فعالیت بعضی از آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. برای مثال پروتئین‌های چند زیرواحدی بزرگ فسفریلاسیون اکسیداتیو در غشای داخلی میتوکندری ها در یک ابرکمپلکس به هم می‌پیوندند واستحکام آن ها بستگی به ویژگی‌های فیزیکی و چسبیدن فسفولیپیدهای خاص مثل کاردیولیپین دارد.

بحث‌های اصلی در مورد وجود رفتهای لیپیدی درغشاهای زیستی و عملکرد آنها در پیام‌رسانی سلول است. بسیاری از مطالعات بیوشیمیایی از غشاهای مدل برای نشان دادن ترکیب جانبی پایدار اسفنگولیپید ها و کلسترول (رفتهای لیپید) استفاده کرده‌اند که می‌توانند انتخاب میانکنش پروتئین - پروتئین را با خارج کردن یا داخل کردن یک پروتئین آسان کنند. اما اینکه آیا رفتهای لیپیدی در غشاهای زیستی طبیعی وجود دارند یا خیر، در حال بررسی است. بخشی از مشکلات در این مطالعات این است که این رفتها اگر به راستی وجود دارند ساختار آن ها تعریف نشده است و برای مطالعه توسط میکروسکوپ فلورسنت بسیار کوچک هستند. نشان دادن موجودیت رفتها در درون سلول نیاز به پیشرفت‌های جدید بیوفیزیکی و ابزارهای میکروسکوپی دارد.

علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در یافته هایمان از متابولیسم

1- Knockout

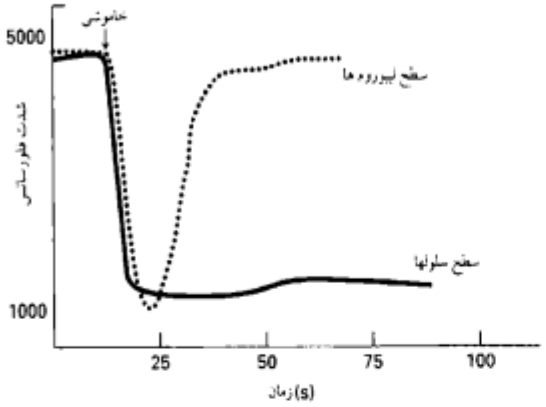
سلولی و حرکات لیپید ها، مکانیسم‌های انتقال کلسترول و فسفولیپید ها بین غشاهای اندامک ها به طور ضعیفی تعیین ویژگی شده است. مخصوصاً فاقد اطلاعات جزئی در مورد اینکه چگونه پروتئین‌های انتقالی مختلف، لیپید ها را از یک لایه غشایی به لایه دیگر (فعالیت فیلیپاز) و به داخل یا خارج سلول ها جابه جا می‌کنند می‌باشیم. این قبیل اطلاعات بدون شک نیاز به تعیین ساختار این مولکول ها با قدرت تفکیک بسیار بالا، به دام افتادنشان در مراحل مختلف فرایندهای انتقال، سینتیک دقیق و دیگر آنالیزهای بیوفیزیکی از عملکردشان دارد که با بحث فصل ۱۱ در مورد نشان دادن عملکرد کانال‌های یونی و پمپ‌های مصرف‌کننده ATP مشابه است.

مدارک اخیر در مورد حل و کریستاله کردن پروتئین‌های غشایی داخلی باعث رسیدن به طرحی از ساختار مولکولی انواع بسیار مهم پروتئین ها مثل کانال‌های یونی، پمپ‌های یونی مصرف‌کننده ATP و آکواپورین‌ها شده است که در فصل ۱۱ خواهیم دید. بنابراین رده‌های بسیار مهم پروتئین‌های غشایی حتی این نزدیکی‌های جدید را هم لغو می‌کند. برای مثال فاقد ساختاری از یک پروتئین هستیم که گلوکز را به داخل یک سلول یوکاریوتی منتقل می‌کند. در فصل ۱۵ و ۱۶ رده‌های زیادی از گیرنده‌های طولی غشا پلاسمایی را که دارای یک یا تعداد بیشتری آلفا هلیکس هستند می‌آموزیم. شاید باعث شگفتی باشد که ما فاقد ساختار مولکولی از قطعات ناقل غشایی رسپتورهای سطح سلولی یوکاریوتی هستیم و بسیاری از جنبه‌های عملکردی این پروتئین ها هنوز کشف نشده‌اند. توضیح دادن ساختار ملکولی این ها و بسیاری از انواع دیگر پروتئین‌های غشایی جنبه‌های زیادی از زیست‌شناسی سلولی و مولکولی را مشخص خواهد کرد.

تجزیه و تحلیل داده ها

رفتار گیرنده X[1] (XR) که یک پروتئین ناقل غشایی بوده و در غشای پلاسمایی سلول‌های پستانداران وجود دارد مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین مهندسی شده یک پروتئین الحاقی شامل پروتئین فلورسانس سبز[2] (GFP) در قسمت N انتهایی است. GFP-XR یک پروتئین عملکردی است و در سلول می‌تواند جایگزین XR شود.

الف. سلول‌های بیان‌کننده GFP-XR یا وزیکول‌های لیپیدی مصنوعی (لیپوزوم‌ها) حاوی GFP-XR سوژه‌ای برای بهبود فلورسانس بعد از خاموشی نوری (FRAP) است. شدت فلورسانس از یک قسمت کوچک روی سطح سلول ها (خط ضخیم) یا روی سطح لیپوزوم ها (نقطه چین‌ها) قبل و در ادامه خاموشی با لیزر (فلش) اندازه‌گیری می‌شود. اطلاعات در زیر نشان داده شده‌اند. چه توضیحی برای رفتار مختلف GFP-XR در لیپوزوم ها در مقابل رفتار آن ها در غشا پلاسمایی یک سلول وجود دارد؟

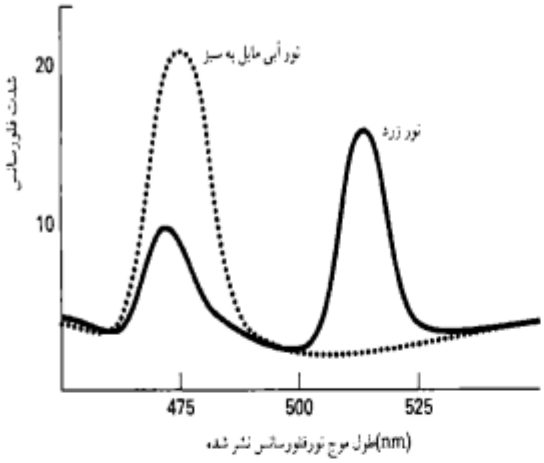


ب. ذرات باریک طلا می‌توانند به مولکول‌های تکی بچسبند و حرکاتشان در یک میکروسکوپ نوری به وسیله ردیابی ذرات منفرد قابل پیگیری است. با این روش رفتار پروتئین‌های منفرد در یک غشا قابل مشاهده است. ردیابی تولیدات در طول دوره مشاهده پنج ثانیه‌ای توسط یک ذره طلای چسبیده به XR که در یک سلول (چپ) یا در یک لیپوزوم (وسطی) حضور دارد و یا به XR چسبیده به اسلایدهای میکروسکوپی (راست) در زیر نشان داده شده است. چه اطلاعات اضافی از این اطلاعات علاوه بر آنچه از اطلاعات FRAP به دست آمده، فراهم می‌شود؟

ج. انتقال انرژی رزونانس فلورسانس[3] (FRET)، تکنیکی است که یک مولکول فلورسانس با طول موج اختصاصی از نور برانگیخته می‌شود و می‌تواند انرژی منتشره را منتقل کند و باعث برانگیختگی یک مولکول فلورسانس در آن نزدیکی شود (شکل ۱۴ـ۱۵ را ملاحظه کنید). پروتئین فلورسانس آبی متمایل به سبز[4] (CFP) و پروتئین فلورسانس زرد[5] (YFP) به گروه

1-Receptor X
2-Green fluorescance protein
3-Fluorescence resonance energy transfer
4-Cyan flourscence protein
5-Yellow flourescence protein

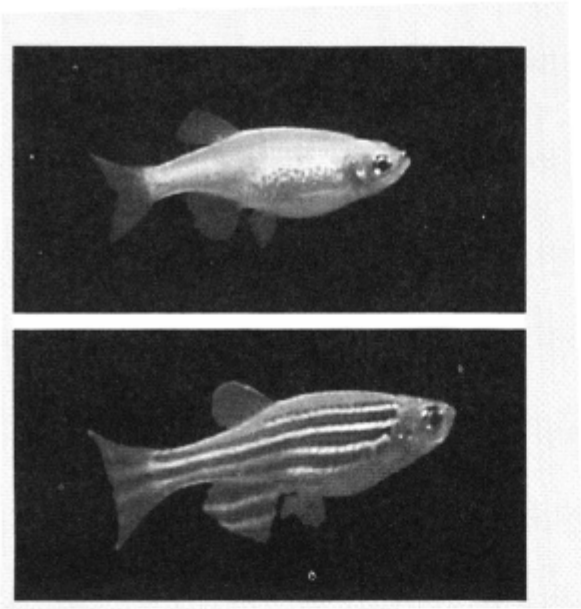
GFP ها مربوط می‌شوند ولی فلورسانس در طول موج‌های زرد و آبی متمایل به سبز نسبت به رنگ سبز کمتر است. اگر CFP با طول موج اختصاصی از نور برانگیخته شود و یک مولکول YFP خیلی به آن نزدیک باشد انرژی می‌تواند از CFP نشر شده منتقل شود و برای برانگیختن YFP مورداستفاده قرار گیرد. توسط از دست رفتن نشر فلورسانس آبی متمایل به سبز و افزایش در نشر فلورسانس زرد نشان داده می‌شود. CFP-XR و YFP-XR با همدیگر در یک رده سلولی بیان می‌شود یا هر دو در داخل لیپوزوم ها ترکیب می‌شوند. تعداد مولکول‌های YFP-XR و CFP-XR در هر cm^2 از غشا در سلول ها و لیپوزوم ها برابرند. سپس سلول ها و لیپوزوم ها با طول موجی از نور که باعث فلورسانس CFP می‌شود ولی باعث فلورسانس YFP نمی‌شود پرتودهی می‌شوند. مقدار فلورسانس آبی متمایل به سبز (CFP) و زرد (YFP) که به وسیله سلول ها (خطوط تیره) یا لیپوزوم ها (نقطه چین) نشر می‌شود تصویری شده و در زیر نشان داده شده است.



چه اطلاعاتی از این داده ها در مورد XR می‌توان استنتاج کرد؟

فصل ۱۱

انتقال یون‌ها و مولکول‌های کوچک از غشاء



(شکل رنگی) مطالعه ماهی‌های جهش یافته زبرا (zebrafish) با خط‌های زرد کمرنگ باعث شناسایی انتقال‌دهندهٔ سدیم کلسیم شد که تنظیم‌کنندهٔ تیرگی پوست انسان نیز می‌باشد.

رئوس مطالب

۱-۱۱ مرور کلی بر انتقال غشایی

۲-۱۱ تک انتقالی گلوکز و آب

۳-۱۱ پمپ‌های مصرف کنندهٔ ATP و محیط یونی داخل سلولی

۴-۱۱ کانالهای یونی بدون دریچه و پتانسیل استراحت غشاء

۵-۱۱ هم انتقالی توسط ناقل‌های همسو و ناهمسو

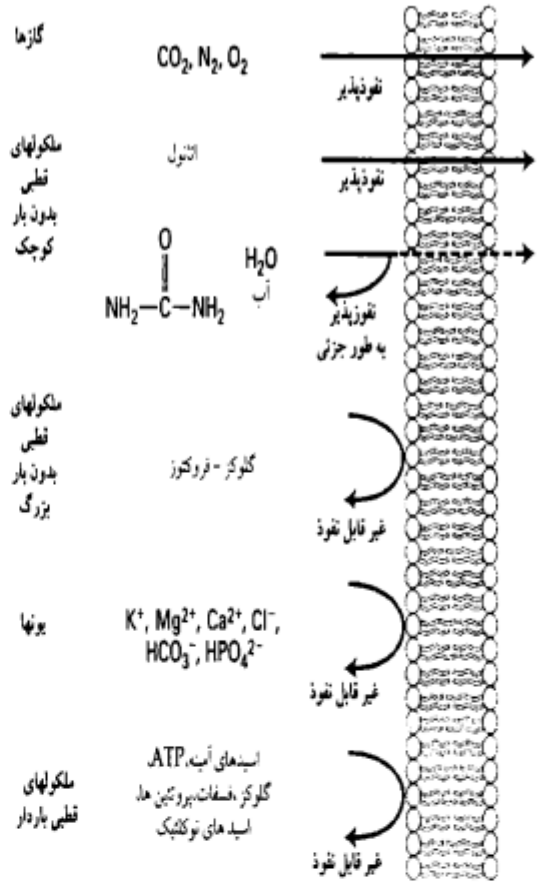
۶-۱۱ انتقال ترانس اپیتلیالی

در همهٔ سلول‌ها، غشاء پلاسمایی یک سد نفوذپذیر را تشکیل می‌دهد که سیتوزول را از محیط خارجی جدا می‌کند. بنابراین غشاء از نظر شکل‌شناسی و بیوشیمیایی یک سلول را مشخص کرده و آن را از محیط احاطه‌کننده خود متمایز می‌سازد. این سد نفوذپذیر غشای پلاسمایی اجازهٔ ورود مواد غذایی ضروری را به سلول داده و باعث می‌شود میانجی‌های متابولیکی در سلول یعنی جایی که به آن تعلق دارند باقی بمانند و تولیدات زائد از سلول خارج شوند. غشای پلاسمایی با جلوگیری از حرکات آزادانهٔ مولکول‌ها به داخل و خارج سلول، اختلافات ضروری بین اجزای مایع خارج سلولی و سیتوپلاسم را حفظ می‌کند. برای مثال غلظت NaCl (کلرید سدیم) در خون و مایع خارج سلولی جانوران عموماً بالای ۱۵۰mM است و مشابه آن تصور می‌شود که این شوری آب در سلول‌ها هم ظاهر شود با اینکه غلظت Na^+ در سیتوپلاسم ده‌ها بار پایین‌تر است. در مقابل غلظت یون پتاسیم در سیتوپلاسم بالاتر از محیط بیرون است.

غشای پلاسمایی همانند همهٔ غشاءهای سلولی، شامل یک دولایهٔ فسفولیپیدی است که در داخل این دولایه، پروتئین‌ها و دیگر لیپیدها قرار گرفته‌اند. اگر غشای پلاسمایی فقط یک دولایهٔ فسفولیپیدی خالص بود به صورت یک سد شیمیایی عالی عمل می‌کرد و به طور حیاتی مانع نفوذ همهٔ یون‌ها، اسیدهای آمینه، قندها و دیگر ملکول‌های قابل حل در آب که به طور انتخابی از سلول خارج یا به آن داخل می‌شوند، می‌گردید. در حقیقت تنها تعداد کمی از گازها و ملکول‌های کوچک بدون بار به سهولت از بین غشای لیپیدی خالص می‌توانند منتشر شوند (شکل ۱-۱۱). بنابراین نه تنها غشای پلاسمایی باید به عنوان یک سد عمل کند بلکه باید نقش‌های متناقضی هم بازی کند. غشاها باید انتقال انتخابی مواد و اطلاعات بین فضاهای داخلی و خارجی سلول را که اغلب مستلزم تنظیم ورود و خروج بسیاری از ملکول‌های زیستی کوچک گوناگون، یون‌ها و آب می‌باشد فراهم کنند.

پروتئین‌های غشایی داخلی، **پروتئین‌های انتقالی**[1] نامیده می‌شوند و در غشای پلاسمایی و دیگر غشاهای داخل سلولی با چند دُمین گذار

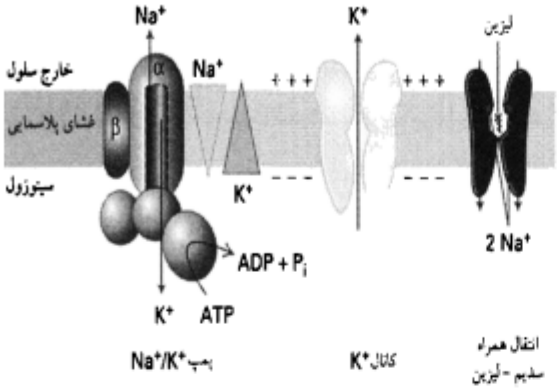
1- Transport proteins



▲ **شکل ۱-۱۱ نفوذپذیری نسبی دو لایه فسفولیپیدی خالص برای مولکول‌های مختلف.** یک دولایه‌ای نسبت به مولکول‌های آبگریز و مولکول‌های قطبی بدون بار نفوذپذیر است و تا اندازه‌ای نسبت به آب و اوره هم نفوذپذیر است ولی برای یون‌ها و ملکول‌های قطبی بزرگ کاملاً نفوذناپذیر است.

غشایی جای گرفته و انتقال کنترل شده و انتخابی مولکول‌ها و یون‌ها را از طریق غشاء فراهم می‌کنند. در بعضی موارد این پدیده مستلزم حرکت ملکول‌ها از غلظت بالا به غلظت پایین می‌شود که از نظر ترمودینامیکی به طور خود به خودی انجام شده و نیاز به مصرف انرژی ندارد. مثال‌هایی از این، حرکت آب یا گلوکز از خون به داخل سلول‌های بدن است.

در بعضی موارد دیگر، ملکول‌ها باید به صورت سربالایی[1] (برخلاف شیب غلظت) از بین غشاء حرکت کنند که از نظر ترمودینامیکی فرایندی نامطلوب است و تنها وقتی رخ می‌دهد که یک منبع خارجی انرژی موجود باشد. مثالی از آن، تغلیظ پروتون‌ها در داخل لیزوزوم‌ها برای تولید pH پایین در لومن است. این انرژی اغلب به وسیله همراهی مکانیکی انرژی آزاد شدهٔ ناشی از هیدرولیز



▲ **شکل ۲-۱۱ چندین پروتئین انتقالی در غشای پلاسمایی سلول‌های متازون (پرسلولی‌ها) با همدیگر همکاری می‌کنند.** شیب‌ها توسط پیکان‌هایی با انتهای تیز به سمت غلظت پایین نشان داده‌اند. **Na^+ / K^+ ATPase** در غشای پلاسمایی، انرژی رها شده توسط هیدرولیز ATP را برای پمپ کردن Na^+ به خارج و K^+ به داخل سلول مورد استفاده قرار می‌دهد که باعث ایجاد شیب غلظت Na^+ بزرگتر در بیرون نسبت به درون و شیب غلظت K^+ بزرگتر در داخل نسبت به خارج می‌شود. حرکت یون‌های K^+ دارای بار مثبت به بیرون سلول از طریق پروتئین‌های **کانال پتاسیمی** غشاء باعث ایجاد پتانسیل الکتریکی در طول غشای پلاسمایی می‌شود. سطح سیتوزولی نسبت به سطح خارجی سلول منفی است. **یک انتقال‌دهندهٔ سدیم - لیزین** که یک انتقال‌دهندهٔ **تیپیک سدیم - اسید آمینه** است یون‌های سدیم را همراه با لیزین از خارج سلول به داخل منتقل می‌کند. حرکت سربالایی اسید آمینه به وسیله حرکت سرپایینی یون‌های سدیم تأمین می‌شود که توسط شیب غلظت Na^+ که در بیرون بزرگتر از داخل است و پتانسیل منفی در طرف داخلی غشاء سلولی که یون‌های سدیم دارای بار مثبت را جذب می‌کنند تقویت می‌شود. منبع نهایی انرژی محرکه جذب اسید آمینه از هیدرولیز ATP توسط $Na^+/K+$ ATPase تأمین می‌شود که این پمپ شیب غلظت یون Na^+ و هم چنین پتانسیل غشایی را از طریق کانال‌های K^+ ایجاد می‌کند که با همدیگر نیروی جریان یون‌های Na^+ را ایجاد می‌کنند.

پیوندهای انتهایی فسفوانیدریدی ATP تأمین می‌شود که این قبیل انتقال دهنده‌ها، **پمپ‌های مصرف‌کنندهٔ ATP**[2] نامیده می‌شوند. وقتی این پمپ‌ها یون‌هایی مثل Na^+ و K^+ را منتقل کنند در سراسر غشاء یک شیب الکتریکی یا پتانسیل و هم چنین یک شیب غلظت شیمیایی را به وجود می‌آورند. انرژی ذخیره شده در این

1- Uphill
2- ATP - powered pump

شیب‌ها متعاقباً برای انجام کار یا تبادل اطلاعات استفاده می‌شود. دیگر پروتئین‌های انتقالی، حرکت خلاف شیب غلظت یک ملکول یا یون را با حرکت مولکول‌ها در جهت شیب غلظتی جفت می‌کنند که انرژی آزاد شده از حرکت در جهت شیب غلظت یک ملکول یا یون، به طور ترمودینامیکی انرژی حرکت سربالایی مولکول دیگر را تأمین می‌کند.

درنتیجه، چندین نوع مختلف از پروتئین‌های انتقالی به طور هماهنگ برای رسیدن به عملکردهای فیزیولوژیکی همکاری می‌کنند. یک مثال از آن در شکل ۲-۱۱ دیده می‌شود. در اینجا یک پمپ انتقالی مصرف‌کنندهٔ ATP، Na^+ را از سلول خارج و K^+ را داخل می‌کند. این پمپ، شیب‌های غلظتی متضادی از یون‌های Na^+ و K^+ را در دو طرف غشاء پلاسمایی ایجاد می‌کند. ژنوم انسان صدها نوع مختلف از پروتئین‌های انتقالی را کد می‌کند که انرژی ذخیره شده در شیب غلظت Na^+ و پتانسیل الکتریکی را مصرف می‌کنند تا انواع وسیعی از مولکول‌ها را برخلاف شیب غلظت‌شان به داخل سلول منتقل کنند. ما بحث‌مان را با مرور بعضی اصول عمومی انتقال از بین غشاء و تفاوت‌های بین سه گروه اصلی پروتئین‌های انتقالی شروع می‌کنیم. در قسمت‌های بعدی ساختار و عملکرد نمونه‌های خاصی از هر گروه را توصیف خواهیم کرد و نشان می‌دهیم که چگونه اعضای خانواده‌های پروتئین‌های انتقالی همسان دارای خاصیت‌های متفاوتی هستند که آنها را قادر می‌کند تا در انواع سلول‌های مختلف به طور اختصاصی عمل کنند. ما هم چنین شرح خواهیم داد که چگونه غشاءهای تحت سلولی (اندامکها) شامل ترکیبات خاص پروتئین‌های انتقالی می‌شوند که این ترکیبات سلول‌ها را قادر به حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی ضروری مثل حفظ pH سیتوزولی، تجمع ساکاروز و نمک در وزیکول‌های سلول‌های گیاهی و جریان مستقیم آب در گیاهان و جانوران می‌کند. سلول‌های اپیتلیالی که رودهٔ کوچک را آستر کرده‌اند یون‌ها، قندها و دیگر ملکولهای کوچک و آب را از یک طرف به طرف دیگر منتقل می‌کنند. هم چنین خواهیم دید که چگونه این یافته‌ها باعث افزایش نوشیدن به هنگام ورزش و درمان وبا شده است.

۱-۱۱ مرور کلی بر انتقال غشایی

بسیاری از پروتئین‌های مختلف در انتقال یون‌ها و ملکول‌های کوچک از طریق غشاء مشارکت دارند. ما در این فصل در مورد فرایندهای انتقالی مختلف خواهیم آموخت که چگونه انواع مختلف پروتئین‌های قرار گرفته در غشاء، حرکت ملکول‌ها را در مسیرهای مختلف انجام می‌دهند.

فقط مولکول‌های کوچک آبگریز از غشاءها به صورت انتشار ساده عبور می‌کنند

همان طور که در بالا گفتیم تنها گازهایی از قبیل O_2 و CO_2 و ملکول‌های بدون بار کوچک از قبیل اوره و اتانول می‌توانند به آسانی توسط **انتشار ساده**[1] از طریق یک غشای مصنوعی ساخته شده از فسفولیپیدهای خالص یا فسفولیپید و کلسترول حرکت کنند (شکل ۱-۱۱ را ملاحظه کنید). هم چنین این قبیل ملکول‌ها می‌توانند از طریق غشاءهای سلولی، بدون کمک پروتئین‌های انتقالی منتشر شوند و انرژی متابولیکی مصرف نمی‌شود زیرا حرکت از یک غلظت بالا به سمت غلظت پایین مولکول صورت می‌گیرد و شیب غلظت شیمیایی کاهش می‌یابد. با توجه به فصل دوم، این قبیل واکنش‌های انتقالی، خود به خودی رخ می‌دهند زیرا آنها دارای مقدار ΔS مثبت (افزایش در بی‌نظمی) هستند و بنابراین ΔG آنها منفی (کاهش در انرژی آزاد) است.

نسبت سرعت انتشار هر ماده از بین یک دو لایه فسفولیپیدی خالص با شیب غلظت آن در طول دولایه و آبگریزی و اندازهٔ آن متناسب است. هم چنین حرکت مولکول‌های باردار تحت تأثیر پتانسیل الکتریکی در طول غشا است. وقتی یک دولایهٔ فسفولیپیدی، دو قسمت آبی را از هم جدا می‌کند می‌توان نفوذپذیری غشاء را به راحتی با اضافه کردن مقدار کمی مواد رادیواکتیو به یک قسمت و اندازه‌گیری سرعت ظهورش در قسمت دیگر تعیین کرد. بزرگتر بودن شیب غلظت ماده باعث سریع‌تر شدن سرعت حرکت از بین دو لایه می‌شود. آبگریزی یک ماده به وسیله ضریب تفکیک K که ثابت تعادل برای تفکیک بین آب و روغن است اندازه‌گیری می‌شود. بالاتر بودن ضریب تفکیک یک ماده باعث افزایش حلالیت آن در لیپید می‌شود. اولین مرحله و مرحلهٔ محدودکنندهٔ سرعت در انتشار ساده، حرکت یک ملکول از محلول آبی به قسمت داخلی آبگریز دولایه فسفولیپیدی که خواص شیمیایی آن شبیه روغن است می‌باشد. این نکته دلیل بر این مطلب است که گفته می‌شود آبگریزی بیشتر یک مولکول باعث انتشار سریع‌تر از دولایهٔ فسفولیپیدی خالص می‌شود. برای مثال دی اتیل اوره که در آن یک گروه اتیل ($-CH_3CH_2$) به هر اتم نیتروژن اوره چسبیده است دارای K=۰/۰۱ است و اوره دارای K=۰/۰۰۰۲ (شکل ۱-۱۱ را ملاحظه کنید). دی اتیل اوره ۵۰ بار

1-Simple diffusion

($\frac{۰/۰۱}{۰/۰۰۰۲}$) از اوره آبگریزتر است و بنابراین از غشای دولایه‌ای فسفولیپیدی ۵۰ بار سریع‌تر از اوره منتشر می‌شود. به طور مشابه، اسیدهای چرب با زنجیره هیدروکربنی طویل‌تر، آبگریزتر از اسیدهای چرب با زنجیره‌های کوتاهترند و در هر غلظتی از بین دولایهٔ فسفولیپیدی خالص سریع‌تر منتشر می‌شوند.

اگر یک مادهٔ انتقالی دارای بار خالص باشد حرکت آن تحت تأثیر گرادیان شیب و پتانسیل غشاء قرار می‌گیرد که **پتانسیل غشاء** و یا همان **پتانسیل الکتریکی** (ولتاژ) دو طرف غشاست. ترکیب این دو نیرو **شیب الکتروشیمیایی**[۱] نامیده می‌شود و از نظر انرژیتیکی جهت مطلوب انتقال یک مولکول باردار از بین غشاءها را تعیین می‌کند. پتانسیل الکتریکی که در طول اغلب غشاءهای سلولی وجود دارد باعث عدم تعادل کوچکی در غلظت یون‌های باردار مثبت و منفی در دو طرف غشاء می‌شود. ما چگونگی به دست آمدن و نگهداری این عدم تعادل و درنتیجه پتانسیل را در قسمت‌های ۴-۱۱ و ۵-۱۱ بحث خواهیم کرد.

پروتئین‌های غشایی واسطهٔ انتقال اغلب مولکول‌ها و همهٔ یون‌ها در عرض غشاءهای زیستی‌اند

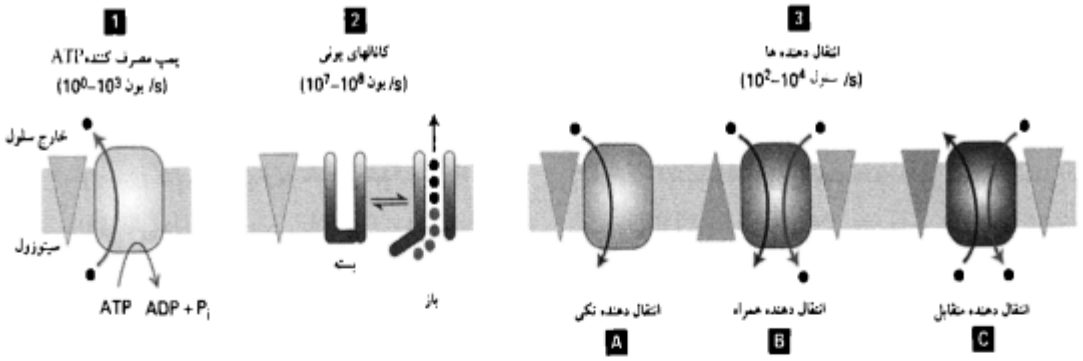
همان طور که در شکل ۱-۱۱ مشخص است تعداد کمی از مولکول‌ها می‌توانند از دو لایهٔ فسفولیپیدی خالص در سرعت‌های محسوس با انتشار ساده عبور کنند و هیچ یونی نمی‌تواند عبور کند. بنابراین انتقال اغلب مولکول‌ها به داخل یا خارج سلول‌ها نیاز به کمک پروتئین‌های غشایی تخصصی دارد. حتی انتقال مولکول‌های دارای ضریب تفکیک نسبتاً بزرگ (مثل اوره و گازهای معینی مثل CO_2) غالباً با پروتئین‌های خاص تشدید می‌شود زیرا انتقال آنها به صورت انتشار ساده معمولاً به اندازهٔ کافی برای برآوردن نیازهای سلولی سریع نیست.

همهٔ پروتئین‌های انتقالی، پروتئین‌های گذار غشایی هستند که شامل چندین قطعهٔ گذرنده از غشاء و عموماً آلفاماریپیچ هستند. پروتئین‌های غشایی با تشکیل یک مسیر احاطه شده توسط پروتئین در عرض غشاء اجازه حرکت مواد آب‌دوست را بدون تماس با قسمت داخلی آبگریز غشاء می‌دهند. در اینجا، انواع مختلف پروتئین‌های انتقالی که در این فصل پوشش داده می‌شود را معرفی می‌کنیم (شکل ۳-۱۱). پمپ‌های مصرف‌کنندهٔ ATP (یا به طور ساده پمپ‌ها)، ATPase هایی هستند که انرژی هیدرولیز ATP را برای حرکت یون‌ها و مولکول‌های کوچک در عرض غشاء برخلاف شیب غلظت شیمیایی و پتانسیل الکتریکی یا هر دو، مورد استفاده قرار می‌دهند. این فرایند **انتقال فعال**[۲] نامیده می‌شود که یک مثال از واکنش‌های شیمیایی جفت شده است (فصل ۲). در این مورد انتقال یون‌ها یا مولکول‌های کوچک به صورت سربالایی برخلاف شیب الکتروشیمیایی صورت می‌گیرد که نیاز به انرژی دارد و با هیدرولیز ATP که آزادکنندهٔ انرژی است همراه می‌شود. واکنش کلی (هیدرولیز ATP و حرکت سربالایی یون‌ها و مولکول‌های کوچک) از نظر انرژی مطلوب است. پمپ‌های Na^+/K^+ نشان داده شده در شکل ۲-۱۱ (شکل ۲-۱۱ را ملاحظه کنید) یک مثال از پمپ‌های مصرف‌کنندهٔ ATP هستند.

پروتئین‌های کانالی[۳]، آب، یون‌های خاص یا مولکول‌های کوچک آب‌دوست را در جهت شیب غلظت یا پتانسیل الکتریکی‌شان از طریق **انتقال تسهیل شده**[۴] (یا انتشار تسهیل شده) انتقال می‌دهند که پروتئین به حرکت یک ماده در جهت شیب غلظتش کمک می‌کند.

پروتئین‌های کانالی یک مسیر عبوری آب‌دوست را از طریق غشاء تشکیل می‌دهند که چندین مولکول آب یا یون به طور خود به خودی در یک ستون منفرد با یک سرعت بسیار سریع حرکت می‌کنند. بعضی کانال‌ها در بیشتر زمان‌ها بازند که کانال‌های بدون دریچه[۵] نامیده می‌شوند. بیشتر کانال‌های یونی تنها در پاسخ به پیام شیمیایی یا الکتریکی خاص باز می‌شوند که به کانال‌های دریچه‌دار[۶] مشهورند. کانال‌های پتاسیمی غشای پلاسمایی در شکل ۲-۱۱ یک مثال از کانال‌های یونی بدون دریچه‌اند. پروتئین‌های کانالی، مشابه همهٔ پروتئین‌های انتقالی، دارای انتخاب پذیری بالا برای انواع مولکول‌هایی که انتقال می‌دهند می‌باشند. انتقال‌دهنده‌ها[۷] (حامل[۸] هم نامیده می‌شوند) انواع وسیعی از یون‌ها و مولکول‌ها را از بین غشای سلولی عبور می‌دهند. سه نوع از انتقال‌دهنده‌ها مشخص شده‌اند. انتقال‌دهنده‌های تکی[۹] یک نوع مولکول را در جهت شیب غلظت از طریق انتشار تسهیل شده جا به جا می‌کنند. گلوکز و اسیدهای آمینه که از غشای پلاسمایی عبور می‌کنند با کمک انتقال‌دهنده‌های تکی به سلول‌های پستانداران وارد می‌شوند.

1- Electrochemical gradient
2- Active transport
3- Channel proteins
4- Facilitated transport
5- Nongated channel
6- Gated channel
7- Transporter
8- Carrier
9- Uniporter



شکل ۳-۱۱ (شکل رنگی) دید کلی از پروتئین‌های انتقالی غشاء. شیب‌ها با پیکان‌هایی با نوک تیز، به سمت غلظت یا پتانسیل الکتریکی یا هردو نشان داده شده‌اند. (❶) پمپ‌ها انرژی رها شده به وسیله هیدرولیز ATP را برای ایجاد نیروی حرکت یون‌ها یا مولکول‌های خاص برخلاف شیب الکتروشیمیایی خود مورد استفاده قرار می‌دهند. (❷) کانال‌ها اجازه حرکت یون‌ها (یا آب) را در جهت شیب الکتروشیمیایی نشان می‌دهند. (❸) انتقال‌دهنده‌ها که در سه گروه قرار می‌گیرند باعث تسهیل حرکت مولکول‌ها یا یون‌های کوچک خاصی می‌شوند. انتقال‌دهنده‌های تکی یک نوع از مولکول‌ها را در جهت شیب غلظت منتقل می‌کنند. (❸A) پروتئین‌های هم انتقال‌گر (انتقال دهنده‌های همسو (❸B) و انتقال‌دهنده‌های ناهمسو (❸C) حرکت مولکول‌ها را برخلاف شیب غلظت (دایره‌های سیاه) کاتالیز می‌کنند که یا حرکت یک یا تعداد بیشتری یون در جهت شیب الکتروشیمیایی (دایره‌های قرمز) پیش می‌رود. اختلافات در مکانیسم‌های انتقال توسط این سه گروه اصلی پروتئینی برای سرعت‌های متفاوتشان در حرکت مواد محلول محاسبه می‌شود.

جدول ۱-۱۱: مکانیسم‌های انتقال یون‌ها و مولکول‌های کوچک از طریق غشاهای سلولی

خصوصیت	انتشار ساده	انتشار تسهیل شده	انتقال فعال	هم‌انتقالی*
نیاز به پروتئین‌های خاص	−	+	+	+
انتقال مادهٔ حل‌شونده برخلاف شیب غلظتی	−	−	+	+
همراه با هیدرولیز ATP	−	−	+	−
توسط یک یون هم‌انتقالی در جهت شیب بدست می‌آید	−	−	−	+
مثال‌هایی از مولکول‌های منتقل شده	O_2، CO_2، هورمون‌های استروئیدی، بسیاری از داروها	گلوکز و اسیدهای آمینه (تک‌انتقالی) و آب (کانال‌ها)	یون‌ها، مولکول‌های آبگریز کوچک، لیپیدها(پمپ‌های مصرف‌کنندهٔ ATP)	گلوکز و اسیدهای‌آمینه (هم‌انتقالی)؛ یون‌های مختلف و ساکارز (انتقال ناهمسو)

* انتقال فعال ثانویه هم نامیده می‌شود.

در مقابل، انتقال‌دهنده‌های ناهمسو [1] و انتقال‌دهنده‌های همسو [2] انتقال یک نوع یون یا مولکول را برخلاف شیب غلظتش با حرکت یک یا تعداد بیشتری یون متفاوت در جهت شیب غلظتش در یک طرف (در انتقال دهنده همسو) یا در جهات مختلف (در انتقال‌دهندهٔ ناهمسو) با هم همراه می‌کنند. این پروتئین‌ها اغلب هم

1- Antiporter 2- Symporter

انتقال‌دهنده[1] نامیده می‌شوند که به قدرت آنها برای انتقال دو یا چند مادهٔ محلول مختلف به طور همزمان برمی‌گردد. در شکل ۲-۱۱ لیزین از طریق انتقال دهندهٔ همسوی سدیم - لیزین به داخل سلول حرکت می‌کند. هم انتقالگرها شبیه به پمپ‌های ATP واکنش‌ها را با هم همراه می‌کنند، به صورتی که یک واکنش نامطلوب از نظر انرژی (یعنی حرکت سربالایی یک نوع مولکول) با یک واکنش مطلوب از نظر انرژی یعنی حرکت سرپایینی همراه می‌شود. توجه کنید که ماهیتِ واکنشِ ایجادِ انرژی پیش برندهٔ انتقال فعال در این دو گروه از پروتئین‌ها متفاوت است. پمپ‌های ATP انرژی هیدرولیز ATP را مورد استفاده قرار می‌دهند در صورتی که هم انتقال‌دهنده‌ها انرژی ذخیره شده در یک شیب الکتروشیمیایی را مورد استفاده قرار می‌دهند. به فرایند اخیر در بعضی موارد انتقال فعال ثانویه[2] اطلاق می‌شود.

جدول ۱-۱۱ چهار مکانیسمی که توسط آنها مولکول‌های کوچک و یون‌ها در عرض غشاهای سلولی منتقل می‌شوند را خلاصه کرده است. تغییرات ساختمان‌فضایی برای عملکرد همهٔ پروتئین‌های انتقالی ضروری است. پمپ‌های مصرف‌کننده ATP و انتقال‌دهنده‌ها یک چرخهٔ ساختمان‌فضایی را طی می‌کنند که در معرض قرارگرفتن محل پیوندی (یا محل‌های پیوندی) در یک طرف غشاء، دارای یک ساختمان‌فضایی و در طرف دیگر دارای ساختمان‌فضایی ثانویه است. به دلیل این چرخه در حرکت تنها یک یا تعداد کمی مولکول‌های سوبسترا توسط این پروتئین‌ها منتقل می‌شوند و آنها را به صورت سرعت‌های نسبتاً کند برای انتقال در دامنه‌ای از 10^{2} تا 10^{4} یون یا مولکول در هر ثانیه توصیف می‌کنند (شکل ۳-۱۱ را ملاحظه کنید). کانال‌های یونی به صورت شاتلی بین یک حالت باز و بسته‌اند. اما بسیاری از یون‌ها از طریق یک کانال باز و بدون تغییر ساختمان‌فضایی اضافی دیگری عبور می‌کنند. به این دلیل کانال‌ها دارای این ویژگی‌اند که انتقال را با سرعت‌های خیلی سریع یعنی بالای 10^{8} یون در هر ثانیه انجام می‌دهند. بحث‌مان را با ساده‌ترین پروتئین انتقالی یعنی مولکول‌هایی که مسئول انتقال گلوکز و آب هستند شروع می‌کنیم. بعداً حرکت مولکول‌های انتقالی پیچیده‌تر را شرح خواهیم داد.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۱

مرور کلی بر انتقال غشایی

- غشای پلاسمایی عبور و مرور مولکول‌ها را به درون و بیرون سلول تنظیم می‌کند
- به غیر از گازها (مثل O_2 و CO_2) ومولکولهای کوچک آبگریز، بسیاری از مولکولها نمی‌توانند به اندازهٔ مورد نیاز سلول از فسفولیپید دو لایه‌ای خالص عبور کنند.
- سه خانواده از پروتئین‌های گذار غشایی انتقال یونها، قندها، اسیدهای آمینه و سایر متابولیت‌ها را از عرض غشای سلول وساطت می‌کنند: پمپ‌های وابسته به ATP، کانالها و ناقل‌ها (شکل ۳-۱۱ را ملاحظه کنید).
- در انتقال فعال، پروتئین ناقل حرکت سوبسترا را برخلاف شیب غلظت آن با هیدرولیز ATP جفت می‌کند.
- در انتشار تسهیل شده، پروتئین ناقل به حرکت سوبسترای ویژه (مولکول یا یون) در جهت شیب غلظتی کمک می‌کند.
- در انتقال فعال ثانویه یا هم انتقالی، پروتئین ناقل حرکت سوبسترا را برخلاف شیب غلظتی آن با حرکت سوبسترای ثانویه در جهت شیب غلظتی آن جفت می‌کند (جدول ۱-۱۱ را ملاحظه کنید).

۱۱-۲ انتقال تکی گلوکز و آب

اغلب سلول‌های جانوری گلوکز را به عنوان منبعی برای تولید ATP مورد استفاده قرار می‌دهند. این سلول‌ها یک انتقال‌دهندهٔ تکی گلوکز را برای جذب گلوکز از خون یا دیگر مایعات خارج سلولی در جهت شیب غلظت به کار می‌برند. بسیاری از سلول‌ها، پروتئین‌های انتقالی غشایی به نام آکوآپورین‌ها[3] را برای افزایش سرعت حرکت آب از بین غشاهای سطحی‌شان مورد استفاده قرار می‌دهند. بنابراین ما ساختار و عملکرد اینها و دیگر پروتئین‌های انتقالی تکی را بحث خواهیم کرد.

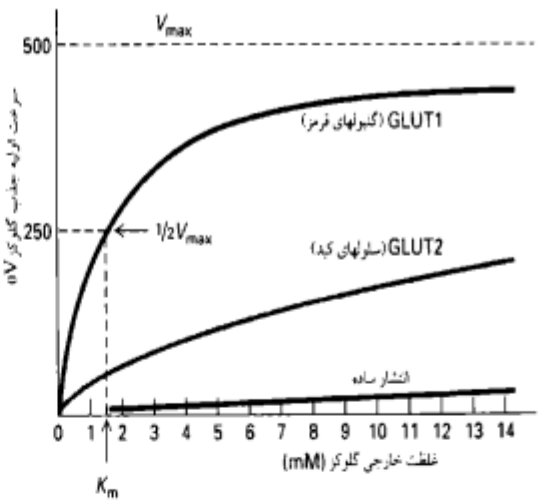
چندین ویژگی، متمایزکنندهٔ انتقال تکی از انتشار ساده است

انتقال گلوکز و دیگر مولکول‌های کوچک آبدوست با واسطه پروتئین از طریق غشاء فرایندی است که به عنوان انتقال تکی شناخته می‌شود و با ویژگی‌های مشخص زیر نشان داده می‌شود:

۱- سرعت انتشار تسهیل شده توسط انتقال‌دهنده‌های تکی بیشتر از انتشار ساده از طریق یک دولایه‌ای فسفولیپیدی خالص است.

۲- به علت اینکه مولکول‌های انتقالی هرگز وارد هسته آبگریز دولایه فسفولیپیدی نمی‌شوند ضریب تفکیک K در اینجا بی‌ربط است.

1- Co - transporter
2- Second active transport
3- Aquaporins



▲ شکل تجربی ۴-۱۱ جذب سلولی گلوکز با واسطه پروتئین‌های GLUT نشان‌دهندهٔ سینتیک آنزیمی ساده است که خیلی بیشتر از سرعت محاسبه شده برای ورود گلوکز فقط توسط انتشار ساده است. سرعت ابتدایی جذب گلوکز (اندازه‌گیری شده به صورت میکرومول در هر میلی‌لیتر در ساعت) در چند ثانیه ابتدایی در مقابل افزایش غلظت گلوکز در محیط خارج سلولی روی نمودار رسم شده است. در این آزمایش غلظت اولیه گلوکز در سلول‌ها همیشه صفر است. GIUT1 که در گلبول‌های قرمز بیان می‌شوند و GIUT2 که در سلول‌های کبدی بیان می‌شوند به میزان زیادی سرعت جذب گلوکز را (منحنی‌های شرابی و خرمایی رنگ) نسبت به انتشار ساده (منحنی آبی رنگ) در همه غلظت‌های خارج سلولی افزایش می‌دهند. GIUT تسهیل کننده جذب گلوکز مشابه واکنش‌های آنزیمی کاتالیزی، نشان‌دهندهٔ یک سرعت حداکثر (V_{max}) هستند. K_m غلظتی است که در آن سرعت جذب گلوکز نصف سرعت حداکثر است. GIUT2 با K_m در حدود ۲۰mM دارای میل ترکیبی کمتری برای گلوکز نسبت به GIUT1 که دارای K_m در حدود ۱/۲mM است می‌باشد.

۳- انتقال از طریق تعداد محدودی مولکول ناقل تکی، نسبتاً از سراسر دولایهٔ فسفولیپیدی رخ می‌دهد. در نتیجه وقتی شیب غلظت در عرض غشاء خیلی بزرگ باشد و هر انتقالگر تکی با سرعت حداکثر کار کند یک سرعت انتقال حداکثر (V_{max}) به دست می‌آید.

۴- انتقال به صورت اختصاصی است. هر ناقل تکی تنها یک نوع منفرد مولکول یا یک گروه منفرد مولکول وابسته به هم و نزدیک را انتقال می‌دهند. یک اندازه‌گیری از میل ترکیبی یک ناقل برای سوبسترا k_m نام دارد که غلظتی از سوبسترا است که در آن، انتقال به صورت نیمی از سرعت حداکثر است.

این ویژگی‌ها هم چنین برای انتقال با واسطهٔ دیگر گروه‌های پروتئینی که در شکل ۳-۱۱ رسم شده است به کار می‌رود.

یکی از ناقل‌های تکی که به خوبی شناخته شده است انتقال‌دهندهٔ گلوکز GLUT1 است که در غشاء پلاسمایی گلبول‌های قرمز یافت می‌شود. ویژگی‌های GLUT1 و بسیاری پروتئین‌های انتقالی دیگر از گلبول‌های قرمز بالغ به طور وسیع در دست مطالعه است. این سلول‌ها که هسته یا دیگر اندامک‌های داخل سلولی ندارند ذاتاً بسته‌هایی از هموگلوبین حاوی کمی پروتئین داخلی سلولی دیگر و یک غشای منفرد یعنی غشای پلاسمایی است (شکل ۱۰-۱۰a را ملاحظه کنید).به علت اینکه غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز با درجه بالایی از تخلیص جدا می‌شوند، جداسازی و تخلیص یک پروتئین انتقالی از گلبول‌های قرمز بالغ روشی کاملاً ساده است.

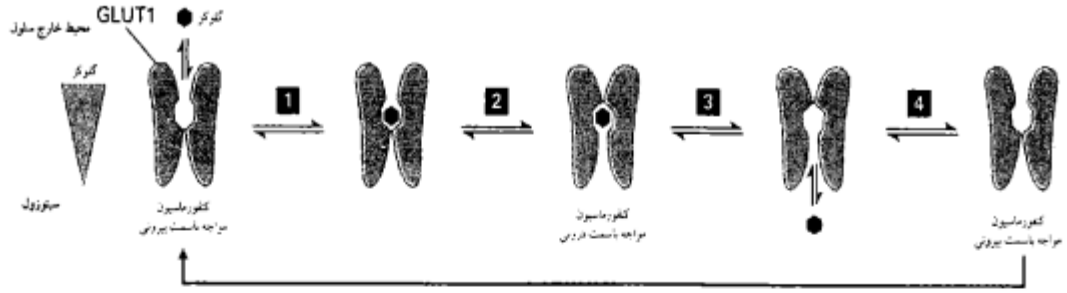
شکل ۴-۱۱ نشان‌دهندهٔ این است که گلوکزی که توسط گلبول‌های قرمز و سلول‌های کبد جذب می‌شوند ویژگی‌های سینتیکی یک واکنش آنزیمی کاتالیزی ساده با حضور یک سوبسترای منفرد را نشان می‌دهد. سینتیک واکنش‌های انتقالی با وساطت انواع پروتئین‌هایی که نسبت به ناقل‌های تکی پیچیده‌ترند صورت می‌گیرد. با این وجود همهٔ واکنش‌های انتقالی با کمک پروتئین، سریع‌تر از انتشار ساده است و اختصاصی بودن سوبسترا انعکاسی از مقادیر K_m پایین برای بعضی از سوبستراها نسبت به دیگری است و نشان‌دهندهٔ یک سرعت حداکثر (V_{max}) است.

انتقال‌دهنده تکی GLUT1، گلوکز را به داخل اغلب سلول‌های پستانداران منتقل می‌کند

بیشتر سلول‌های پستانداران از گلوکز خون به عنوان منبع اصلی انرژی سلولی استفاده کرده و GLUT1 را بیان می‌کنند. از آنجایی که غلظت گلوکز معمولاً در محیط‌های خارج سلولی (گلبول‌های قرمز) بالاتر از سلول است GLUT1 عموماً ورود خالص گلوکز را از محیط‌های خارج سلولی به داخل سلول کاتالیز می‌کند. در این وضعیت V_{max} در غلظت‌های بالای گلوکز خارج سلولی به دست می‌آید.

GLUT1 مشابه دیگر ناقل‌های تکی، بین دو حالت ساختمان‌فضایی در تغییر است. در یک ساختمان‌فضایی، محل پیوندی به گلوکز به سمت خارج غشا است و در ساختمان‌فضایی دیگر، محل پیوندی به گلوکز به سمت داخل است. شکل ۵-۱۱ توالی حوادثی که در طول انتقال یک طرفه گلوکز از خارج سلول به سوی سیتوزول رخ می‌دهد را به تصویر کشیده است. همچنین GLUT1 خروج خالص گلوکز را از سیتوزول به محیط‌های خارج سلولی در مواقعی که غلظت گلوکز در داخل سلول نسبت به بیرون بالاتر است کاتالیز می‌کند.

سینتیک انتقال یک طرفه گلوکز از خارج یک سلول به سمت



▲ **شکل ۵-۱۱ طرح انتقال تکی توسط GLUT1.** در یک ساختمان‌فضایی، محل پیوند شونده به سمت خارج قرار دارند. در دیگری، محل پیوند شونده به سمت داخل است. بازشدن گلوکز به محلی که به سمت خارج است (مرحله ❶) باعث شروع تغییر ساختمان‌فضایی در ناقل می‌شود و محل پیوند شدن هم اکنون به سوی داخل و به سمت سیتوزول است (مرحله ❷). سپس گلوکز به داخل سلول رها می‌شود (مرحله ❸). در پایان ناقل تغییرات ساختمان‌فضایی را در جهت عکس طی می‌کند و دوباره محل پیوند شدن به سمت خارج به وجود می‌آید (مرحله ❹). اگر غلظت گلوکز در داخل سلول نسبت به خارج بالاتر باشد چرخه در جهت عکس کار می‌کند (مرحله ❹ ← مرحله ❶). درنتیجه حرکت خالص گلوکز از داخل به خارج رخ می‌دهد. در واقعیت تغییرات ساختمان‌فضایی کمتر از این حدی است که در تصویر رسم شده است.

داخل از طریق GLUT1 توسط همان نوع معادلاتی که برای توصیف‌واکنش‌های ساده کاتالیز شده با آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد قابل توصیف است. برای سادگی بیایید فرض کنیم که سوبستراهای گلوکز (S) در ابتدا فقط در خارج غشاء وجود دارند. در این مورد می‌توان نوشت:

$$S_{out} + GLUT1 \underset{}{\overset{K_m}{\rightleftharpoons}} S_{out} - GLUT1$$

$$\overset{V_{max}}{\rightleftharpoons} \quad S_{int} + GLUT1$$

در اینجا S_{out}-GLUT1 نشان‌دهندهٔ GLUT1 در ساختمان‌فضایی به سمت خارج است که با گلوکز پیوند شده است. این معادله مشابه با مسیر توصیف واکنش‌های ساده کاتالیز شده با آنزیم است که پروتئین (آنزیم) به یک سوبسترای تکی چسبیده است. سپس آن را به شکل یک مولکول متفاوت (محصول) تغییر شکل می‌دهد. البته در اینجا تغییر شیمیایی برای GLUT1 پیوند شده با قند رخ نمی‌دهد بلکه گلوکز در عرض غشای سلولی حرکت می‌کند. با وجود این، سینتیک این واکنش انتقالی مشابه واکنش‌های ساده کاتالیز شده با آنزیم است و ما می‌توانیم همان معادلاتی را که در معادلات میکائیلیس - منتون در فصل سه برای V (سرعت) بیان کردیم برای سرعت انتقال اولیه S به داخل سلول که با GLUT1 کاتالیز می‌شود مورد استفاده قرار دهیم.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{C}} \qquad (۱۱-۱)$$

در اینجا C غلظت S_{out} است (در ابتدا غلظت $S_{in}=0$ است). V_{max} سرعت انتقال وقتی که همه مولکول‌های GLUT1 به S چسبیده باشند، می‌باشد و در غلظت بی‌نهایت بالای S_{out} رخ می‌دهد. پایین بودن مقدار K_m به این معنی است که سوبسترا به طور محکم‌تر به ناقل چسبیده است و سرعت انتقال در یک غلظت ثابت سوبسترا بزرگتر است. معادله ۱-۱۱ منحنی‌ای را برای جذب گلوکز توسط گلبول‌های قرمز توصیف می‌کند که در شکل ۴-۱۱ نشان داده شده است و شبیه منحنی‌های ناقل تکی دیگر است.

K_m انتقال گلوکز بوسیلهٔ GLUT1 در غشای گلبول قرمز ۱/۵mM است. در این غلظت تقریباً نیمی از ناقل با محل فعال به سمت خارج به گلوکز چسبیده‌اند و انتقال با ۵۰٪ سرعت حداکثر انجام می‌شود. از آنجایی که گلوکز خون به طور طبیعی ۵mM است ناقل گلوکز در گلبول‌های قرمز معمولاً با ۷۷ ٪ سرعت حداکثر عمل می‌کنند و آن را می‌توان با استفاده از معادله ۱-۱۱ مشاهده کرد. GLUT1 و GLUT3 که بسیار شبیه به آن است توسط گلبول‌های قرمز و سلول‌های دیگری که نیاز به جذب پیوسته گلوکز از خون با سرعت‌های بالا دارند بیان می‌شود. سرعت جذب گلوکز توسط این قبیل سلول‌ها بدون توجه به تغییرات کوچک در غلظت گلوکز خون هم چنان بالا باقی می‌ماند.

GLUT1 علاوه بر گلوکز، قندهای ایزومری D - مانوز و D - گالاکتوز را هم که با D- گلوکز در شکل فضایی تنها یک اتم کربن متفاوتند با سرعت‌های قابل اندازه‌گیری منتقل می‌کند. بنابراین K_m برای گلوکز (۱/۵mM) کمتر از K_m برای D - مانوز (۲۰mM) یا D گالاکتوز (۳۰mM) است. پس GLUT1 کاملاً اختصاصی بوده و

دارای میل ترکیبی بسیار بالا (با K_m پایین نشان داده می‌شود) برای سوبسترای طبیعی D ـ گلوکز نسبت به سوبستراهای دیگر است.

GLUT1 ۲ ٪ پروتئین غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز را تشکیل می‌دهد. بعد از اینکه گلوکز به داخل گلبول‌های قرمز منتقل شد سریعاً فسفریله شده و گلوکز - ۶ - فسفات را تشکیل می‌دهد که قادر به خروج از سلول نیست. به علت این که، این واکنش اولین مرحله در متابولیسم گلوکز است (شکل ۳-۱۲ را ملاحظه کنید) و مرحله‌ای سریع بوده و با سرعت ثابت رخ می‌دهد، غلظت داخل سلولی گلوکز حتی مواقعی که گلوکز از محیط وارد می‌شود پایین نگه داشته می‌شود. در نتیجه بزرگتر بودن شیب غلظت گلوکز در خارج نسبت به داخل سلول، با یک نسبت بالای کافی با مراقبت در ورود ملکول‌های اضافی حفظ می‌شود و باعث حفظ سرعت ثابت متابولیسم گلوکز می‌شود.

ژنوم انسان خانواده‌ای از پروتئین‌های GLUT انتقال دهندهٔ قندها را کد می‌کنند.

ژنوم انسان حداقل ۱۲ پروتئین GLUT با شباهت بسیار بالا به هم را کد می‌کند. GLUT1 تا GLUT12 که تصور می‌شود همهٔ آنها دارای ۱۲ آلفا مارپیچ گذرنده از غشاء می‌باشند و پیشنهاد می‌شود که آنها از یک پروتئین انتقالی اجدادی منفرد مشتق شده‌اند. اگرچه هیچ ساختار سه بُعدی از GLUT1 موجود نیست ولی مطالعات بیوشیمیایی جزئی نشان می‌دهد که ریشه‌های اسیدهای آمینه موجود در آلفامارپیچ‌های ناقل غشایی غالباً آبگریزند. بنابراین چندین مارپیچ دارای ریشه‌های اسید آمینه‌ای (مثل سرین، ترئونین، آسپاراژین و گلوتامین) هستند که زنجیره‌های جانبی آنها می‌تواند با گروه هیدروکسیل گلوکز پیوند هیدروژنی تشکیل دهد. تصور می‌شود این اسیدهای آمینه محل‌های پیوند شدن به گلوکز را در سمت داخل و در سمت خارج در قسمت داخلی پروتئین تشکیل می‌دهند (شکل ۵-۱۱ را ملاحظه کنید).

تصور می‌شود ساختار همهٔ ایزوفورم‌های GLUT و همه ناقلین قندی مشابه باشد. با این وجود بیان تفاوتشان در انواع مختلف سلول‌ها و خصوصیات عملکردی ایزوفورم‌های اختصاصی، آنها را قادر می‌سازد که در سلول‌های مختلف بدن متابولیسم گلوکز را به طور مستقل تنظیم کرده و در همان زمان غلظت گلوکز را در خون ثابت نگهدارند. برای مثال GLUT3 در سلول‌های عصبی مغز یافت می‌شود. نورون‌ها برای متابولیسم به جریان ثابتی از گلوکز وابسته‌اند و GLUT3 شبیه به GLUT1 برای اینکه مغز با سرعت ثابت و بالا، گلوکز مایعات پانکراس، خارج سلولی را به دست آورد K_m پایین دارند.

GLUT2 در کبد و سلول‌های β ترشح‌کننده انسولین بیان می‌شود و دارای $K_m \approx 20mM$ است که حدود ۱۳ بار از K_m GLUT1 بزرگتر است. درنتیجه وقتی گلوکز خون از حد پایه بالاتر رود یعنی از ۵mM به ۱۰mM برسد یا بعد از خوردن غذا، سرعت جریان گلوکز در سلول‌هایی که GLUT2 را بیان می‌کنند دو برابر شود سلول‌های بیان‌کننده GLUT1 تنها به مقدار کمی افزایش می‌یابند (شکل ۴-۱۱ را ملاحظه کنید). در کبد گلوکز «اضافی» به داخل سلول آورده می‌شود و به صورت پلیمرگلیکوژن ذخیره می‌شود. در سلول‌های جزایر β، بالا رفتن گلوکز باعث شروع ترشح هورمون انسولین می‌شود که گلوکز خون را با افزایش جذب گلوکز و متابولیسم آن در ماهیچه و با مهار تولید گلوکز در کبد کاهش می‌دهد (شکل ۳۲-۱۵ را ملاحظه کنید).

یکی دیگر از ایزوفورم‌های GLUT، GLUT4 است که تنها در سلول‌های چربی و ماهیچه بیان می‌شود و اینها سلول‌هایی هستند که با افزایش جذب گلوکز به انسولین پاسخ داده و باعث حذف گلوکز از خون می‌شوند. GLUT4 در غیاب انسولین در غشاهای داخل سلولی یافت شده و در غشاءهای پلاسمایی یافت نمی‌شوند و قادر نیستند جذب گلوکز را تسهیل کنند. انسولین توسط فرایندی که در فصل ۱۵ شرح داده شده، باعث می‌شود که غشاهای داخلی غنی از GLUT4 با غشای پلاسمایی به هم بپیوندند و تعداد مولکول‌های GLUT4 روی سطح سلول و بنابراین سرعت جذب گلوکز افزایش می‌یابد. نقصان در این فرایند که یک مکانیسم پایه‌ای برای کاهش گلوکز خون توسط انسولین است یک علت برای دیابت بزرگسالان یا دیابت نوع II است که در این بیماری به طور پیوسته گلوکز خون بالاست.

پروتئین‌های انتقالی می‌توانند با غشاها یا سلول‌های مصنوعی غنی شوند

اگرچه پروتئین‌های انتقالی قابل جداسازی از غشاء و تخلیص هستند اما ویژگی‌های عملکردی این پروتئین‌ها تنها وقتی که با یک غشاء در ارتباط باشند قابل مطالعه است. اغلب غشاهای سلولی شامل انواع بسیار متفاوتی از پروتئین‌های انتقالی اما نسبتاً با غلظت کمی از هر کدام از آنهاست که مطالعه عملکردی یک پروتئین منفرد را مشکل می‌سازد. برای سهولت این قبیل مطالعات، محققان از دو راه برای غنی‌سازی یک پروتئین انتقالی که به طور غالب در غشاء قرار گیرد استفاده می‌کنند. در یک مسیر عمومی یک پروتئین انتقالی ویژه استخراج و تخلیص می‌شود؛ سپس پروتئین تخلیص شده در

غشاءهای دولایه‌ای فسفولیپیدی خالص از قبیل لیپوزوم‌ها قرار می‌گیرد (شکل ۶-۱۰ را ملاحظه کنید). برای مثال همهٔ پروتئین‌های داخلی غشاهای گلبول‌های قرمز توسط یک شوینده غیریونی مثل اکتیل گلوکوزید قابل حل‌اند. انتقال‌دهندهٔ تکی گلوکز GLUT1 توسط کروماتوگرافی میل ترکیبی با آنتی‌بادی (فصل ۳) با یک ستون حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال خاص (بر علیه GLUT1) تخلیص می‌شود و سپس در لیپوزوم ساخته شده از فسفولیپید خالص جای می‌گیرد.

راه دیگر اینکه، ژن‌های کدکنندهٔ یک پروتئین انتقالی خاص در سطح بالایی در یک نوع سلول که به طور طبیعی آن ژن‌ها بیان نمی‌شوند بیان شود. تفاوت در انتقال ماده به وسیله سلول‌های تغییر یافته و کنترل‌های تغییر نیافته، به بیان پروتئین انتقالی وابسته است. در این سیستم، ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غشایی مختلف بدون ابهام مورد بررسی قرار می‌گیرد. یک مثال در این مورد، بیان بالای GLUT1 در رده‌های فیبروبلاست‌های کشت داده شده است که سرعت جذب گلوکز در آن‌ها چندین مرتبه افزایش یافته است و بیان پروتئین‌های جهش یافته GLUT1 با تغییرات اسیدهای آمینه خاص، اسیدهای آمینه مهم برای پیوند شدن به سوبسترا را تعیین کرده است.

فشار اسمزی باعث حرکت آب از غشاها می‌شود

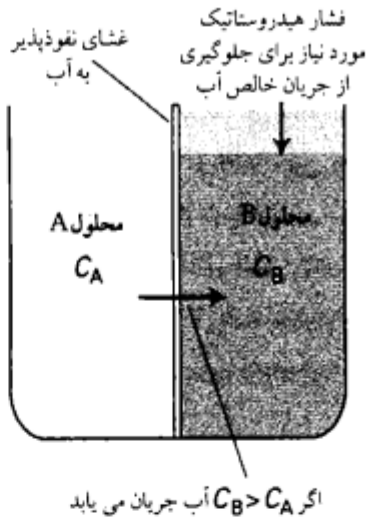
حرکت آب به داخل یا خارج سلول بخش مهمی از زندگی گیاهان و جانوران است. **آکواپورین‌ها** یک خانواده از پروتئین‌های غشایی‌اند که اجازه عبور به آب و تعداد کمی از ملکول‌های باردار کوچک دیگر مثل گلیسرول را از بین غشاهای زیستی می‌دهند. اما قبل از بحث در مورد این پروتئین‌های انتقالی، مرور اسمز، یعنی نیرویی که حرکت آب را تقویت می‌کند، ضروری است.

آب تمایل به حرکت از خلال یک پرده نیمه تراوا از محلولی با غلظت کم حل‌شونده به طرف غلظت بالا را دارد که این فرایند **اسمز** یا **جریان اسمزی**[1] نامیده می‌شود. به عبارت دیگر از آنجایی که محلول‌هایی با غلظت‌های بالای ماده حل‌شونده دارای غلظت کمی از آب است و آب به طور خود به خود از یک محلولی با میزان آب بالا به طرف جایی که غلظت آب در آن کم است حرکت می‌کند فشار اسمزی به عنوان فشار هیدروستاتیک مورد نیاز برای توقف جریان خالص آب از خلال یک غشای جداکننده محلول‌هایی با ترکیبات مختلف تعریف می‌شود (شکل ۶-۱۱). در این زمینه « غشاء» شاید یک لایه سلولی یا یک غشای سلولی که نسبت به آب نفوذپذیر و نسبت به حل‌شونده نفوذناپذیر است، باشد. فشار اسمزی به طور مستقیم با اختلاف در غلظت تعداد کل ملکول‌های حل‌شونده در هر طرف از غشاء متناسب است. برای مثال یک محلول NaCl با غلظت ۰/۵ M واقعاً دارای ۰/۵ M یون Na^+ و ۰/۵ M یون Cl^- است و فشار اسمزی آن با محلول ۱M گلوکز یا ساکارز برابر است.

هم چنین حرکت آب از خلال غشای پلاسمایی تعیین‌کننده حجم سلول‌های منفرد است که نیاز به تنظیم برای مقابله با خطرات سلولی دارد. فشار اسمزی نیروی تقویت‌کنندهٔ حرکت آب در سیستم‌های زیستی است.

آب و مواد معدنی در گیاهان عالی توسط ریشه از خاک جذب می‌شود و از طریق لوله‌های هدایتی (گزیلم) به سمت بالای گیاه حرکت می‌کند. آبِ مازاد توسط تبخیر از برگ‌ها دفع می‌شود و این باعث جلو راندن آب می‌شود. سلول‌های جانوری مشابه سلول‌های گیاهی، قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتریها نیستند که با دیواره سلولی محکمی احاطه شده باشند که مانع افزایش حجم سلول، در مواقعی که فشار اسمزی داخل سلولی افزایش می‌یابد، شود. بدون این دیواره، سلول‌های جانوری به هنگام افزایش فشار اسمزی داخلی متسع می‌شوند. اگر فشار به مقدار زیادی بالا رود سلول‌ها مشابه بادکنکی که به مقدار زیادی بزرگ شود منفجر می‌شوند. بدلیل وجود دیواره سلولی در گیاهان، جریان اسمزی آب وقتی سلول‌ها در یک محلول رقیق (حتی آب خالص) قرار بگیرند باعث افزایش فشار داخل سلولی شده ولی در حجم سلولی تغییری ایجاد نمی‌کند. در سلول‌های گیاهی، غلظت مواد حل شونده (مثل قند و نمک‌ها) معمولاً در واکوئل‌ها (شکل ۷-۹ را ملاحظه کنید) بالاتر از سیتوزول است. این غلظت ماده حل‌شونده نسبت به غلظت ماده حل‌شوندهٔ فضای خارج سلولی بالاتر است. فشار اسمزی که **فشار تورگر**[2] نامیده می‌شود، که از ورود آب به سیتوزول و سپس به واکوئل تولید می‌شود سیتوزول و غشای پلاسمایی را برخلاف مقاومت دیواره سلولی به طرف آن هل می‌دهد. سلول‌های گیاهی از این فشار برای کمک به رشدشان استفاده می‌کنند. طویل شدن سلول در طول رشد توسط القای هورمونی که به طور سست در منطقهٔ معینی از دیواره سلولی متمرکز شده رخ می‌دهند و توسط جریان آب به داخل واکوئل ادامه می‌یابد و باعث افزایش اندازه واکوئل و سپس افزایش اندازه سلول می‌شود.

1- Osmosis 2- Turgor pressure



▲ **شکل ۶-۱۱ فشار اسمزی.** محلول‌های A و B توسط یک غشاء که نسبت به آب نفوذپذیر و نسبت به همه حل‌شونده‌ها نفوذناپذیر است از هم جدا شده‌اند. اگر C_B (غلظت کلی حل‌شونده در محلول B) از C_A بزرگتر باشد آب تمایل به جریان از خلال غشاء از محلول A به محلول B خواهدداشت. فشار اسمزی π بین محلول‌ها، فشار هیدروستاتیکی است که محلول B برای جلوگیری از این جریان آب به کار می‌برد. از معادله وانت هوف فشار اسمزی به صورت $\pi = RT\ (C_B - C_A)$ به دست می‌آید که R ثابت گازها و T دمای مطلق است.

اگرچه اغلب تک‌سلولی‌ها (شبیه سلول‌های جانوری) دارای دیواره سلولی سختی نیستند ولی بسیاری از آنها دارای یک واکوئل انقباضی هستند که باعث مقابله آنها با لیز شدن اسمزی می‌شود. یک واکوئل انقباضی به طور غیرمشابه با گیاهان، آب را از سیتوزول می‌گیرد و به طور مرحله‌ای محتوای آن را از طریق الحاق با غشای پلاسمایی تخلیه می‌کند. پس حتی اگر آب به طور پیوسته از طریق جریان اسمزی وارد تک‌سلولی‌ها شود واکوئل‌های انقباضی مانع از تجمع زیاد آب در سلول و تورم آن تا نقطهٔ انفجار می‌شوند.

آکواپورین‌ها نفوذپذیری آب از غشاهای سلولی را افزایش می‌دهند

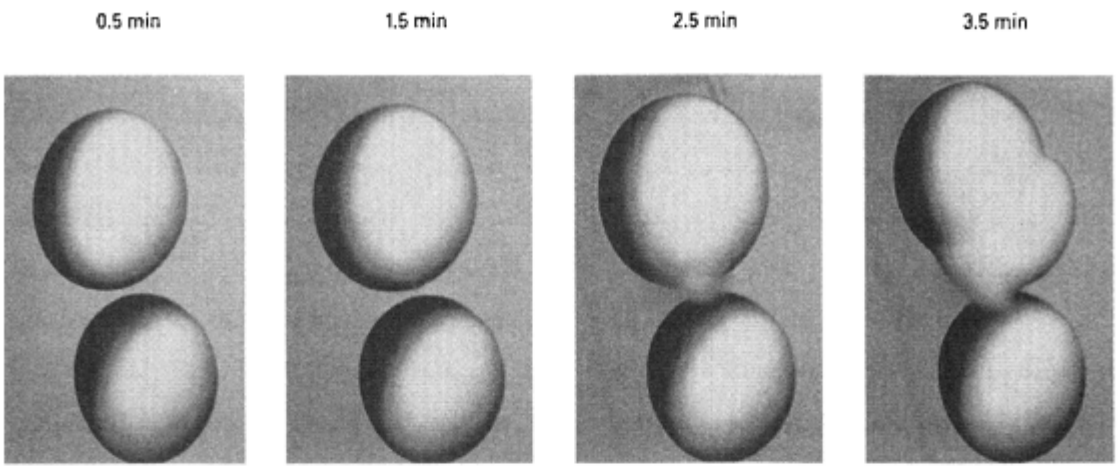
تغییرات کوچک در قدرت اسمزی خارج سلول باعث می‌شود که سلوهای جانوری به سرعت چروکیده یا متورم شوند. وقتی سلول‌های جانوری در یک **محلول رقیق**[1] (یعنی در جایی که غلظت حل‌شونده کمتر از سیتوزول است) قرار بگیرند متورم می‌شوند که به دلیل جریان اسمزی آب به سمت داخل است. برعکس وقتی سلول‌های جانوری در **محلول‌های غلیظ**[2] (یعنی در جایی که غلظت حل‌شونده بالاتر از سیتوزول است) قرار بگیرند آب سیتوزولی توسط جریان اسمزی سلول را ترک می‌کند و سلول‌ها چروکیده می‌شوند. درنتیجه، سلول‌های جانوری کشت داده شده باید در یک محیط **ایزوتونیک** نگهداری شوند که دارای غلظتی از حل‌شونده است که قدرت اسمزی آن با سیتوزول سلول مشابه است.

در مقابل، تخم‌ها و تخمک‌های قورباغه وقتی در آب برکه با قدرت اسمزی خیلی کم قرار گیرند، متورم نمی‌شوند، اگرچه غلظت نمک در داخل این سلول‌ها (بطور عمده KCl) با دیگر سلول‌ها برابر است (≈۱۵۰mMKCl). این مشاهده در ابتدا محققان را به این سمت هدایت کرد که گمان کنند غشای پلاسمایی گلبول‌های قرمز و انواع دیگر سلول‌ها حاوی پروتئین‌های کانالی آب هستند که باعث تسریع جریان اسمزی آب می‌شود که در تخمک‌های قورباغه وجود ندارد. نتایج آزمایشگاهی که در شکل ۷-۱۱ نشان داده شده است توضیح می‌دهد که یک آکواپورین در غشا پلاسمایی گلبول‌های قرمز به‌عنوان یک کانال آبی عمل می‌کنند.

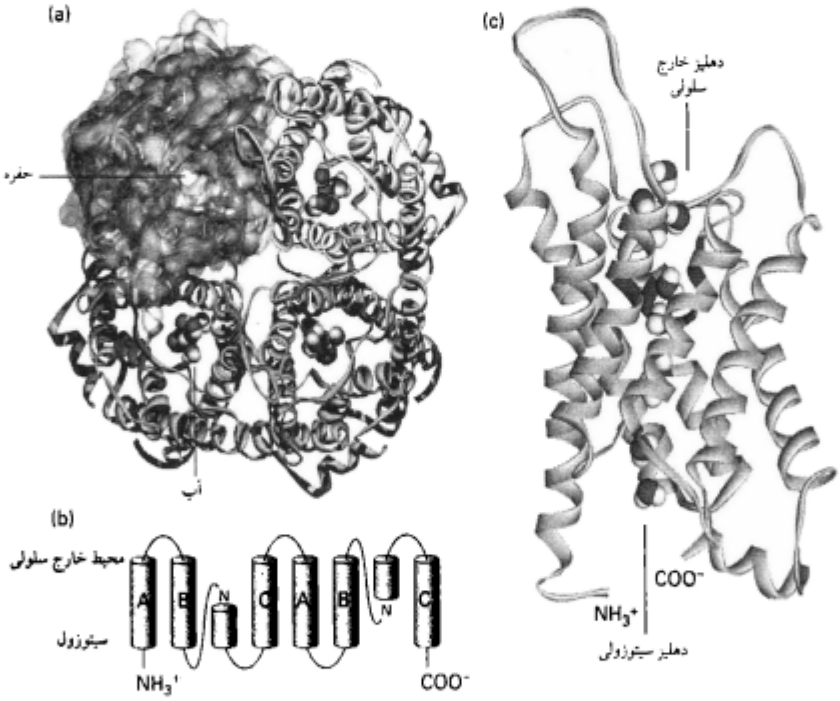
آکواپورین‌ها در شکل عملکردی، تترامری از زیرواحدهای ۲۸kDa مشابه هستند (شکل ۸a-۱۱). هر زیرواحد شامل شش آلفامارپیچ گذرنده از غشا است که یک حفره مرکزی برای حرکت آب را تشکیل می‌دهند (شکل ۸bوc-۱۱). در مرکز آن، دریچه انتخابی آب با طول حدود ۲nm یا حفره تنها دارای ابعاد ۰/۲۸nm می‌باشد که کمی از ابعاد یک ملکول آب بزرگتر است. خصوصیات غربال ملکولی محدودکننده توسط چندین ریشه اسید آمینه‌ای که آبدوست و محافظت شده هستند تعیین می‌شوند به طوری که زنجیره‌های جانبی و گروه‌های کربونیل این اسیدهای آمینه به داخل قسمت میانی کانال توسعه می‌یابند. چندین مولکول آب به‌طور خود به خودی از طریق کانال عبور می‌کنند. هر کدام از آنها به‌طور منظم پیوندهای هیدروژنی خاصی را تشکیل می‌دهند و دیگر مولکول‌های آب را در مسیر آب از جای خود بیرون می‌کنند. تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های اکسیژن آب و گروه‌های آمینی از دو زنجیره جانبی اسیدآمینه به دست می‌آید که تنها آب از طریق کانال عبور می‌کند. حتی پروتون‌ها هم از این طریق عبور نمی‌کنند و غلظت یونی در بین غشاها حتی وقتی آب جریان می‌یابد حفظ می‌شود.

پستانداران یک گروه از آکواپورین‌ها را بیان می‌کنند که ۱۱ مورد آنها در انسان شناخته شده است. آکواپورین ۱ در گلبول‌های قرمز فراوان و آکواپورین ۲ که مشابه با آکواپورین ۱ است در سلول‌های اپیلیتال کلیه یافت می‌شوند که آب را از ادرار بازجذب می‌کنند.

1- Hypotonic solution 2- Hypertonic solution



▲ **تصویر تجربی ۷-۱۱ بیان آکواپورین توسط تخمک قورباغه نفوذپذیری آنها را به آب افزایش می‌دهد.** تخمک قورباغه به‌طور طبیعی نسبت به آب نفوذناپذیر است و پروتئین آکواپورین در آن بیان نمی‌شود. mRNA توسط ریز تزریقی[1] باعث کد شدن آکواپورین شده است. این شکل‌ها تخمک‌های کنترل (سلول‌های پایینی در هر قسمت) و تخمک‌های تزریق شده (سلول بالایی در هر قسمت) در زمان‌های تعیین شده بعد از انتقال از یک محلول نمکی ایزوتونیک (۰/۱mm) به محلول نمکی رقیق (۰/۰۳۵) را نشان می‌دهد. حجم تخمک‌های کنترل بدون تغییر باقی می‌ماند زیرا آنها نسبت به آب نفوذپذیری خیلی ضعیف دارند. در مقابل اووسیت‌های تزریق شده که آکواپورین در آنها بیان شده است متورم می‌شوند و سپس به علت جریان اسمزی آب منفجر می‌شوند که نشان می‌دهد آکواپورین‌ها پروتئین‌های کانال آبی هستند.



▲ **شکل ۸-۱۱: ساختار آکواپورین‌های پروتئینی کانال آب.** (a) مدل ساختاری پروتئین‌های تترامر که از چهار زیرواحد همسان تشکیل شده است. هر زیرواحد یک کانال آب را تشکیل می‌دهد که سمت I گروپلاسمی آن‌ها در این تصویر دیده می‌شود. یکی از منومرها را با سطح مولکولی در مدخل ورودی حفره می‌توان دید. (b) شکل شماتیک از توپولوژی یک زیرواحد منفرد آکواپورین در ارتباط با غشا. سه جفت از آلفاماریچ‌های ناقل غشایی مشابه (A و A′، B و B′، C و C′) در جهت مخالف با طرح غشا جهت‌گیری شده‌اند و به لوپ‌های آبگریز متصل شده‌اند که لوپ‌های آبگریز شامل ماریچ‌های کوتاهی که از غشا عبور نمی‌کنند می‌باشند دارای اسیدهای آمینه آسپاراژین (N) محافظت شده هستند. لوپ‌ها توسط شش ماریچ ناقل غشایی به داخل حفره خم شده‌اند و در قسمت میانی جمع شده و قسمتی از دریچه انتخابی آب را تشکیل داده‌اند. (c) نمای جانبی حفره در زیرواحد منفرد آکواپورین که چندین مولکول آب (اکسیژن‌های قرمز و هیدروژن‌های سفید) در داخل دریچه‌های انتخابی آب با طول ۲nm دیده می‌شوند که آب پرکننده دالان سیتوزولی را از خارج سلول جدا می‌کنند. دریچه شامل تعداد زیادی هیستیدین و آرژینین محافظت شده است و دو اسیدآمینه آسپاراژین (آبی) که زنجیره جانبی آنها با آب‌های انتقالی پیوند می‌شود (اسید آمینه کلیدی دریچه با رنگ آبی، پررنگ شده است). همچنین آب منتقل شده با گروه کربونیل زنجیره اصلی اسید آمینه سیستئین پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد. ترتیب این پیوندهای هیدروژنی و ابعاد ۰/۲۸nm حفره، از عبور پروتون‌ها (یعنی H_3O^+) با یون‌های دیگر جلوگیری می‌کند.

1- Microinjection

بنابراین مقدار آب بدن را کنترل می‌کنند. فعالیت آکواپورین ۲ توسط وازوپرسین که هورمون آنتی دیورتیک هم نامیده می‌شود، کنترل می‌گردد. تنظیم فعالیت آکواپورین ۲ در سلول‌های در حال استراحت کلیه[1] مشابه با GLUT4 در چربی و ماهیچه است که وقتی که نیازی به فعالیت آن نیست و وقتی سلول‌ها در حال استراحت هستند آب به شکل ادرار دفع می‌شود. آکواپورین ۲ به جای غشای پلاسمایی در غشاهای وزیکول‌های داخل سلولی قرار می‌گیرد و قادر نیست ورود آب به داخل سلول را کاتالیز کند. وقتی وازوپرسین که هورمونی پلی پپتیدی است به گیرنده وازوپرسین در سطح سلول متصل شود یک مسیر پیام دهی فعال می‌شود (جزئیات در فصل ۱۵) که باعث می‌شود آکواپورین‌های ۲ موجود در وزیکول‌ها به غشاهای پلاسمایی محلق شوند و سرعت جذب آب افزایش یابد و آب به جای ادرار به جریان خون برگردد. جهش‌های غیرفعال‌کننده در ژن آکواپورین ۲ یا وازوپرسین باعث **بیماری دیابت بی‌مزه**[2] می‌شود. در این نوع بیماری حجم زیادی از ادرار رقیق دفع می‌شود. این یافته‌ها علت بیماری را نشان می‌دهد و شرح می‌دهد که میزان آکواپورین ۲ سرعت محدودکننده برای بازجذب آب از ادرار است که توسط کلیه تشکیل می‌شود.

اعضای دیگر خانواده آکواپورین مولکول‌های دارای هیدروکسیل مانند گلیسرول را بیش از آب جا به جا می‌کنند. برای مثال آکواپورین ۳ در انسان گلیسرول را جا به جا می‌کند و با GIPF که پروتئین انتقال‌دهنده گلیسرول در اشرشیاکلی است از نظر توالی و ساختار اسیدهای آمینه مشابه است.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۱

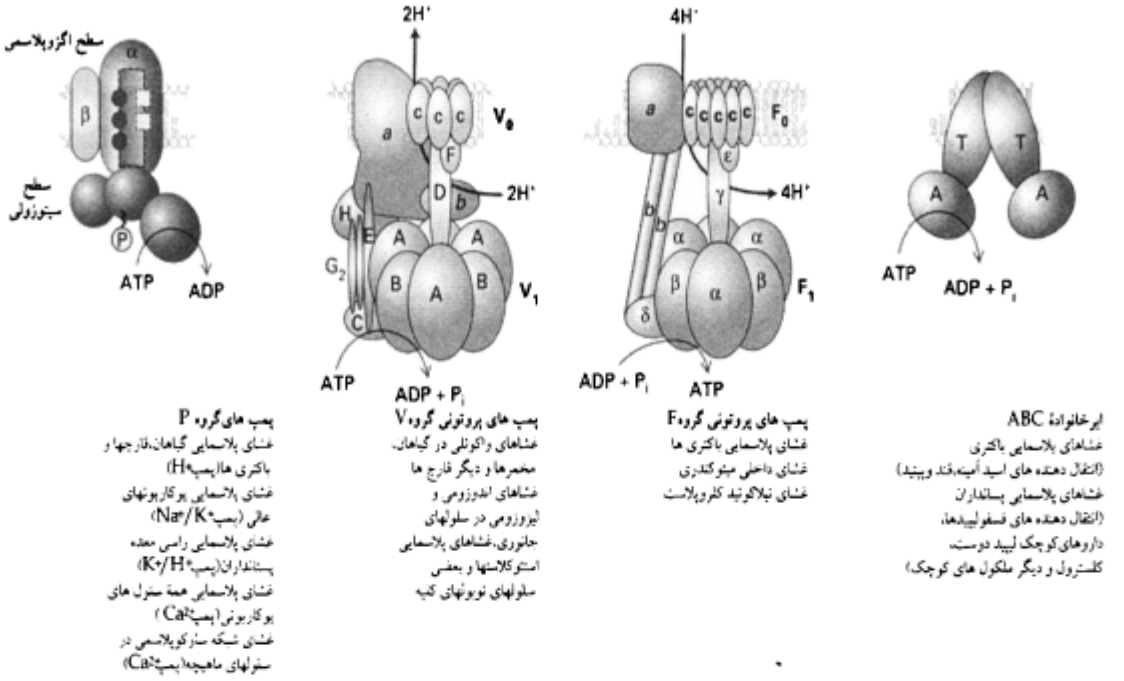
تک انتقالی گلوکز و آب

- انتقال کاتالیزی پروتئینی مواد محلول از عرض غشای پلاسمایی سریعتر از انتشار ساده رخ می‌دهد و هنگامیکه مقادیر محدودی از مولکولهای ناقل توسط سوبسترا اشباع شوند V_{max} (سرعت ماکزیمم) حاصل می‌شود (شکل ۴-۱۱ را ملاحظه کنید).
- پروتئین‌های تک انتقالی مثل ناقلین گلوکز (GLUTs) معمولاً بین دو شکل فضایی هستند. یک شکل که در آن سطوح محل اتصال سوبسترا در بیرون قرار دارد و دیگری که در آن سطوح محل اتصال در درون است (شکل ۵-۱۱ را ملاحظه کنید).
- تمام اعضای خانواده ناقلین قندها (GLUTs) ساختارهای مشابه دارند. تفاوت در مقادیر k_m، بیان در انواع مختلف بافتها و ویژگیهای سوبسترایی برای متابولیسم مناسب قندها در بدن مهم است.
- دو سیستم تجربی عمومی برای مطالعه عملکرد پروتئین‌های انتقالی، لیپوزومهای حاوی پروتئین ناقل تخلیص شده و سلولهای آلوده شده با ژن کدکننده پروتئین ناقل مورد نظر می‌باشند.
- بسیاری از غشاهای زیستی نیمه تراوا هستند و نفوذپذیری زیادی به آب نسبت به یونها و سایر مواد محلول دارند. آب بوسیله اسمز از عرض غشای پلاسمایی از طرف محلول با غلظت پایین به طرف محلول با غلظت بالا حرکت می‌کند.
- دیوارهٔ سخت سلولی در اطراف سلولهای گیاهی آنها را از پاره‌شدن حفظ کرده و باعث تولید فشار تورگر در پاسخ به ورود اسمزی آب به داخل می‌شود.
- در پاسخ به ورود آب، پروتوزوآها حجم طبیعی سلولهای خود را با خروج آب از واکوئلهای انقباضی حفظ می‌کنند.
- آکواپورین‌ها پروتئین‌های کانال آبی هستند که به طور اختصاصی نفوذپذیری غشای زیستی را به آب افزایش می‌دهند (شکل ۸-۱۱ را ملاحظه کنید).
- آکواپورین ۲ غشای پلاسمایی سلولهای خاص کلیه برای بازجذب آب از ادرار ضروری است؛ فقدان آکواپورین ۲ منجر به یک حالت بالینی بنام دیابت بی‌مزه می‌گردد.

۳-۱۱ پمپ‌های مصرف‌کننده ATP و محیط یونی داخل سلولی

در قسمت قبل ما روی پروتئین‌های انتقالی که ملکول‌ها را در جهت شیب غلظت منتقل می‌کنند تمرکز کردیم. در اینجا توجه خود را روی گروه اصلی پروتئین‌ها (پمپ‌های مصرف‌کننده ATP) متمرکز می‌کنیم که این پمپ‌ها انرژی رها شده توسط هیدرولیز پیوند فسفوانیدریدی انتهایی ATP را برای انتقال یون‌ها و ملکول‌های کوچک مختلف از طریق غشای پلاسمایی و برخلاف شیب غلظتشان مورد استفاده قرار می‌دهند. همه پمپ‌های مصرف‌کننده ATP، پروتئین‌های ناقل غشایی هستند که دارای یک یا تعدادی محل پیوندی برای ATP روی زیرواحدها یا قطعاتی از پروتئین که در سطح سیتوزولی است، می‌باشند. اگرچه این پروتئین‌ها عموماً

1- Resting kidney cells 2- Diabetes insipidus



▲ **شکل ۹-۱۱ چهار گروه از پروتئین‌های انتقالی مصرف‌کننده ATP.** موقعیت پمپ‌های خاص در بالای هر گروه نشان داده شده‌اند. پمپ‌های گروه P از دو زیرواحد کاتالیتیکی آلفا تشکیل شده‌اند که در قسمتی از چرخه انتقال، فسفریله می‌شوند. دو زیرواحد بتا در بعضی از این پمپ‌ها وجود دارند که احتمالاً انتقال را تنظیم می‌کنند. تنها یک زیرواحد آلفا وبتا ترسیم شده‌اند. پمپ‌های گروه V و F از میانجی‌های فسفوپروتئینی تشکیل نشده‌اند و تنها پروتون را انتقال می‌دهند. این پمپ‌ها ساختارشان مشابه است و دارای پروتئین‌های مشابه هستند اما زیرواحدهای آنها با پمپ‌های گروه P وابستگی ندارند. پمپ‌های گروه V، هیدرولیز ATP را با انتقال پروتون برخلاف شیب غلظت جفت می‌کنند. در صورتی که پمپ‌های گروه F به‌طور طبیعی در جهت عکس عمل می‌کنند و انرژی شیب غلظت پروتون یا الکتروشیمیایی را برای سنتز ATP استفاده می‌کنند. اعضای پروتئینی زیرخانواده بزرگ ABC شامل دو دُمین ناقل غشایی (T) و دو دُمین سیتوزولی باندشونده به ATP(A) است که هیدرولیز ATP را با جا به جایی ماده حل شونده همراه می‌کند. این دُمین‌های هسته‌ای به صورت زیرواحد جداگانه در بعضی از پروتئین‌های ABC (در اینجا ترسیم شده‌اند) حضور دارند اما در دیگر پروتئین‌های ABC به یک پلی پپتید ملحق شده‌اند.

ATPase نامیده می‌شوند ولی به‌طور طبیعی ATP را به ADP و P_i هیدرولیز نمی‌کنند مگر اینکه یون‌ها یا دیگر مولکول‌ها به‌طور همزمان جابه جا شوند. به علت این جفت شدن قوی بین هیدرولیز ATP و انتقال، انرژی ذخیره شده در پیوند فسفوانیدریدی بیهوده تلف نمی‌شود و بیشتر برای جا به جایی یون‌ها و دیگر مولکول‌ها به‌طور سربالایی در خلاف شیب الکتروشیمیایی مصرف می‌شود. همان طور که در شکل ۲-۱۱ مشاهده می‌شود این شیب غلظتی توسط پروتئین‌های انتقالی دیگر برای تقویت حرکت سربالایی انواع مولکول‌های دیگر استفاده می‌شود.

گروه‌های مختلف پمپ‌ها، خصوصیات ساختاری و عملکردی مشخصی را نشان می‌دهند

ساختار عمومی چهار گروه از پمپ‌های مصرف‌کننده ATP در شکل ۹-۱۱ ترسیم شده است و مثال‌های اختصاصی در هر گروه در پایین شکل فهرست شده است. توجه کنید که اعضای سه گروه (F,P و V) فقط یون‌ها را انتقال می‌دهند در صورتی که اعضای زیرخانواده ABC، مولکول‌های کوچک از قبیل اسیدهای آمینه و قندها را جابه جا می‌کنند.

همه پمپ‌های یونی گروه P از دو زیرواحد کاتالیتیکی آلفای همسان تشکیل شده‌اند که هر کدام دارای یک محل پیوندی برای ATP است. همچنین اغلب آنها دارای دو زیرواحد بتای کوچکتر هستند که معمولاً دارای عملکرد تنظیمی است. در طول انتقال، حداقل یکی از زیرواحدهای آلفا فسفریله می‌شود (به همین دلیل P نامیده می‌شوند) و یون‌های انتقالی از بین زیرواحد فسفریله شده حرکت می‌کنند. توالی اسید آمینه‌ای در اطراف اسید آمینه فسفریله شده در پمپ‌های مختلف مشابه است. این گروه شامل

Na^+/K^+ ATPase در غشای پلاسمایی است که باعث تولید غلظت Na^+ سیتوزولی کم و غلظت بالای سیتوزولی K^+ به‌طور تیپیک در سلول‌های جانوری می‌شود (شکل ۲-۱۱ را ملاحظه کنید).

ATPaseهای کلسیمی معینی یون‌های Ca^{2+} را به بیرون از سیتوزول و به محیط‌های خارج پمپ می‌کنند. دیگر پمپ‌های کلسیمی، Ca^{2+} را از سیتوزول به شبکه آندوپلاسمی یا به داخل ER خاصی که **شبکه سارکوپلاسمی** نامیده می‌شود و در داخل سلول‌های ماهیچه یافت می‌شود، پمپ می‌کنند. اعضای دیگر گروه P در سلول‌های ترشح‌کننده اسید در معده پستانداران یافت می‌شوند و پروتون‌ها (یون‌های H^+) را خارج کرده و یون‌های K^+ را به داخل سلول منتقل می‌کنند.

ساختار پمپ‌های یونی V و F شبیه به یکدیگر است اما به هم مرتبط نیستند و پیچیده‌تر از پمپ‌های گروه P هستند. پمپ‌های گروه V و F دارای چندین زیرواحد ناقل غشایی و سیتوزولی مختلف هستند. همه پمپ‌های شناخته شده F و V تنها پروتون را انتقال داده و فرایندی را انجام می‌دهند که در آن میانجی فسفوپروتیئنی وجود ندارد. عموما پمپ‌های گروه V طوری عمل می‌کنند که pH را در واکوئل‌های گیاهی و لیزوزوم و دیگر وزیکول‌های اسیدی در سلول‌های جانوری حفظ کنند که این عمل را با پمپ کردن پروتون از سطح سیتوزولی به سطح اگزوپلاسمی غشا برخلاف شیب الکتروشیمیایی پروتون انجام می‌دهند. پمپ‌های H^+ که پتانسیل الکتریکی غشای پلاسمایی را در سلول‌های گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید و حفظ می‌کنند متعلق به این گروهند. پمپ‌های گروه F در غشای پلاسمایی باکتری‌ها و در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها یافت می‌شوند. پمپ‌های گروه F بر خلاف گروه V، عموماً به‌عنوان یک نوع پمپ برگرداننده پروتون عمل می‌کنند که انرژی آزاد شده توسط جابه جایی پروتون از سطح اگزوپلاسمی به سیتوپلاسمی غشا در جهت شیب الکتروشیمیایی پروتون نیروی مورد نیاز سنتز ATP از ADP و P_i را تامین می‌کند. پمپ‌های پروتونی گروه F به علت اهمیت‌شان در سنتز ATP در کلروپلاست و میتوکندری، عموما ATP سنتاز نامیده شده و جداگانه در فصل ۱۲ بحث می‌شوند.

آخرین گروه پمپ‌های مصرف‌کننده ATP خانواده بزرگی از چندین عضو هستند که از لحاظ عملکرد متفاوت از گروه‌های دیگر هستند. آنها را به صورت **سوپرخانواده** ABC (نوارهای پیوند شونده به ATP[1]) نام می‌بریم که این گروه شامل صدها پروتئین انتقالی متفاوتند که در ارگانیسم‌های متفاوت از باکتری تا انسان یافت می‌شوند. با توجه به جزئیات بالا، بعضی از این پروتئین‌های انتقالی در ابتدا به‌عنوان پروتئین‌های مقاوم در برابر داروهای چندتایی تعیین می‌شوند که وقتی به میزان زیاد در سلول‌های سرطانی بیان شوند باعث خروج داروهای ضدسرطان به بیرون سلول می‌شوند و تومورها را در مقابل عمل داروها مقاوم می‌کنند. هر پروتئین ABC برای یک ماده یا یک گروه مادهٔ مشابه اختصاصی است که شاید این مواد یون‌ها، قندها، اسیدهای آمینه، فسفولیپیدها، کلسترول، پپتیدها، پلی ساکاریدها یا حتی پروتئین‌ها باشند. همه پروتئین‌های انتقالی ABC از یک سازماندهی ساختاری شامل چهار دُمین «هسته‌ای» تشکیل شده‌اند. دو دُمین ناقل غشایی (T) که مسیری را در وسط تشکیل می‌دهد که مولکول‌ها از طریق غشا عبور می‌کنند و دو دُمین پیوندی به ATP در سطح سیتوزولی (A). در بعضی پروتئین‌های ABC، بیشتر در باکتری‌ها، دُمین‌های هسته‌ای در چهار پلی پپتید جداگانه ارائه می‌شوند. در سایرین، دُمین‌های هسته‌ای به یک یا دو پلی پپتید چند دُمینی ملحق می‌شوند.

پمپ‌های یونی مصرف‌کننده ATP شیب یونی را در عرض غشاهای سلولی ایجاد و حفظ می‌کنند

ترکیبات یونی مخصوص سیتوزول معمولاً به میزان زیادی از مایعات احاطه‌کننده محیط خارجی سلول متفاوتند. در واقعیت pH سیتوزولی همه سلول‌ها شامل سلول‌های میکروبی، گیاهی و جانوری بدون توجه به pH خارج سلولی در حدود ۷/۲ است. در موارد بسیار زیادی بین pH سیتوزولی سلول‌های اپیتلیال آسترکننده معده و pH لومن معده میلیون‌ها برابر اختلاف غلظت H^+ وجود دارد. همچنین غلظت سیتوزولی K^+ بیشتر از Na^+ است. غلظت K^+ در مهره داران و بی مهرگان ۴۰-۲۰ بار در سلول‌ها بیشتر از خون است در حالی که غلظت سدیم ۱۲-۸ بار در سلول‌ها پایین‌تر از خون است (شکل ۲-۱۱ و جدول ۲-۱۱ را ملاحظه کنید). بعضی از Ca^{2+}ها در سیتوزول به گروه‌های با بار منفی موجود در ATP و دیگر مولکول‌ها می‌چسبند. اما غلظت آزاد کلسیم باند نشده یک حد بحرانی برای عملکرد مسیرهای پیام رسانی و انقباض ماهیچه است. غلظت Ca^{2+} آزاد در سیتوزول عموما کمتر از ۰/۲ میکرومولار ($2\times10^{-7}M$) است و هزاران بار یا بیشتر از غلظت آن در خون کمتر است. سلول‌های گیاهی و بسیاری میکروارگانیسم‌ها به‌طور مشابه غلظت سیتوزولی K^+ را در حد بالا و غلظت Ca^{2+} و Na^+ را در حد پایین نگه می‌دارند حتی اگر سلول‌ها در محلول‌های نمکی بسیار

1- ATP - binding cassette

رقیق کشت داده شوند.

پمپ‌های یونی که در این قسمت بحث شد به میزان زیادی مسئول تثبیت و حفظ غلظت یونی معمول در عرض غشای پلاسمایی و غشاهای داخل سلولی‌اند. سلول‌ها برای انجام این عمل انرژی قابل ملاحظه‌ای را مصرف می‌کنند. برای مثال، بیشتر از ۲۵ درصد ATP تولید شده توسط سلول‌های عصبی و کلیه برای انتقال یون استفاده می‌شوند و گلبول‌های قرمز انسان بیش از ۵۰ درصد از ATP موجودشان را برای این هدف مصرف می‌کنند. در این مورد اغلب این ATP برای تأمین نیروی پمپ Na^+/K^+ مورد استفاده قرار می‌گیرد. برآیند شیب K^+ و Na^+ در سلول‌های عصبی برای سرعت و کافی بودن قابلیت آنها در هدایت پیام‌های الکتریکی اهمیت دارد و جزئیات آن را در فصل ۲۳ بحث خواهیم کرد.

آنزیم‌های معینی برای سنتز پروتئین در همه سلول‌ها نیاز به غلظت بالای K^+ دارند و توسط غلظت بالای سدیم مهار می‌شوند. عمل اینها بدون عملکرد پمپ Na^+/K^+ متوقف می‌شود. در سلول‌هایی که با سم‌های مهارکننده تولید ATP (مثل ۲ و ۴ دی نیتروفنل در سلول‌های هوازی) تیمار شده‌اند، پمپ شدن متوقف شده و غلظت یون‌ها در سلول به تدریج به غلظت محیط خارج نزدیک می‌شود و یون‌ها به‌طور خودبه خودی از طریق کانال‌های غشای پلاسمایی در جهت شیب الکتروشیمیایی حرکت می‌کنند. سرانجام سلول‌های تیمار شده می‌میرند که تا حدودی به این علت است که سنتز پروتئین به غلظت بالای یون K^+ نیاز دارد و بخشی به این علت است که در غیاب شیب Na^+ در عرض غشای سلولی، سلول قادر به ورود مواد غذایی مثل اسیدهای آمینه نیست. مطالعه روی اثرات این قبیل سم‌ها اخیرا مدارکی را برای وجود و اهمیت پمپ‌های یونی فراهم کرده است.

استراحت ماهیچه به پمپ Ca^{2+} ATPase که Ca^{2+} را از سیتوزول به شبکه سارکوپلاسمی پمپ می‌کنند وابسته است

یون‌های کلسیم در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی جمع شده و در شبکه سارکوپلاسمی (SR) ذخیره می‌شوند. یون‌های کلسیم ذخیره شده در اثر انقباض از طریق کانال‌های یونی از لومن SR به داخل سیتوزول رها می‌شوند که در فصل ۱۷ بحث می‌شود. یک Ca^{2+}ATPase در غشای SR ماهیچه اسکلتی، Ca^{2+} را از سیتوزول به سمت لومن SR پمپ می‌کند و بدین وسیله استراحت را در ماهیچه القا می‌کند. به علت اینکه پمپ‌های کلسیمی ماهیچه‌ای از بیش از ۸۰ درصد پروتئین داخلی در غشاهای SR تشکیل شده‌اند، تخلیص آنها از دیگر پروتئین‌های غشایی ساده است و به میزان گسترده‌ای مطالعه شده است. تعیین ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها در چندین حالت ساختمان‌فضایی که نشان دهنده مراحل مختلف فرایند پمپ کردن است به میزان زیادی مکانیسم عمل آنها را نشان می‌دهد.

در سیتوزول سلول‌های ماهیچه، غلظت Ca^{2+} آزاد از $10^{-7}M$ (سلول‌های در حال استراحت) تا 10^{-6} (سلول‌های منقبض) متغیر است. در صورتی که غلظت کلی Ca^{2+} در لومن SR می‌تواند بالای $10^{-2}M$ باشد. دو پروتئین محلول در لومن وزیکولهای SR به Ca^{2+} می‌چسبند و به عنوان مخزنی برای Ca^{2+} داخل سلولی عمل می‌کنند و به این وسیله غلظت یون‌های کلسیم آزاد در وزیکول‌های SR و در نتیجه انرژی مورد نیاز برای پمپ کردن یون کلسیم از سیتوزول به داخل SR را کاهش می‌دهند. فعالیت ATPase کلسیمی ماهیچه، غلظت کلسیم آزاد در منابع سیتوزولی را افزایش می‌دهد. در سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی، پمپ‌های کلسیم در غشای SR و هماهنگ با پمپ‌های کلسیمی مشابه در غشای پلاسمایی کار می‌کنند تا غلظت سیتوزولی کلسیم آزاد در ماهیچه‌های در حال استراحت بالای $1\mu m$ باقی بماند.

مدل رایج برای مکانیسم Ca^{2+}ATPase در غشای SR شامل چندین حالت ساختمان‌فضایی است. برای سادگی اینها را گروه‌بندی می‌کنیم. در حالت E_1 دو محل اتصالی برای Ca^{2+} وجود دارد که در مرکز دُمین گذرنده از غشا در سمت سیتوزولی قرار دارد و حالت E_2 که این محل‌های پیوندی به طرف سطح اگزوپلاسمی غشا، در داخل لومن SR قرار دارد. همراهی هیدرولیز ATP با پمپ شدن یونی شامل چندین تغییر ساختمان‌فضایی در پروتئینی است که باید با یک نظم معین رخ دهد و در شکل ۱۰-۱۱ نشان داده شده است. وقتی پروتئین در ساختمان‌فضایی E_1 است، دو یون Ca^{2+} به دو محل پیوندی دارای میل ترکیبی بالا که در طرف سیتوزولی است می‌چسبد. اگر چه غلظت Ca^{2+} خیلی کم است (جدول ۲-۱۱ را ملاحظه کنید)، ولی یون‌های کلسیم این محل‌ها را پر می‌کنند. در مرحله بعد یک ATP به یک محل بر روی سطح سیتوزولی متصل می‌شود (مرحله ❶). ATP در یک واکنشی که نیاز به Mg^{2+} دارد به ADP هیدرولیز می‌شود و فسفات رها شده به اسید آمینه آسپارتات در پروتئین منتقل می‌شود. تشکیل پیوند آسیل فسفات با انرژی بالا به صورت E1~P نشان داده می‌شود (مرحله ❷). سپس پروتئین‌ها یک تغییر ساختمان‌فضایی را طی می‌کنند که E2 تولید می‌شود و میل ترکیبی دو محل اتصالی به Ca^{2+} کاهش می‌یابد (شکل ۱۱a-۱۱) و این محل‌ها در این زمان در دسترس لومن SR قرار دارند (مرحله

جدول ۲-۱۱ - غلظت‌های درون سلولی و برون سلولی بعضی از یون‌ها

یون	سلول (mM)	خون (mM)
اکسون اسکوئید (بی‌مهرگان*)		
K^+	۴۰۰	۲۰
Na^+	۵۰	۴۴۰
Cl^-	۴۰-۱۵۰	۵۶۰
Ca^{2+}	۰/۰۰۰۳	۱۰
X^{-+}	۳۰۰-۴۰۰	۵-۱۰
سلول‌های پستانداران (مهره‌داران)		
K^+	۱۳۹	۴
Na^+	۱۲	۱۴۵
Cl^-	۴	۱۱۶
HCO_3^-	۱۲	۲۹
X^-	۱۳۸	۹
Mg^{2+}	۰/۸	۱/۵
Ca^{2+}	< ۰/۰۰۰۲	۱۱۸

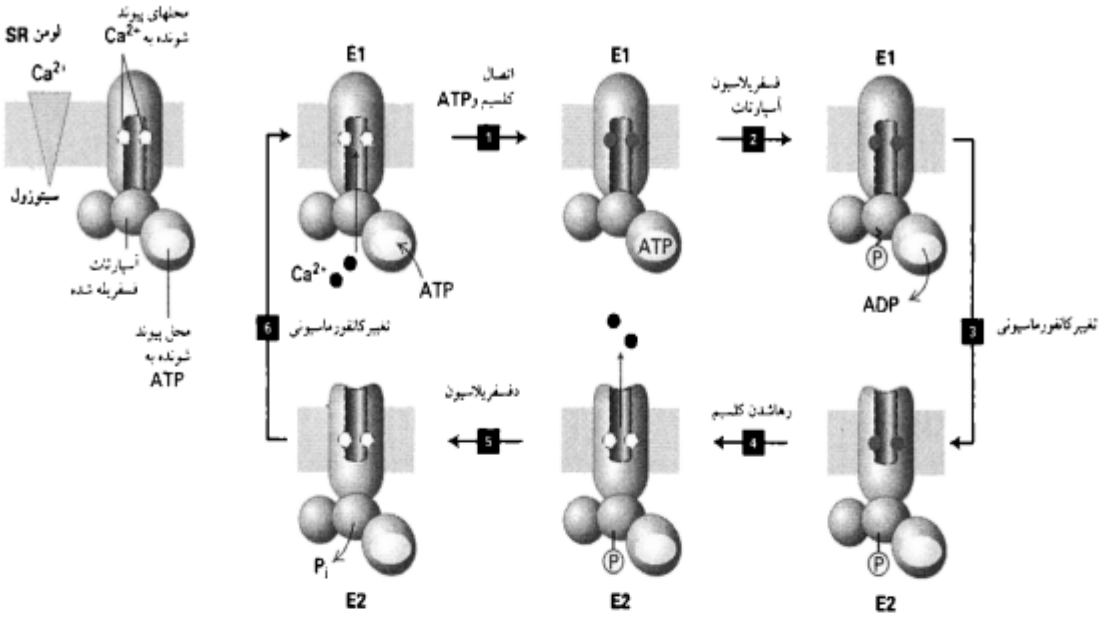
* آکسون عصبی بزرگ اسکوئید به طور وسیعی در مطالعهٔ مکانیسم هدایت تحریکات الکتریکی استفاده شده است.

+ نشان‌دهندهٔ پروتئین‌هایی هست که دارای بار منفی خالص در pH خنثی خون و سلول‌ها هستند.

❸). انرژی آزاد هیدرولیز پیوند آسپارتیل فسفات در E1~P بیشتر از E2~P است و این کاهش انرژی آزاد پیوند آسپارتیل فسفات، نیروی محرکهٔ تغییر ساختمان‌فضایی E1→E2 را فراهم می‌کند. یون‌های Ca^{2+} به‌طور خودبه خودی از محل‌هایی با میل ترکیبی کم جدا شده و وارد لومن SR می‌شوند. به همین دلیل هرچند غلظت کلسیم بیشتر از سیتوزول است ولی دارای K_d پایین‌تری برای اتصال Ca^{2+} در محل میل ترکیبی کم است (مرحله ❹). در پایان، پیوند آسپارتیل فسفات هیدرولیز می‌شود (مرحله ❺). دفسفریله شدن، نیروی تغییر ساختمان‌فضایی E1→E2 را فراهم می‌کند (مرحله ❻) و E1 برای انتقال دو یون کلسیم آماده می‌شود. بنابراین هیدرولیز یک پیوند فسفوانیدریدی در ATP برای پمپ کردن Ca^{2+} در خلاف شیب غلظت به سمت لومن SR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اکثر مدارک ساختاری و بیوفیزیکی مدل رسم شده در شکل ۱۰-۱۱ را حمایت می‌کنند. برای مثال پمپ کلسیمی ماهیچه با فسفات چسبیده به اسید آمینه کلیدی آسپارتات جدا شده است و مطالعات طیف سنجی تغییرات جزئی در ساختمان‌فضایی پروتئین در طی تبدیل E2→E1 را آشکار کرده‌اند. همچنین دو حالت فسفریله از نظر بیوشیمیایی هم قابل تشخیص است. اضافه کردن ADP به E1 فسفریله شده باعث سنتز ATP می‌شود که عکس مرحله یک در شکل ۱۰-۱۱ است. در صورتی که اضافه کردن ADP به E2 فسفریله شده باعث این عمل نمی‌شود. همچنین هر حالت ساختمان‌فضایی اصلی از چرخه واکنش با یک قابلیت متفاوت برای آنزیم‌های پروتئولیتیک متفاوت مثل تریپسین توصیف می‌شود.

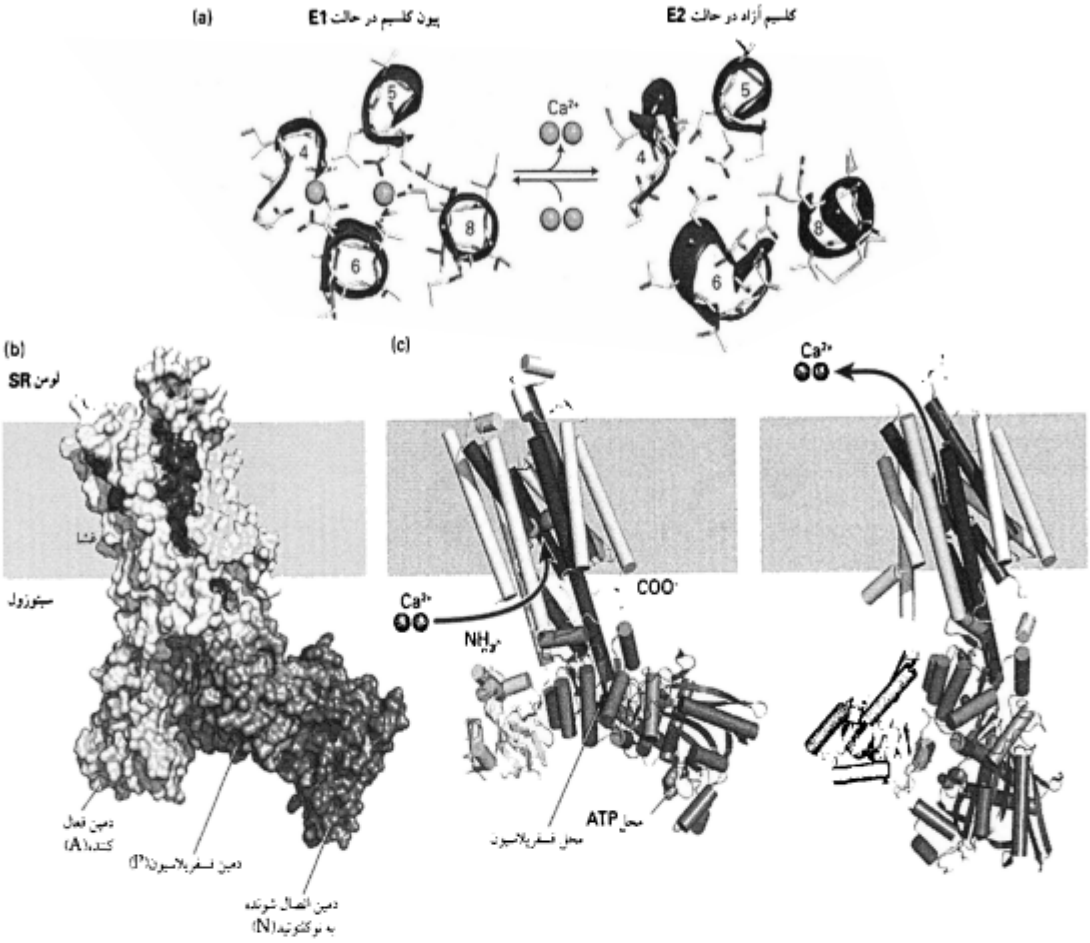
همان طور که دیده شد در ساختار سه بعدی پمپ‌های کلسیمی در حالت E1، ده آلفاماریچ گذرنده از غشا در زیرواحد کاتالیتیک مسیر عبوری را تشکیل می‌دهند که یون کلسیم حرکت می‌کند و اسیدهای آمینه در چهار عدد از این ماریچ دو محل باند شونده به کلسیم با میل ترکیبی بالا در E_1 را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۱a-۱۱ سمت چپ). یک محل، بیرون اتم‌های اکسیژنِ دارای بار منفی از گروه‌های کربوکسیل (COO^-) گلوتامات و زنجیره جانبی آسپارتات و از مولکول‌های آب تشکیل می‌شود. محل دیگر از اتم‌های اکسیژن زنجیره جانبی و اصلی تشکیل می‌شود. بنابراین اغلب ملکول‌های آب که به‌طور طبیعی یون کلسیم را در محلول‌های آبی احاطه می‌کنند به وسیله اتم‌های اکسیژن چسبیده به پروتئین جایگزین می‌شوند. در مقابل، در حالت E2، (شکل ۱۰a-۱۱ سمت راست) چندین زنجیره جانبی پیوندی، به اندازه یک نانومتر حرکت می‌کنند و قادر به برهمکنش با یون Ca^{2+} نیستند وحالت E2 دارای میل ترکیبی کم برای یون‌های Ca^{2+} به شمار می‌آید.



شکل ۱۰-۱۱ مدل عملکردی Ca^{2+} ATPase در غشای SR سلول‌های ماهیچه‌ای اسکلتی. تنها یکی از دو زیرواحد آلفای کاتالیتیک از پمپ گروه P رسم شده است، E1 و E2 ساختمان‌فضایی‌های مختلف پروتئین هستند که محل‌های پیوندی Ca^{2+} به ترتیب در دسترس سطح‌های سیتوزولی و اگزوپلاسمی‌اند (توالی منظمی از مراحل ❻ - ❶). همان طور که در اینجا رسم شده است همراهی هیدرولیز ATP و انتقال یون‌های کلسیم از طریق غشا ضروری است. در شکل P~ نشان دهنده پیوند آسپارتیل فسفات با انرژی بالاست و P- نشان دهنده پیوند با انرژی کم است. به علت اینکه میل ترکیبی کلسیم به محل ترکیبی سطح سیتوزولی در حالت E1 هزار مرتبه از میل ترکیبی Ca^{2+} به محل پیوندی در سطح اگزوپلاسمی بالاتر است این پمپ، کلسیم را به‌طور یک طرفه از سیتوزول به غشای SR منتقل می‌کند. متن و شکل ۱۱-۱۱ را برای جزئیات بیشتر مشاهده کنید.

قسمت اگزوپلاسمی پمپ Ca^{2+} از سه دُمین تشکیل شده است که در حالت E1 به خوبی از یکدیگر قابل تفکیک‌اند (شکل ۱۱-۱۱b). هر کدام از این دُمین‌ها توسط اسیدهای آمینه قطعات کوتاه به مارپیچ‌های گذرنده از غشای سلولی متصل شده‌اند و حرکت این دُمین‌های سیتوزولی باعث مطابقت حرکات مارپیچ‌های آلفای گذرنده از غشای سلولی متصل شده می‌شود. اسید آمینه فسفریله شده یعنی Asp^{351} روی دُمین P قرار گرفته است و قسمت آدنوزین ATP به دُمین N متصل می‌شود. در ادامه با پیوند شدن ATP و کلسیم، دُمین N حرکت می‌کند تا فسفات γ از پیوند ATP مجاور آسپارتات روی دومین P قرار گیرد که فسفات را بگیرد. هرچند جزئیات این تغییرات ساختمان‌فضایی هنوز مشخص نیست ولی تصور می‌شود این حرکات توسط جنبش‌های قیچی مانند قطعات متصل شده به جابه جایی چندین مارپیچ آلفای گذرنده از غشا منتقل شود. این تغییرات مخصوصاً در چهار مارپیچ که دارای دو محل پیوندی برای کلسیم هستند واضح است. این تغییرات مانع جدا شدن پیوند یون‌های کلسیم در سیتوزول می‌شوند اما در محیط اگزوپلاسمی قادر به جدا شدن هستند. این تغییرات هم چنین پیوند دو یون کلسیم را تضعیف می‌کند و با مقایسه ساختاری در شکل ۱۱-۱۱a می‌توان آن را دید. این تضعیف شدن، یون‌های پیوندی را قادر می‌سازد از فضای اگزوپلاسمی یا همان لومن SR جدا شوند. سپس یون‌های Ca^{2+} جدا شده و آسپارتیل فسفات هیدرولیز می‌شود و پروتئین به ساختمان‌فضایی E1 بر می‌گردد.

در همه پمپ‌های یونی گروه P بدون توجه به یون‌هایی که منتقل می‌کنند، به میزان زیادی اسیدهای آمینه آسپارتات در آنها در طول فرایند محافظت می‌شود. بنابراین مدل‌های عملکردی در شکل ۱۱-۱۱ عموماً برای همه پمپ‌های یونی مصرف‌کننده ATP کاربرد دارند. به علاوه، زیرواحد کاتالیتیک α در همه پمپ‌های P که تا این تاریخ مورد بررسی قرار گرفته است دارای وزن مولکولی مشابه هستند که این اطلاعات از توالی‌های اسیدآمینه‌ای مشتق شده از تکثیر cDNA استنتاج شده‌اند و ترتیب قرار گرفتن مارپیچ‌های آلفای ناقل غشایی و دُمین‌های A و D و N که به سمت سیتوزول بوده‌اند مشابهند (شکل ۱۰-۱۱ را ملاحظه کنید). این یافته‌ها به‌طور قوی پیشنهاد می‌کند که با وجودی که همه این پروتئین‌ها هم اکنون یون‌های مختلفی را منتقل می‌کنند ولی شامل یک پیش ساز مشترکند.



▲ **شکل ۱۱-۱۱ (شکل رنگی) ساختار زیرواحد آلفای کاتالیتیک Ca^{2+}ATPase ماهیچه.** (a) محل‌های اتصال به Ca^{2+} در حالت E2 دارای میل ترکیبی است (راست) و بدون یون‌های پیوندی است در حالت E_1 (چپ) دارای دو یون کلسیم پیوند شده است. زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه کلیدی سفیدند و اتم‌های اکسیژن در زنجیره‌های جانبی گلوتامات و آسپارتات قرمزند. در ساختمان‌فضایی E1 با میل ترکیبی بالا، یون‌های کلسیم به دو محل مارپیچ‌های ۴ و ۵ و ۶ و ۸ در داخل غشا متصل می‌شوند. یک محل بیرون از اتم‌های اکسیژن دارای بار منفی از زنجیره‌های جانبی گلوتامات و آسپارتات و ملکول‌های آب تشکیل می‌شود (نشان داده نشده است) و محل دیگر بیرون از اتم‌های اکسیژن زنجیره جانبی و اصلی تشکیل می‌شود. هفت اتم اکسیژن یون‌های کلسیم را در این دو محل احاطه می‌کنند. (b) مدل سه بعدی پروتئین در حالت E1 که ساختار آن توسط کریستالوگرافی اشعه x تعیین شده است. دُمین متصل شونده به نوکلئوئید (VN) آبی، دُمین فسفریله شده P (سبز) و دُمین فعال‌کننده (A) (نخودی رنگ) که دو مارپیچ گذرنده از غشا را متصل می‌کند. (c) مدل‌هایی از پمپ در حالت E1 (چپ) و حالت E2 (راست). به اختلاف بین حالت‌های E1 و E2 در ساختمان‌فضایی‌های دُمین‌های متصل شونده به نوکلئوتید و فعال‌کننده توجه کنید. این حرکات نیروی محرکه تغییرات ساختمان‌فضایی مارپیچ‌های آلفای گذرنده از غشا (ارغوانی) را تأمین می‌کند که محل‌های متصل شونده به Ca^{2+} را تشکیل می‌دهند و آنها از حالتی که محل‌های اتصالی به Ca^{2+} در دسترس سطح سیتوزولی هستند (حالت E1) به پیوندهای سست یون‌های کلسیمی که در دسترس سطح اگزوپلاسمی هستند (حالت E2) تبدیل می‌شوند.

کالمودولین پمپ‌های کلسیمی غشای پلاسمایی را تنظیم می‌کند و باعث کنترل غلظت کلسیم سیتوزولی می‌شود

همان طور که در فصل ۱۵ توضیح خواهیم داد یک افزایش کم در غلظت یون‌های Ca^{2+} آزاد در سیتوزول باعث شروع پاسخ‌های سلولی متنوع می‌شود. برای اینکه کلسیم به‌طور صحیح در پیامدهی داخل سلولی عمل کند، غلظت یون‌های کلسیم آزاد در سیتوزول معمولاً باید زیر ۰/۱-۰/۲μM نگه داشته شود. سلول‌های جانوران، مخمرها و احتمالاً سلول‌های گیاهی Ca^{2+} ATPase غشای

سیتوپلاسمی را بیان می‌کنند تا کلسیم بر خلاف شیب الکتروشیمیایی به بیرون منتقل شود. زیرواحد آلفای کاتالیتیکی این‌پمپ‌های گروه P از نظر ساختار و توالی شبیه به زیرواحد آلفای پمپ‌های کلسیمی SR و ماهیچه است.

فعالیت Ca^{2+} ATPase غشای پلاسمایی توسط کالمودولین[1] تنظیم می‌شود که یک پروتئین متصل شونده به Ca^{2+} در سیتوزول است (شکل ۳۱-۳ را ملاحظه کنید). افزایش کلسیم سیتوزولی باعث القای چسبیدن یون‌های کلسیم به کالمودولین می‌شود که باعث شروع فعال شدن آلوستریک Ca^{2+}ATPase می‌شود. در نتیجه خروج یون‌های کلسیم از سلول سریع می‌شود و سریعاً به غلظت کم کلسیم سیتوزولی آزاد که ویژگی سلول‌های در حال استراحت است بر می‌گردند.

N^+/K^+ATPase باعث حفظ غلظت‌های Na^+ و K^+ داخل سلولی در سلول‌های جانوری می‌شود

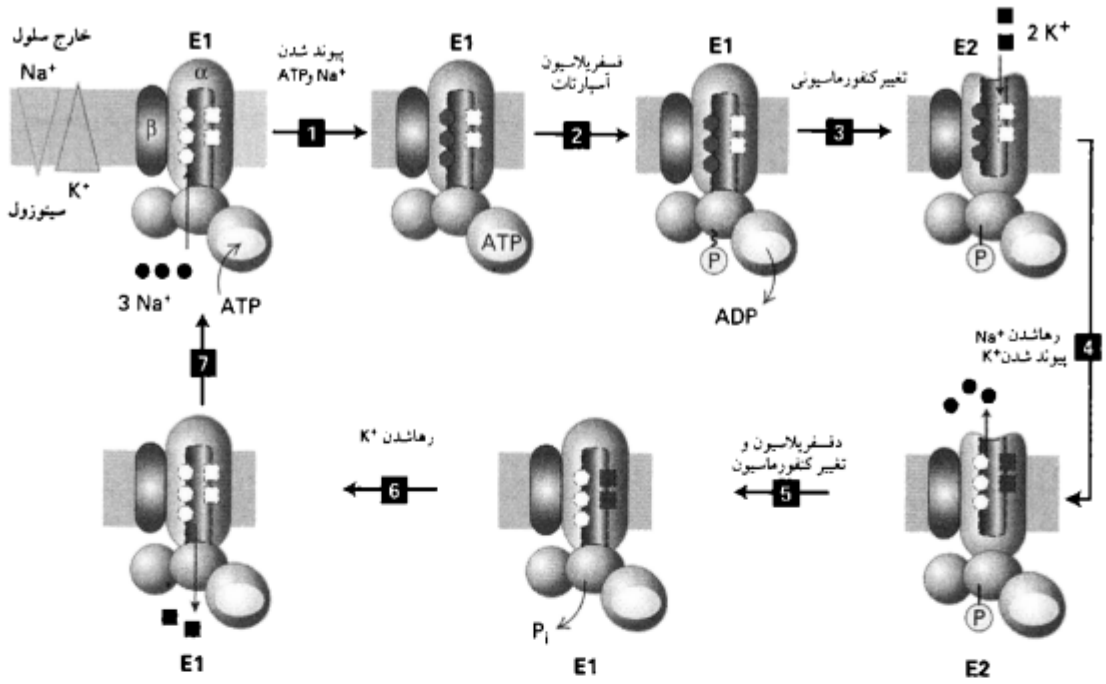
دومین پمپ‌های یونی مهم گروه P که در غشای پلاسمایی همه سلول‌های جانوری حضور دارند Na^+/K^+ATPase ها هستند. این پمپ‌های یونی به صورت تترامری از ترکیب زیرواحدی $\alpha_2\beta_2$ هستند. (آزمایش کلاسیک ۱-۱۱ کشف این آنزیم را توصیف می‌کند). پلی پپتید بتای گلیکوزیله و کوچک به زیرواحد آلفایی که جدیداً سنتز شده است کمک می‌کند تا به‌طور صحیح در شبکه اندوپلاسمی فولد شود. اما ظاهراً به‌طور مستقیم در پمپ شدن یون‌ها درگیر نمی‌شود. توالی اسیدهای آمینه و پیش گویی ساختار چهارم زیرواحد آلفای کاتالیتیک بسیار به Ca^{2+} ATPase در SR ماهیچه شبیه است (شکل ۱۱-۱۱ را ملاحظه کنید). به ویژه Na^+/K^+ATPase روی سطح سیتوزولی قطعاتی دارد که به دُمین N متصل شونده به ATP و آسپارتات فسفریله شده روی دُمین P و دُمین A به قطعات فرورفته در غشا می‌چسبد. کلاً فرایند انتقال، سه یون Na^+ را خارج و دو یون K^+ را به ازای هیدرولیز هر مولکول ATP وارد می‌کند. مکانیسم عمل Na^+/K^+ATPase در شکل ۱۲-۱۱ مختصراً شرح داده شده و به پمپ کلسیمی ماهیچه شبیه است به استثنای اینکه یون‌ها در دو جهت از طریق غشا پمپ می‌شوند یعنی هر یونی برخلاف شیب غلظت حرکت می‌کند. ساختمان‌فضایی Na^+/K^+ATPase E_1 سه محل با میل ترکیبی بالا نسبت به Na^+ و دو محل با میل ترکیبی کم نسبت به K^+ دارند که در سطح سیتوزولی پروتئین است. K_m برای پیوند شدن Na^+ به این محل‌های سیتوزولی ۰/۶mM است که یک مقداری است که به‌طور ملاحظه‌ای از غلظت Na^+ داخل سلولی یعنی حدود ۱۲mM کمتر است و در نتیجه به‌طور طبیعی یون‌های Na^+ این محل‌ها را کاملاً اشغال می‌کنند. برعکس، میل ترکیبی محل‌های پیوندی به K^+ در سطح سیتوزولی به اندازه کافی نسبت به یون‌های K^+ پایین است و از طریق پروتئین به سمت داخل منتقل می‌شود و از E1 در داخل سیتوزول با وجود غلظت بالای K^+ خارج سلولی جدا می‌شود. در طول انتقال E1→E2، سه محل پیوند یون سدیم در دسترس اگزوپلاسمی قرار می‌گیرد و به‌طور همزمان با وجود غلظت بالای Na^+ خارج سلولی به محیط خارج سلولی رها می‌شوند. به علت اینکه K_m برای پیوند K^+ به این محل‌ها (۰/۲mM) پایین‌تر از غلظت پتاسیم خارج سلولی (۴mM) است این محل‌ها با یون‌های K^+ پر می‌شوند و یون‌های Na^+ جدا می‌شود. به‌طور مشابه در طول انتقال E2→E1، دو یون پتاسیم پیوند شده به داخل منتقل می‌شوند و سپس در داخل سیتوزول رها می‌شوند.

داروهای معینی (مثل اوآباین[2] و دیگوکسین[3]) به دُمین اگزوپلاسمی Na^+/K^+ATPase غشای پلاسمایی متصل می‌شوند و به‌طور اختصاصی فعالیت ATPase را مهار می‌کنند. در نتیجه به هم خوردن تعادل Na^+/K^+ سلول‌ها، مدرکی قوی برای نقش محوری این پمپ‌های یونی در نگهداری شیب غلظت یونی Na^+ و K^+ در حد طبیعی است.

H^+ATPase متعلق به گروه V حالت اسیدی لیزوزوم‌ها و واکوئل‌ها را حفظ می‌کنند

همه ATPase های گروه V تنها یون H^+ را منتقل می‌کنند. این پمپ‌های پروتونی در غشای لیزوزوم‌ها، اندوزوم‌ها و واکوئل گیاهان حضور دارند و برای اسیدی کردن لومن این اندامکها فعالیت می‌کنند. pH لومن لیزوزوم به‌طور دقیق در سلول‌های زنده با استفاده از ذرات نشان‌دار شده توسط یک رنگ فلورسانس حساس به pH قابل اندازه‌گیری است. وقتی این ذرات به مایعات خارج سلولی اضافه شوند سلول‌ها را فرا گرفته و وارد آنها می‌شوند (فا گوسیتوز، فصل ۱۷ را ملاحظه کنید) و سرانجام به داخل لیزوزوم‌ها منتقل می‌شوند. pH لیزوزومی از طریف فلورسانس نشری قابل محاسبه است. نگهداری شیب پروتون ۱۰۰ مرتبه یا بیشتر بین لومن لیزوزوم (pH≈۴/۵-۵/۰) و سیتوزول (pH≈۷/۰) به ATPase های گروه V و همچنین تولید ATP توسط سلول بستگی دارد. pH پایین

1- Calmodulin 2- Ouabain
3- Digoxin



▲ **شکل ۱۲-۱۱ مدلی از Na^+/K^+ ATPase موجود در غشای پلاسمایی.** فقط یکی از دو زیر واحد کاتالیتیک α نشان داده شده است. هنوز به درستی مشخص نشده است که یک یا هر دوی زیر واحدها در یک مولکول ATPase، یونها را انتقال می‌دهد. پمپ یونها توسط Na^+/K^+ ATPase مستلزم فسفریلاسیون، دفسفریلاسیون و تغییرات ساختمان‌فضایی مشابه با Ca^+ATPase موجود در عضله است (شکل ۱۰-۱۱ را ملاحظه کنید). در این مورد، هیدرولیز حد واسط E2-P، تغییر شکل ساختمان‌فضایی E2→E1 را سبب شده و باعث انتقال دو یون K^+ (با مربع‌های ارغوانی نشان داده شده‌اند). پیوندهای اسیل - فسفات دارای انرژی بالا به صورت P~ و پیوندهای فسفواستری دارای انرژی پایین به صورت P- نشان داده شده‌اند.

لیزوزومی برای عملکرد مناسب بسیاری از پروتئازها، نوکلئازها و دیگر آنزیم‌های هیدرولیتیک در لومن ضروری است. به عبارت دیگر pH سیتوزولی ۵، عملکردهای بسیاری از پروتئین‌ها را که در pH برابر ۷ به صورت بهینه عمل می‌کنند از بین می‌برد و باعث هدایت به سوی مرگ سلولی می‌شود. پمپ‌های پروتونی مصرف‌کننده ATP در غشاهای لیزوزومی و واکوئلی جدا شده، تخلیص شده و در لیپوزوم‌ها قرار گرفته‌اند. همان طور که در شکل ۹-۱۱ (مرکز) نشان داده شده است این پمپ‌های پروتونی گروه V شامل دو دُمین مجزا هستند: یک دُمین آبگریز سیتوزولی (V_1) و یک دُمین ناقل غشایی (V_0) با چندین زیرواحد که هر دُمین را تشکیل می‌دهد. هیدرولیز ATP توسط زیرواحدهای β در V_1 انرژی را برای پمپ کردن یون‌های H^+ از طریق کانال‌های هدایت‌کننده پروتون تأمین می‌کنند که این کانال‌ها توسط زیرواحدهای c و a در V_0 شکل می‌گیرند. برخلاف پمپ‌های پروتونی گروه P، پمپ‌های پروتونی گروه V در طول انتقال پروتون فسفریله و دفسفریله نمی‌شوند. از نظر ساختاری مشابه پمپ‌های پروتونی گروه F که ما در فصل ۱۲ توصیف می‌کنیم به‌طور طبیعی در جهت عکس عمل می‌کنند یا ATP بیشتری نسبت به پمپ‌های پروتونی تولید کنند. مکانیسم عمل آن‌ها با جزئیات زیاد شناخته نشده است.

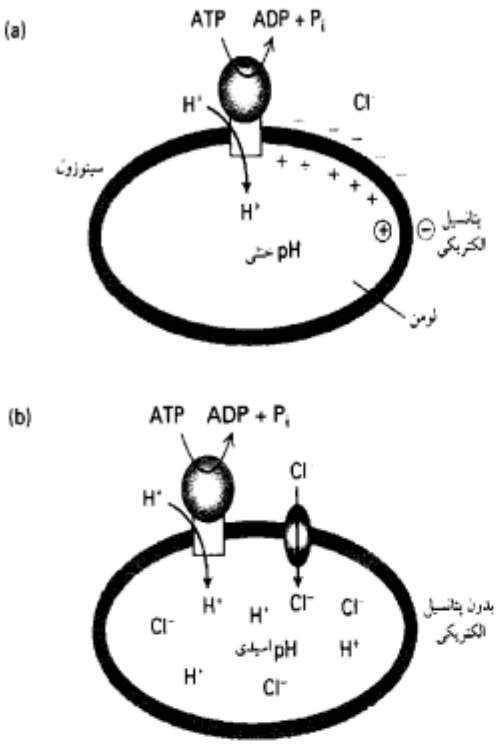
پمپ شدن پروتون‌های نسبتاً کم نیاز به اسیدی شدن وزیکول داخل سلولی دارد. برای فهم علت آن یادآوری می‌کنیم که یک محلول با pH چهار دارای غلظت یون H^+ به مقدار 10^{-4} مول در هر لیتر یا 10^{-7} مول یون H^+ در هر میلی لیتر است. از آن‌جایی که $6/02 \times 10^{23}$ (عدد آووگادرو) اتم H^+ در هر مول وجود دارد بنابراین یک میلی لیتر از محلولی با pH چهار شامل $6/02 \times 10^{16}$ یون H^+ است. بنابراین در pH چهار، یک لیزوزوم کروی ابتدایی با حجم $4/18 \times 10^{-15}$ml (ابعاد $0/2\mu m$) شامل فقط ۲۵۲ پروتون خواهد بود. همان اندامک در pH ۷ به‌طور میانگین تنها ۰/۲ پروتون در لومن دارد و بنابراین پمپ شدن تقریباً ۲۵۰ پروتون برای اسیدی شدن لیزوزوم لازم است.

پمپ‌های پروتونی مصرف‌کننده ATP خودشان نمی‌توانند لومن یک اندامک (یا فضای خارج سلولی) را اسیدی کنند. زیرا این پمپ‌ها الکتروژنیک هستند یعنی یک حرکت خالص از بارهای الکتریکی در طول انتقال رخ می‌دهد. پمپ شدن تعداد کمی پروتون باعث انباشت

یون H^+ با بار مثبت در سطح اگزوپلاسمی (داخل) غشای اندامک می‌شود. هر H^+ای که از این طریق پمپ شود یک یون منفی (مثل OH^- یا Cl^-) در سمت دیگر روی سطح سیتوزولی باقی می‌گذارد و باعث تراکم یون‌های با بار منفی در اینجا می‌شود. این یون‌های دارای بار مخالف در سطوح مختلف غشا، همدیگر را جذب می‌کنند و یک جدایی بار یا پتانسیل الکتریکی در عرض غشا تولید می‌شود. هرچه پروتون‌ها بیشتر پمپ شوند بار مثبت روی سطح اگزوپلاسمی، دیگر یون‌های H^+ را دفع می‌کنند و به زودی مانع پمپ شدن پروتون‌های اضافی بیشتر قبل از اینکه شیب غلظت H^+ به‌طور معناداری تثبیت شود می‌شوند. (شکل ۱۳-۱۱).

در حقیقت، این راهی است که پمپ‌های H^+ گروه P، پتانسیل سیتوزولی منفی را در طول غشا پلاسمایی گیاهان و مخمرها تولید می‌کنند. به‌طور صحیح برای اینکه لومن اندامک یا فضای خارج سلولی (یعنی لومن معده) اسیدی شود حرکت پروتون‌ها باید با (۱) حرکت تعداد برابر آنیون‌ها (مثل Cl^-) در همان جهت یا (۲) حرکت تعداد برابر از کاتیون‌های مختلف در جهت مخالف جفت شود

فرایند اولی در لیزوزوم‌ها و واکوئل‌های گیاهی رخ می‌دهد که غشاهای داخلی H^+ATPase گروه V و کانال‌های آنیونی از این طریق حرکت یون‌های Cl^- را همراه می‌کنند (شکل ۱۳b-۱۱). فرایند دومی در آستر معده که حاوی H^+/K^+ATPase گروه P است رخ می‌دهد که الکتروژنیک نیستند و یک H^+ را به سمت خارج و یک K^+ را به سمت داخل پمپ می‌کنند. عملکرد این پمپ‌ها در فصل‌های بعدی بحث خواهد شد.



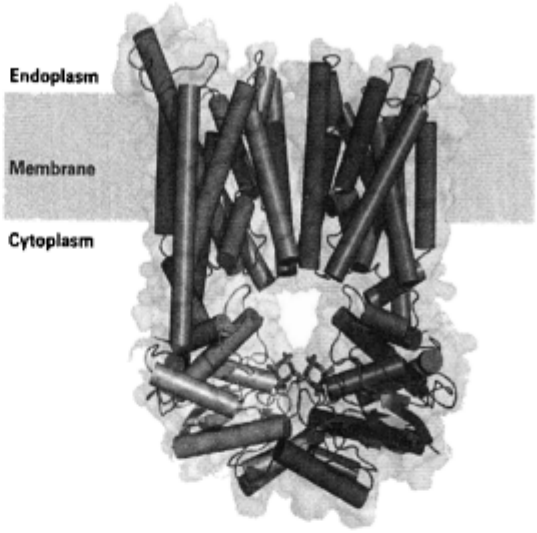
▲ **شکل ۱۳-۱۱ اثر پمپ‌های هیدروژنی گروه V در شیب غلظت H^+ و شیب پتانسیل الکتریکی در عرض غشاهای سلولی.** (a) اگر یک اندامک داخل سلولی تنها دارای پمپ‌های گروه V باشد، پمپ شدن پروتون باعث تولید پتانسیل الکتریکی در طول غشا می‌شود که طرف سیتوزولی منفی و طرف لومن مثبت می‌شود. اما تغییر مهمی در pH داخل سلول به وجود نمی‌آید. (b) اگر غشای اندامک دارای کانال‌های کلسیمی هم باشد آنیون‌ها به‌طور غیرفعال و به دنبال آن پروتون‌ها پمپ می‌شوند. نتیجه آن تجمع یون‌های H^+ و Cl^- در لومن است. اما پتانسیل الکتریکی در طول غشا به وجود نمی‌آید.

پرمئازهای باکتریایی، پروتئین‌های ABC هستند که یک نوع ماده غذایی را از محیط وارد می‌کند

همان طور که قبلاً ذکر شد، همه اعضای مختلف و بسیار متفاوت ابر خانواده ABC پروتئین‌ها را منتقل می‌کنند و شامل دو دُمین ناقل غشایی (T) و دو دُمین سیتوزولی متصل شونده به ATP (A) هستند (شکل ۱۴-۱۱). هرکدام از دُمین‌های T از ۱۰ آلفاماریپیچ گذرنده از غشا ساخته شده‌اند و یک مسیر میانی برای انتقال مواد از طریق غشا تشکیل داده و اختصاصی بودن یک ماده را برای هر پروتئین ABC تعیین می‌کنند. توالی دُمین A تقریباً ۴۰-۳۰ درصد در همه اعضای این ابرخانواده مشابه بوده و نشان دهنده منشاءِ تکاملی مشترک است. همچنین بعضی پروتئین‌های ABC دارای زیرواحد اضافی متصل شونده به ماده در سطح اگزوپلاسمی یا زیرواحد تنظیمی هستند.

غشای پلاسمایی بسیاری از باکتری‌ها دارای تعدادی پرمئاز است که به ابرخانواده ABC تعلق دارد. این پروتئین‌ها انرژی رها شده توسط هیدرولیز ATP را برای انتقال اسیدهای آمینه خاص، قندها، ویتامین‌ها و حتی پپتیدها به داخل سلول مورد استفاده قرار می‌دهند. از آنجا که باکتری‌ها غالباً درخاک یا آب برکه حاوی غلظت کم مواد غذایی رشد می‌کنند این پروتئین‌های انتقالیِ ABC، سلول‌ها را قادر به ورود مواد غذایی برخلاف شیب غلظت اصلی می‌کنند. عموما پرمئازهای باکتریایی القاپذیرند یعنی مقدار انتقال پروتئین در غشاهای سلولی به وسیله غلظت مواد غذایی در محیط و نیاز متابولیکی سلول تنظیم می‌شود.

در E.coli، پرمئاز ویتامین B_{12}، یک پروتئین باکتریایی تیپیک ABC است که ساختار آن با جزئیات مولکولی شناخته شده است (شکل ۱۸-۱۱ را ملاحظه کنید). دو دُمین ناقل غشایی و دو



▲ **شکل ۱۴-۱۱ ساختار پروتئین اشرشیاکلی BtuCD که یک ناقل ABC واسطه جذب ویتامین B_{12} است.** کل ناقل از چهار زیرواحد تشکیل شده است، دو زیرواحد همسان گذرنده از غشا (سبز) و دو زیرواحد متصل شونده به ATP (آبی). سیکلوتتراوانادات که یک آنالوگ گروه فسفات در ATP است در محل متصل شونده به ATP قرار می‌گیرد و به صورت کره و خط رسم شده است. محدوده تقریبی غشای دو لایه‌ای با منطقه سایه خورده خاکستری نشان داده شده است که سطح خارجی آن در بالا و سیتوپلاسم در پایین است.

دُمین سیتوزولی متصل شونده به ATP به وسیله چهار زیرواحد مجزا تشکیل می‌شوند. باکتری‌های گرم منفی مانند E.coli در کنار غشای پلاسمایی دارای یک غشای بیرونی هم هستند که از دو لایه فسفولیپیدی ساخته شده است (شکل ۲-۱ را ملاحظه کنید). این غشای خارجی شامل پروتئین‌های پورینی است (شکل ۱۸-۱۰ را ملاحظه کنید) که آن‌ها را نسبت به اغلب مولکول‌های کوچک مثل اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها به میزان زیادی نفوذپذیر می‌کنند. بنابراین این مولکول‌ها می‌توانند به داخل فضای پری پلاسمیک بین غشا و غشای خارجی وارد شوند (شکل ۲-۱ را ملاحظه کنید). پروتئین محلول متصل شونده به ویتامین B_{12} در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است و به‌طور محکم به ویتامین B_{12} متصل می‌شود و آن را به سمت زیرواحد T پرمئاز راهنمایی می‌کند. ویتامین، غشای پلاسمایی را با استفاده از نیروی محرکه هیدرولیز ATP طی می‌کند. اینکه چگونه به‌طور دقیق انتقال رخ می‌دهد شناخته نشده است اما تصور می‌شود که پیوند شدن B_{12}، پیامی برای محل‌های هیدرولیز نوکلئوتید است که میل ترکیبی برای ATP افزایش می‌یابد و ATP پیش نیازی برای تولید چرخه انتقال است. سپس دو دُمین متصل شونده به ATP به میزان زیادی تعاون پیوند شدن ATP و واکنش هیدرولیز را انجام می‌دهند که با تغییر ساختمان‌فضایی اساسی در قطعات گذرنده از غشا همراه است. این تغییر به طریقی اجازه می‌دهد که ماده پیوندی از بین دو دُمین گذرنده از غشا به داخل سیتوپلاسم سلول عبور کند. سپس ناقل از طریق جدا شدن ADP و فسفات معدنی به حالت استراحت بر می‌گردد.

سلول‌های جهش یافته E.coli که زیرواحدهای پرمئاز B_{12} یا پروتئین محلول باند شونده پری پلاسمیک در آنها ناقص شده است قادر به انتقال B_{12} به داخل سلول نیستند اما قادر به انتقال مولکول‌های دیگر مثل اسیدهای آمینه که جذب آنها توسط دیگر پروتئین‌های انتقالی تسهیل می‌شوند هستند. تجزیه و تحلیل ژنتیکی آنها مدارکی قوی که نشان دهنده عملکرد پرمئازها برای انتقال حل شونده‌های اختصاصی به داخل سلول‌های باکتریایی است را فراهم کرده است.

در حدود ۵۰ ناقل ABC در پستانداران نقش‌های متنوع و مهمی را در فیزیولوژی سلول و اندام‌ها بازی می‌کنند

اولین پروتئین ABC یوکاریوتی کشف شده از مطالعه بر روی سلول‌های توموری و سلول‌های کشت داده شده که نسبت به چند داروی دارای ساختار شیمیایی غیروابسته مقاومت نشان می‌دادند شناسایی شد. این قبیل سلول‌ها، عاقبت مراحل عالی بیان یک پروتئین انتقالی مقاوم در برابر چندین دارو (MDR) را نشان دادند که به شکل MDR1 شناخته می‌شوند. این پروتئین انرژی مشتق شده از هیدرولیز ATP را برای ورود انواع زیادی از داروها از سیتوزول به محیط خارج سلولی مورد استفاده قرار می‌دهد. ژن MDR1 غالباً در سلول‌های مقاوم به چند دارو تکثیر می‌یابد. در نتیجه پروتئین MDR1 به میزان زیادی تولید می‌شود.

اغلب داروهایی که به وسیله MDR1 جابه جا می‌شوند، مولکول‌های آبگریز کوچکی هستند که از محیط و از طریق غشای پلاسمایی بدون کمک پروتئین‌های انتقالی به داخل سیتوزول سلول منتشر می‌شوند و در اینجا عملکردهای مختلف سلولی را متوقف می‌کنند. دو نمونه از این داروها کلشی سین[1] و وین بلاستین[2] است که تجمع میکروتوبول‌ها را متوقف می‌کنند (فصل ۱۸). خروج این قبیل داروها با مصرف ATP توسط MDR1 صورت می‌گیرد و غلظت آن‌ها در سیتوزول کاهش می‌یابد. در نتیجه غلظت خارج

1- Colchicine 2-Vinblastine

سلولی بالای دارو برای کشتن سلولی که MDR1 را بیان می‌کند نسبت به سلولی که آن را بیان نمی‌کند لازم است. MDR1 پمپی برای مولکول‌های کوچک است که ATP را مصرف می‌کند و توسط لیپوزوم‌های دارای پروتئین خالص قابل شرح‌اند. فعالیت ATPase این لیپوزوم‌ها توسط داروهای مختلف با روش وابسته به دوز که با قابلیتشان برای انتقال توسط MDR1 منطبق است افزایش می‌یابد.

در حدود ۵۰ پروتئین انتقالی مختلف ABC در پستانداران تاکنون شناسایی شده است. (جدول ۳-۱۱). چند تای آن‌ها به وفور در کبد و روده‌ها و کلیه یعنی محل‌هایی که تولیدات سمی و دفعی بدن جذب می‌شوند بیان می‌گردند. سوبستراهای پروتئین‌های ABC، قندها، اسیدهای آمینه، کلسترول، اسیدهای صفراوی، فسفولیپیدها، پپتیدها، پروتئین‌ها، سم‌ها و مواد خارجی است. غالباً عملکرد طبیعی MDR1 با انتقال انواع سم‌های خنثی و متابولیک به داخل صفرا یا لومن روده یا به درون ادرار که در کلیه شکل گرفته است مشابه است. به نظر می‌رسد در طول مراحل تکامل، MDR1 قابلیت انتقال داروهایی را که ساختارشان با این سم‌های بیرونی مشابه است کسب کرده‌اند. تومورهای مشتق شده از انواع سلول‌های بیان‌کننده MDR مانند هپاتوما[1] (سرطان کبد) غالباً به‌طور واقعی در برابر همه عوامل شیمی درمانی مقاومند و درمان آنها مشکل است و احتمال می‌رود به همین علت تومورها افزایش بیان MDR1 یا MDR2 مربوطه را نشان دهند.

چندین بیماری ژنتیکی انسانی در ارتباط با نقص پروتئین‌های ABC هستند. بهترین مطالعه بر روی فیبروزسیستیک (CF) صورت گرفته که به دلیل جهش در ژن کدکننده تنظیمی ناقل غشایی فیبروزسیستیک[2] (CFTR) رخ می‌دهد. این پروتئین انتقال دهنده Cl^- در غشای پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیال در شش، غدد عرق، پانکراس و بافت‌های دیگر است. برای مثال پروتئین CFTR برای بازجذب Cl^- به داخل سلول‌های غدد عرق اهمیت دارد. در صورت چشیدن عرق اشخاص مبتلا به فیبروز سیستیک اغلب مزه شوری میدهد. مقدار AMP حلقوی (cAMP) و مولکول‌های پیام رسان داخل سلولی افزایش می‌یابد که به علت فسفریلاسیون CFTR و تحریک انتقال Cl^- توسط این قبیل سلول‌ها در اشخاص طبیعی است ولی در افراد CF که دارای پروتئین CFTR ناقص هستند دیده نمی‌شود (نقش cAMP در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی در فصل ۱۵ توضیح داده می‌شود.). توالی و ساختار پیش‌بینی شده پروتئین CFTR با توجه به تجزیه و تحلیل ژن‌های تکثیرشده، بسیار شبیه به پروتئین MDR1 است به استثنای اینکه یک دُمین اضافی در سطح سیتوزولی که دُمین تنظیمی (R) است در CFTR اضافه است. اگرچه فعالیت انتقال Cl^- توسط پروتئین CFTR با پیوند شدن ATP افزایش می‌یابد ولی اینکه آیا واقعاً پمپ Cl^- مصرف‌کننده ATP است یا خیر، نامشخص است.

پروتئین‌های ABC معینی فسفولیپیدها و دیگر مواد قابل محلول در لیپیدها را از یک لایه غشا به لایه مخالف منتقل می‌کند

سوبستراهای MDR1 در پستانداران در ابتدا صفحه‌ای بوده و مولکول‌های لیپیدی محلول دارای یک یا تعداد بیشتری بار مثبت هستند که آنها با یکدیگر برای انتقال توسط MDR1 رقابت می‌کنند. پیشنهاد می‌شود که آنها به محل یا محل‌های مشابه روی پروتئین می‌چسبند و چهار دُمین MDR1 در پستانداران بر خلاف پروتئین‌های ABC باکتریایی در داخل یک پروتئین منفرد (MW ۱۷۰۰۰۰) متصل شده‌اند. اخیراً ساختار سه بعدی از پروتئین مشابه انتقال دهنده لیپید در E.coli تعیین شده است و نشان می‌دهد که مولکول V شکل بوده به طوری که نوک آنها در غشا و بازوهای آن که شامل محلهای متصل شده به ATP است به داخل سیتوزول برآمدگی دارد (شکل ۱۵-۱۱). هر چند مکانیسم انتقال توسط MDR1 و پروتئین‌های ABC مشابه به طور قطعی شرح داده شده است ولی یک مورد احتمالی مدل فیلیپاز[3] است که در شکل ۱۵-۱۱ رسم شده است. بر طبق این مدل، MDR1 یک مولکول سوبسترای دو گانه دوست را از لایه سیتوزولی به لایه اگزوپلاسمی منتقل می‌کند که یک واکنش غیر مطلوب از نظر انرژی است و نیروی محرکه آن توسط جفت شدن با فعالیت ATPase پروتئین تأمین می‌شود.

مدل فیلیپازی انتقال توسط MDR1 با ABCB4 (عموماً MDR2 نامیده می‌شود) تأیید می‌شود که ABCB4 پروتئین مشابهی است که در مناطقی از غشای پلاسمایی سلول‌های کبد که در برخورد با مجرای صفرا است حضور دارد. ABCB4، فسفاتیدیل کولین را از لایه سیتوزولی غشای پلاسمایی به لایه اگزوپلاسمایی منتقل می‌کند که در نهایت در ترکیب با کلسترول و اسیدهای صفراوی به داخل صفرا رها می‌شود. خود کلسترول و اسیدهای صفراوی توسط دیگر اعضای خانواده ABC منتقل شده‌اند. چند عضو دیگر ابر خانواده ABC در ورود

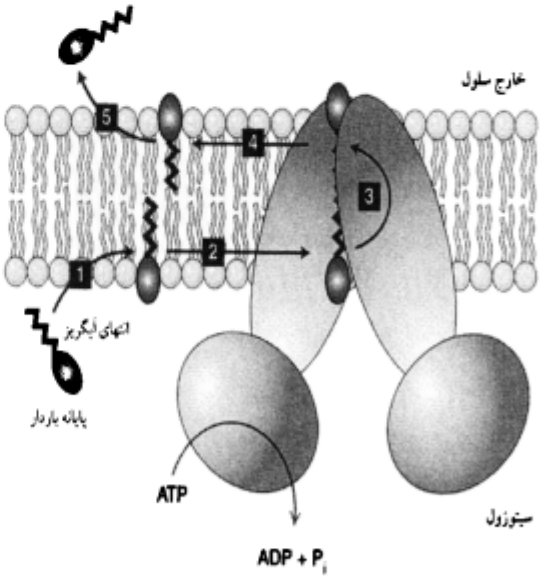
1- Hepatomas

2- Cystic fibrosis transmembrane regulator

3- Flippase model

جدول ۳-۱۱ - پروتئین‌های ABC منتخب در انسان

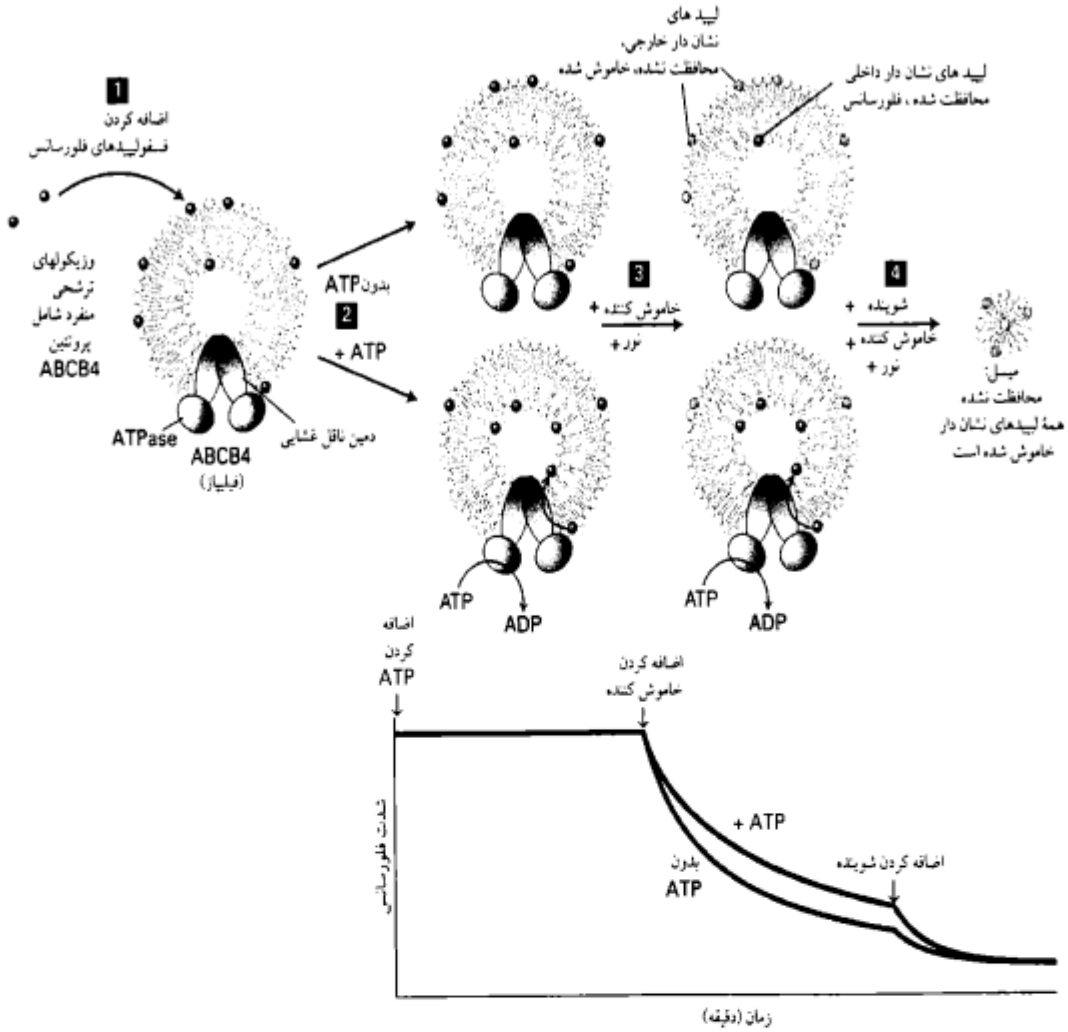
پروتئین	بافت بیان شده	عملکرد	نوع بیماری به علت نقص در پروتئین
ABCB1 (MDR1)	آدرنال، کلیه، مغز	صدور داروهای چربی‌دوست	—
ABCB4(MDR2)	کبد	صدور فسفاتید کولین به صفرا	—
ABCB11	کبد	صدور نمک‌های صفراوی به صفرا	—
CFTR	بافت برون‌ریز	انتقال یون‌های Cl^-	فیبروز سیستیک
ABCD1	در همه جا در غشاهای پروکسیمال	تحت تأثیر آنزیم‌های پراکسیزومی، اسیدهای چرب دارای زنجیرهٔ بلند را اکسید می‌کند	آدرنولوکودیستروفی (ADL)
ABCG5/8	کبد، روده	صدور کلسترول و استرول‌های دیگر	بتا - سیتواسترولمی
ABCA1	همه جا	صدور کلسترول و فسفولیپید برای جذب به داخل لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)	بیماری تائزیر



◀ شکل ۱۵-۱۱ مدل فیلیپازی انتقال توسط MDR1 و پروتئین‌های ABC مشابه. مرحله ❶: قسمت آب گریز یک مولکول سوبسترا (سیاه) به طور خود به خودی از سیتوزول به لایه سیتوزولی دو لایه لیپیدی حرکت می‌کند در حالی که پایانه باردار آن (قرمز) در سیتوزول باقی ماند. مرحله ❷: سوبسترا به طور جانبی منتشر می‌شود تا با محل روی MDR1 در داخل دو لایه برخورد کند و به آن بچسبد. مرحله ❸: سپس پروتئین مولکول سوبسترای باردار را به لایهٔ اگزوپلاسمی منتقل می‌کند که یک واکنش نامطلوب از نظر انرژی است و شامل تغییرات ساختمان‌فضایی (در دُمین گذرنده از غشا) است که نیروی محرکه آن توسط هیدرولیز ATP توسط دُمین‌های سیتوزولی تأمین می‌شود. مرحله ❹ و ❺: ماده در سطح اگزوپلاسمی مجدداً به طور جانبی در غشاء منتشر می‌شود و سرانجام به داخل محیط آبی روی قسمت بیرونی سلول حرکت می‌کند.

سلولی لیپیدهای مختلف نقش دارند (جدول۳-۱۱ را ملاحظه کنید).

در ابتدا گمان می‌رفت که ABCB4 دارای فعالیت فیلیپازی فسفولیپیدی است. زیرا موش‌های دارای جهش همو زیگوت از دست



▲ **شکل تجربی ۱۶-۱۱ (شکل رنگی) سنجش خاموشی فلورسانس در محیط کشت می‌تواند فعالیت فیلیپازی فسفو لیپیدی ABCB4 را آشکار کند.** یک جمعیت مشابه از وزیکول‌های ترشحی دارای پروتئین ABCB4 است که از یک جهش یافته مخمر Sec آلوده شده با ژن ABCB4 تخلیص شده است. مرحله ❶: فسفولیپیدهای سنتزی شامل گروه سر فلورسانس بودند (آبی) و در ابتدا در لایه بیرونی سیتوزولی وزیکول‌های تخلیص شده شرکت می‌کردند مرحله ❷: اگر ABCB4 به عنوان یک فیلیپاز عمل کند پس با اضافه کردن ATP به بیرون وزیکول، کسر کوچکی از فسفولیپیدهای نشان دار در سمت بیرونی به لایه درونی منتقل می‌شوند. مرحله ❸: حرکت با اضافه کردن یک جزء خاموش‌کننده قابل عبور از غشا به نام دی تیونیت[1] به محیط احاطه کننده وزیکول‌ها مشاهده شد. دی تیونیت با گروه سر فلورسانسی واکنش می‌دهد و قدرت فلورسانس آن را تحریک می‌کند (خاکستری). در حضور خاموش کننده تنها فسفولیپیدهای نشان دار در محیط محافظت شدهٔ روی لایه داخلی فلورسانس خواهند بود. سرانجام با اضافه کردن عامل خاموش کننده، فلورسانس کلی در طول زمان کاهش می‌یابد تا به قله‌ای می‌رسد که در آن نقطه، همه فلورسانس خارجی خاموش می‌شود و تنها فلورسانس فسفولیپیدی داخلی قابل رویت است. مشاهده فلورسانس در حضور ATP بیشتر از (خاموش شده کمتر) هنگامی است که ATP وجود نداشته باشد و نشان می‌دهد که ABCB4 تعدادی از فسفولیپیدهای نشان دار را به داخل منتقل می‌کند. مرحله ❹: اضافه کردن شوینده به وزیکول‌ها میسل تولید می‌کند و همه فسفولیپیدهای فلورسانس را در دسترس عوامل خاموش کننده قرار می‌دهد و فلورسانس تا مقادیر پایه پائین می‌آید.

دهنده عملکرد ژن ABCB4، در ترشح فسفاتیدیل کولین به داخل صفرا نقص داشتند. محققان برای این که مستقیماً تعیین کنند که ABCB4 در حقیقت یک فیلیپاز است آزمایشی روی جمعیت مشابهی از وزیکول‌های خالص شده با ABCB4 در غشا انجام دادند

1- Dithionite

که سطح سیتوزولی وزیکول‌ها در جهت بیرون بود. این وزیکول‌ها توسط وارد کردن cDNA کُدکننده ABCB4 پستانداران به داخل یک مخمر جهش یافته حساس به دما به نام Sec به دست آمده بود. در دماهای پائین و مجاز که پروتئین Sec دارای عملکرد است، پروتئین ABCB4 توسط سلول‌های آلوده بیان می‌شود و به طور طبیعی از طریق مسیر ترشحی به سطح سلول حرکت می‌کند (فصل ۱۴). بنابراین پروتئین Sec در دماهای بالاتر از حد مجاز دارای عملکرد نیست و وزیکول‌های ترشحی نمی‌توانند به غشای پلاسمایی ملحق شوند همان عملی که در سلول‌های وحشی انجام می‌شد. بنابراین وزیکول‌های دارای ABCB4 و دیگر پروتئین‌های مخمر در سلول تجمع می‌یابند. محققان بعد از تخلیص این وزیکول‌های ترشحی، آنها را در محیط کشت با یک مشتق فسفاتیدیل کولین فلورسانس نشان دار می‌کنند. سنجش میزان خاموشی فلورسانس که در شکل ۱۶-۱۱ رسم شده است نشان می‌دهد که وزیکول‌های حاوی ABCB4 فعالیت فیلیپازی وابسته به ATP را نشان می‌دهند که بدون ABCB4 آن را انجام نمی‌دادند.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۱

پمپهای وابسته به ATP و محیط یونی داخل سلولی

- چهار خانواده از پروتئین‌های گذار غشایی انرژی آزاد ناشی از هیدرولیز ATP را با انتقال وابسته به انرژی سوبستراها در خلاف شیب غلظتی آنها جفت می‌کند: پمپهای کلاس P، V و F و پروتئین‌های ABC (شکل ۹-۱۱ را ملاحظه کنید).
- عملکرد هماهنگ Na^+/K^+ ATPase نوع P در غشای پلاسمایی و هومولوگ آن یعنی Ca^+ ATPase غشای پلاسمایی یا شبکهٔ سارکوپلاسمی، باعث حالتهای زیر در غلظت‌های یون‌ها می‌شوند: K^+ بالا، Ca^{+2} پایین و Na^+ پایین در سیتوزول؛ K^+ پایین، Ca^{+2} بالا و Na^+ بالا در مایع خارج سلولی.
- در پمپهای کلاس P، فسفریلاسیون زیر واحد α (کاتالیتیک) و تغییر در حالتهای ساختمان‌فضایی، برای جفت‌شدن هیدرولیز ATP با انتقال یونهای H^+، Na^+، K^+ یا Ca^{+2} ضروری است (اشکال ۱۰-۱۱، ۱۱-۱۱ و ۱۲-۱۱ را ملاحظه کنید).
- ATPaseهای نوع V و F که منحصراً پروتون را عبور می‌دهند دارای کمپلکس‌های چندزیرواحدی با کانال هدایت پروتون در دُمین گذار غشایی و محل‌های اتصال ATP در دُمین سیتوزولی هستند.
- پمپهای H^+ مربوط به کلاس V در غشاهای لیزوزومی و اندورزومی حیوانات و غشاهای واکوئل گیاهان برای حفظ pH پایین در داخل ارگانل نسبت به سیتوزول اطراف آن ضروری هستند (شکل ۱۳b-۱۱ را ملاحظه کنید).
- تمام اعضای سوپر فامیلی ABC پروتئین‌های انتقالی چهار دُمین مرکزی دارند: دو دمین گذار غشایی که یک مسیر را برای حرکت مادهٔ محلول و تعیین ویژگی سوبسترایی تشکیل داده و دو دُمین سیتوزولی متصل به ATP (اشکال ۱۴-۱۱ و ۱۵-۱۱ را ملاحظه کنید).
- سوپر فامیلی ABC شامل پرمئازهای اسیدآمینه‌ای و قندی باکتریها و حدود ۵۰ پروتئین پستانداران (مثل MPR1 و ABCA1) است که انواع مختلفی از سوبستراها مثل سموم، داروها، فسفولیپیدها، پپتیدها و پروتئین‌ها را به داخل یا خارج از سلول منتقل می‌کنند.
- بر اساس مدل فیلیپاز فعالیت MDR، مولکول سوبسترا به لایهٔ سیتوزولی غشای پلاسمایی منتشر می‌شود، سپس توسط نیروی ATP به لایه اگروپلاسمی منتقل شده و در نهایت از غشای پلاسمایی به فضای خارج سلولی منتشر می‌شود (شکل ۱۵-۱۱ را ملاحظه کنید).
- مطالعات بیوشیمیایی مستقیماً نشان داده است که ABCB4 (MDR2) فعالیت فیلیپازی برای فسفولیپیدها دارد (شکل ۱۲-۱۱ را ملاحظه کنید).

۱۱-۴ کانال‌های یونی بدون دریچه و پتانسیل استراحت غشا

در غشای پلاسمایی علاوه بر پمپ‌های یونی مصرف کننده ATP که یون‌ها را بر خلاف شیب شان انتقال می‌دهند، پروتئین‌های کانالی وجود دارند که به یون‌های سلولی اصلی (Na^+، K^+، Ca^{2+} و Cl^-) اجازه می‌دهند که از بین این کانالها در جهت شیب غلظت شان حرکت کنند. شیب‌های غلظت یونی توسط پمپ‌ها و حرکات انتخابی یون‌ها از طریق کانال‌ها، مکانیسم اصلی در اختلاف ولتاژ یا پتانسیل الکتریکی را تشکیل می‌دهند که در عرض غشا پلاسمایی تولید می‌شود. به عبارت دیگر، پمپ‌های یونی مصرف کننده ATP اختلاف در غلظت یونی در عرض غشای پلاسمایی را به وجود می‌آورند و کانال یونی از این شیب غلظت در جهت تولید پتانسیل الکتریکی در عرض غشای پلاسمایی استفاده می کند.

(شکل۲-۱۱ را ملاحظه کنید).

در همه سلول‌ها مقدار پتانسیل الکتریکی عموماً ۷۰ میلی ولت (mV) است و درون غشا پلاسمایی نسبت به بیرون منفی است. این مقدار به نظر نمی رسد که به اندازه‌ای بزرگ باشد مگر این که ضخامت غشا پلاسمایی را حدود ۳/۵nm در نظر بگیریم. بنابراین شیب ولتاژ در طول غشا ۰/۰۰۷V در هر $۳/۵\times۱۰^{-۷}$ سانتیمتر یا ۲۰۰۰۰ ولت در هر سانتیمتر است! (برای ارزیابی کردن این معنی در نظر بگیرید که خطوط انتقال ولتاژ بالا برای الکتریسیته شیب‌هایی در حدود ۲۰۰۰۰۰ ولت در هر کیلومتر را استفاده می‌کند).

شیب‌های یونی و پتانسیل الکتریکی در عرض غشای پلاسمایی نقش کلیدی در فرایندهای زیستی بازی می‌کند. همان طور که قبلاً ذکر شد، افزایش غلظت Ca^{2+} سیتوزولی یک پیام تنظیمی مهم و شروع کننده انقباض در سلول‌های ماهیچه است و شروع کننده ترشح پروتئین توسط بسیاری از سلول‌ها مثل آنزیم‌های هضم کننده در سلول‌های برون ریز لوزالمعده است. در بسیاری از سلول‌های جانوری ترکیب نیروی شیب غلظت Na^+ و پتانسیل الکتریکی غشا باعث پیشبرد جذب اسیدهای آمینه و دیگر مولکول‌ها بر خلاف شیب غلظت‌شان توسط یون‌های متصل شده به پروتئین‌های انتقالی همسو و ناهمسو می‌شود (قسمت۵-۱۱ را ملاحظه کنید). به علاوه هدایت پتانسیل عمل توسط سلول‌های عصبی به باز و بسته شدن کانال‌های یونی در پاسخ به پتانسیل غشا بستگی دارد (فصل۲۳).

در اینجا ما منشاءِ پتانسیل الکتریکی غشا در سلول‌های در حال استراحت را بحث می‌کنیم که اغلب پتانسیل استراحت غشا نامیده می‌شود. همچنین این که چگونه کانال‌های یونی، حرکت انتخابی یون‌ها را از طریق غشا وساطت می‌کند و تکنیک‌های آزمایشی مفید برای تعیین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های کانالی را بحث خواهیم کرد.

حرکات انتخابی یون‌ها، باعث ایجاد اختلاف پتانسیل الکتریکی غشایی می‌شود

برای کمک به توضیح این که چگونه پتانسیل الکتریکی در طول غشای پلاسمایی به دست می‌آید، ابتدا یک گروه از سیستم‌های آزمایشی ساده را توضیح می‌دهیم که یک غشای محلول ۱۵۰mM NaCl / ۱۵mM KCl (مشابه با محیط خارج سلولی احاطه کننده سلول‌های پر سلولی‌ها) را در طرف راست از محلول ۱۵mM NaCl \ ۱۵۰mM KCL(مشابه با سیتوزول) در طرف چپ جدا می‌کند. یک پتانسیل سنج (ولت سنج) به دو محلول متصل می‌شود تا هر گونه اختلاف پتانسیل الکتریکی در طول غشا را اندازه‌گیری کند. اگر غشا نسبت به همه یون‌ها نفوذناپذیر باشد هیچ یونی از طریق آن جریان نمی یابد و اختلاف ولتاژ یا شیب پتانسیل الکتریکی در عرض غشا وجود نخواهد داشت که در شکل ۱۱-۱۷a نشان داده شده است.

حالا فرض کنیم که غشا دارای پروتئین‌های کانالی Na^+ است که یون‌های Na^+ را عبور می‌دهد ولی یون‌های K^+ و Cl^- را عبور نمی‌دهد (شکل ۱۱-۱۷b). یون‌های Na^+ تمایل دارند که در جهت شیب غلظت شان از طرف راست به چپ حرکت کنند و ایجاد یون‌های Cl^- منفی اضافی برابر با یون‌های سدیم در طرف راست باقی می‌مانند و یون‌های Na^+ مثبت اضافی برابر با یون‌های سدیم در طرف راست باقی می‌مانند و یون‌های Na^+ مثبت اضافی برابر با یون‌های Cl^- در طرف چپ ایجاد می‌شود. Na^+ اضافی در طرف چپ و Cl^- در طرف راست نزدیک سطح مربوطه غشا باقی می‌مانند زیرا بارهای مثبت اضافی در یک طرف غشا بارهای منفی اضافی در طرف دیگر را جذب می‌کنند. نتیجه، جدایی بارها در طول غشا و ایجاد پتانسیل الکتریکی و یا ولتاژ است که طرف چپ غشا سیتوزولی دارای بار مثبت اضافی نسبت به طرف راست است.

هر چه یون‌های Na^+ بیشتر از طریق کانالها در طول غشاء حرکت کنند مقدار این اختلاف بار (یعنی ولتاژ) افزایش می‌یابد. بنابراین ادامهٔ حرکت یون‌های Na^+ از راست به چپ توسط دفع متقابل بین بارهای مثبت اضافی (Na^+) که در طرف چپ غشا تجمع پیدا کرده‌اند و جذب یون‌های Na^+ توسط بارهای منفی اضافی انباشته شده در طرف راست مهار می‌شود. سیستم به ودی به یک نقطه تعادل می‌رسد که دو عامل متضاد که تعیین کننده حرکت یون‌های سدیم‌اند (پتانسیل الکتریکی غشا و شیب غلظت یون) همدیگر را متعادل می‌کنند. در حالت تعادل حرکت خالص یون‌های Na^+ از طریق غشا رخ نمی دهد. بنابراین این غشای نیمه تراوا شبیه همه غشاهای زیستی به عنوان یک خازن (یک وسیله‌ای شامل یک صفحه نازک از مواد نارسانا (داخل آبگریز) که دو طرف آن به وسیله ماده رسانا احاطه شده است) عمل می‌کنند. (گروه‌های سر قطبی آبدوست و یون‌های محلول آبی پیرامون) این وسیله می‌تواند بارهای منفی را در یک طرف و بارهای مثبت را در روی طرف دیگر ذخیره کند.

اگر غشا تنها به یون‌های Na^+ نفوذپذیر باشد پس در حالت تعادل، پتانسیل الکتریکی اندازه‌گیری شده در طول غشا برابر با پتانسیل تعادل سدیم بر حسب ولت (E_{Na}) است. مقدار E_{Na}

توسط معادله نرنست[1] تعیین می‌شود که از مبانی شیمی و فیزیک مشتق می‌شود.

$$E_{Na}=\frac{RT}{ZF}\ln\frac{[Na_r]}{[Na_i]} \quad \text{(معادله ۲-۱۱)}$$

در اینجا R=۱/۹۸۷ cal/ degree.mol (ثابت گازها) یا (۸/۲۸ Joules/degree.mol) و T=۲۹۳ K (دمای مطلق در درجه کلوین) در ۲۰°C و Z (بار و همچنین ظرفیت هم نامیده می‌شود) در اینجا برابر با ۱+ است. F (ثابت فارادی) برابر با $\frac{\text{coulombs}}{(\text{mol.V})}$ ۹۶۰۰۰ یا (۲۳۰۶۲ cal/mol.V) و $[Na_i]$ و $[Na_r]$ به ترتیب غلظت سدیم در طرف چپ و راست در حال تعادلند. پتانسیل به طور قراردادی به صورت سطح سیتوزولی غشا نسبت به سطح اگزوپلاسمی بیان می‌شود. تعادل غلظت یون در محلول خارج (در اینجا طرف راست غشا) در صورت کسر و غلظت سیتوزولی در مخرج کسر قرار می‌گیرد. در ۲۰°C معادله ۲-۱۱ به صورت زیر خلاصه می‌شود.

$$E_{Na}=۰/۰۵۹\log_{10}\frac{[Na_r]}{[Na_i]} \quad \text{(۱۱-۳)}$$

اگر $[Na_r]/[Na_i]$ = ۱۰ باشد نسبت ۱۰ برابر غلظت همان طور که در شکل ۱۱-۱۷b دیده می‌شود خواهیم داشت. پس V E_{Na}=۰/۰۵۹ یا (۵۹ mV) است. سمت چپ یا همان سطح سیتوزولی نسبت به سمت راست یا سطح اگزوپلاسمی مثبت است.

اگر غشا تنها به یون‌های K^+ نفوذپذیر باشد و به یون‌های Cl^- و Na^+ نفوذناپذیر باشد یک معادله مشابه، پتانسیل حالت تعادل پتاسیم (E_K) را نشان می‌دهد.

$$E_{Na}=۰/۰۵۹\log_{10}\frac{[K_r]}{[K_i]} \quad \text{(۱۱-۴)}$$

مقدار پتانسیل الکتریکی غشا همین مقدار است (۵۹ mV برای اختلاف ده برابری در غلظت‌های یونی)، به استثنای این که طرف چپ یا سیتوزولی نسبت به طرف راست منفی است (شکل ۱۱-۱۷b) بر خلاف قطبیتی که در طول یک غشا نفوذپذیر انتخابی نسبت به یون Na^+ به دست آمده است.

پتانسیل غشا در سلول های جانوری به میزان زیادی به حرکت یون‌های پتاسیم از طریق کانال‌های در حال استراحت بستگی دارد

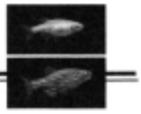
غشاهای پلاسمایی سلول‌های جانوری دارای تعداد زیادی کانال‌های پتاسیمی باز است اما تعداد کانال‌های باز Na^+ ، Cl^- یا Ca^{2+} کم است. در نتیجه حرکت یونی اصلی در عرض غشای پلاسمایی، حرکت K^+ از داخل به سمت خارج است که توسط شیب غلظت K^+ تقویت می‌شود و یک بار منفی اضافی در داخل باقی می‌ماند و بار مثبت اضافی در خارج ایجاد می‌شود که به سیستم آزمایشی نشان داده شده در شکل ۱۱-۱۷c شبیه است. این جریان به سمت خارج یون‌های K^+ از طریق این کانال‌ها (**کانال‌های پتاسیمی در حال استراحت**[2] نامیده می‌شوند) تعیین کننده اصلی پتانسیل غشایی منفی در داخل است. این کانال‌ها، مشابه بقیه کانال‌ها بین حالت باز و بسته در تغییر هستند اما از آنجایی که باز و بسته شدن آنها تحت تأثیر پتانسیل یا مولکول‌های پیام رسان کوچک نیست این کانالها بدون دریچه نامیده می‌شوند. کانال‌های دریچه دار مختلف که در فصل ۲۳ بحث می‌شوند تنها در پاسخ به گیرنده‌های خاص یا تغییرات پتانسیل غشایی باز می‌شوند.

از نظر کمّی، پتانسیل استراحت غشاء به طور معمول ۷۰mV- است که به پتانسیل حالت تعادل پتاسیم نزدیک بوده و از معادله نرنست و شیب‌های K^+ در سلول‌های محیط احاطه کننده که در جدول ۲-۱۱ ترسیم شده است محاسبه می‌شود. معمولاً پتانسیل از مقداری که توسط معادله نرنست محاسبه می‌شود کمتر است که علت آن حضور تعداد کمی کانال‌های باز سدیمی است. این کانال‌های باز سدیمی باعث می‌شوند یون‌های Na^+ به طور خالص به سمت داخل جریان یابند و سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی را مثبت‌تر کنند و منفی بودن، کمتر از حدی می‌شود که توسط معادله نرنست برای K^+ پیش بینی شده بود.

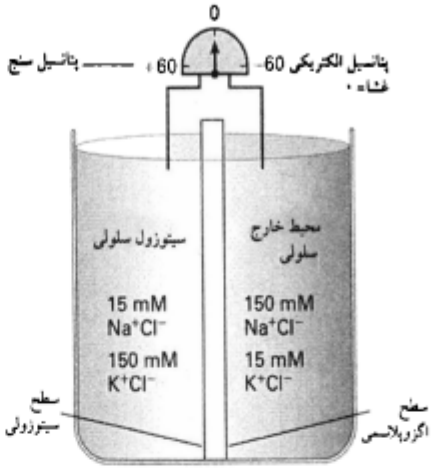
شیب غلظت K^+ که جریان یونی از بین کانال‌های پتاسیمی در حال استراحت را پیش می‌برد توسط Na^+/K^+ ATPase که قبلاً شرح داده شد ایجاد می‌شود (شکل ۲-۱۱ و ۱۲-۱۱ را ملاحظه کنید). در غیاب این پمپ‌ها یا موقعی که مهار می‌شوند شیب غلظت K^+ حفظ نمی‌شود و سرانجام مقدار پتانسیل غشا تا صفر اُفت می‌کند.

اگر چه کانال‌های پتاسیمی در حال استراحت نقش غالب در تولید پتانسیل الکتریکی در طول غشای پلاسمایی سلول های جانوری بازی می‌کنند اما این نکته در مورد سلول‌های باکتری، گیاهی و قارچ‌ها صدق نمی‌کند. پتانسیل غشایی منفی در سلول‌های گیاهان و قارچ‌ها توسط انتقال پروتون‌های باردار مثبت به بیرون از سلول که توسط پمپ‌های پروتونی گروه P انجام می‌گیرد تولید می‌شود (شکل

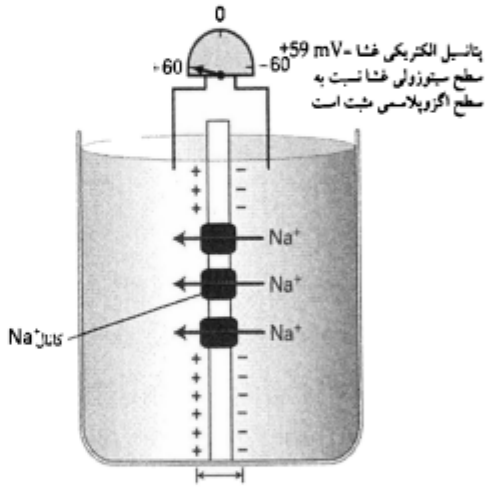
1- Nernst equation 2- Resting K^+ channels



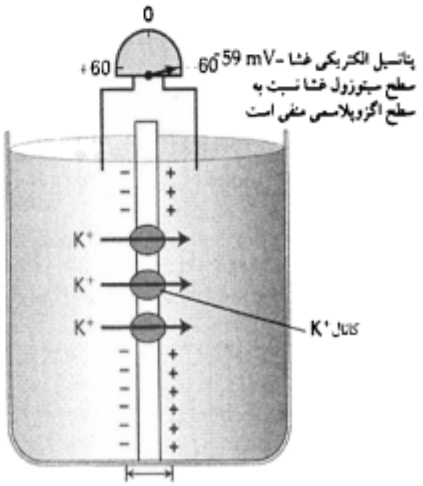
(a) نفوذ پذیر نبودن غشا به Na^+، K^+ و Cl^-



(b) غشا تنها به Na^+ نفوذ پذیر است



(c) غشا تنها نسبت به K^+ نفوذ پذیر است



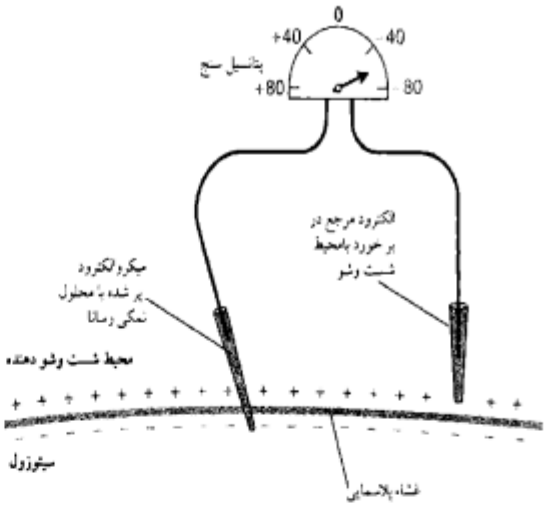
◀ شکل تجربی ۱۱-۱۷ تولید یک پتانسیل الکتریکی غشایی به حرکت انتخابی یون‌ها از طریق یک غشای نیمه تراوا بستگی دارد. در این سیستم آزمایشگاهی یک غشا، محلول ۱۵۰ mM KCl / ۱۵NaCl (چپ) را از یک محلول ۱۵ mM KCl / ۱۵۰mM NaCl (راست) جدا کرده است. این غلظتهای یونی به ترتیب با سیتوزول و خون مشابهند. اگر غشای جدا کننده دو محلول نسبت به همه یونها نفوذناپذیر باشد (a) هیچ یونی از غشا عبور نمی‌کند و هیچ اختلاف پتانسیل الکتریکی در پتانسیل سنج متصل به دو محلول ثبت نخواهد شد. اگر غشا تنها به Na^+ (b) یا به K^+ (c) نفوذپذیر باشد انتشار یون‌ها از طریق کانال‌های مخصوص باعث جدایی بار در طول غشا می‌شود. در حالت تعادل، پتانسیل غشا که در نتیجه جدایی بار به وجود می‌آید معادل با پتانسیل نرنست E_{Na} یا E_K که توسط پتانسیل سنج ثبت شده است خواهد بود. برای توضیح بیشتر به متن مراجعه کنید.

۱۱-۱۳a را ملاحظه کنید). در سلول‌های باکتریایی هوازی، پتانسیل منفی داخل توسط پروتون هایی که در طی انتقال الکترون به سمت‌خارج پمپ می‌شوند تولید می‌شود. این فرایند به پمپ شدن الکترون در غشای داخلی میتوکندری شبیه بوده و به طور جزئی در فصل ۱۲ بحث خواهد شد (شکل ۱۶-۱۲ را ملاحظه کنید).

پتانسیل در طول غشای پلاسمایی سلول های بزرگ توسط میکروالکترودی که در داخل سلول‌ها قرار گرفته و یک الکترود مرجع که در مایع خارج سلولی قرار گرفته، قابل اندازه‌گیری است. این دو به یک پتانسیل‌سنج که قادر است اختلافات کوچک پتانسیل را اندازه‌گیری کند متصل اند (شکل ۱۸-۱۱). پتانسیل در طول غشای سطحی اغلب سلول‌های جانوری عموماً با زمان تغییر نمی کند. در مقابل سلول های عصبی و ماهیچه‌ای (انواع سلول هایی که از نظر الکتریکی فعالند) تغییرات کنترل شده ای را در پتانسیل غشایی خود تحمل می‌کنند که در فصل ۲۳ بحث خواهیم کرد.

کانال‌های یونی دارای یک فیلتر انتخابی هستند که از قطعات ناقل غشایی محافظت شده تشکیل شده است

همه کانال‌های یونی نسبت به یون‌های ویژه‌ای اختصاصی‌اند. کانال‌های K^+ به K^+ اجازه عبور می‌دهند اما به یون‌های Na^+ که دقیقاً به آنها وابسته‌اند اجازه داخل شدن نمی‌دهند. کانالهای Na^+ به Na^+ اجازه ورود می‌دهند ولی به K^+ اجازه عبور نمی دهند.



▲ **شکل تجربی ۱۸-۱۱ پتانسیل الکتریکی در عرض غشای پلاسمایی سلول های زنده قابل اندازه‌گیری است.** میکرو الکترود توسط یک ماده پرکننده لوله شیشه‌ای با ابعاد بی‌نهایت کوچک و مایع رسانا مثل محلول KCl ساخته می‌شود و در داخل یک سلول قرار می‌گیرد و از این طریق پتانسیل سنج در اطراف نوک الکترود تعیین می‌شود. یک الکترود مرجع در محیط آبی قرار می‌گیرد. یک پتانسیل سنج به دو الکترود متصل است که در این مورد ۶۰- mV است. تنها وقتی اختلاف پتانسیل مثبت می‌شود که میکروالکترود در داخل سلول قرار گیرد. اگر میکرو الکترود در مایع آبی قرار گیرد هیچ پتانسیلی مثبت نمی‌شود.

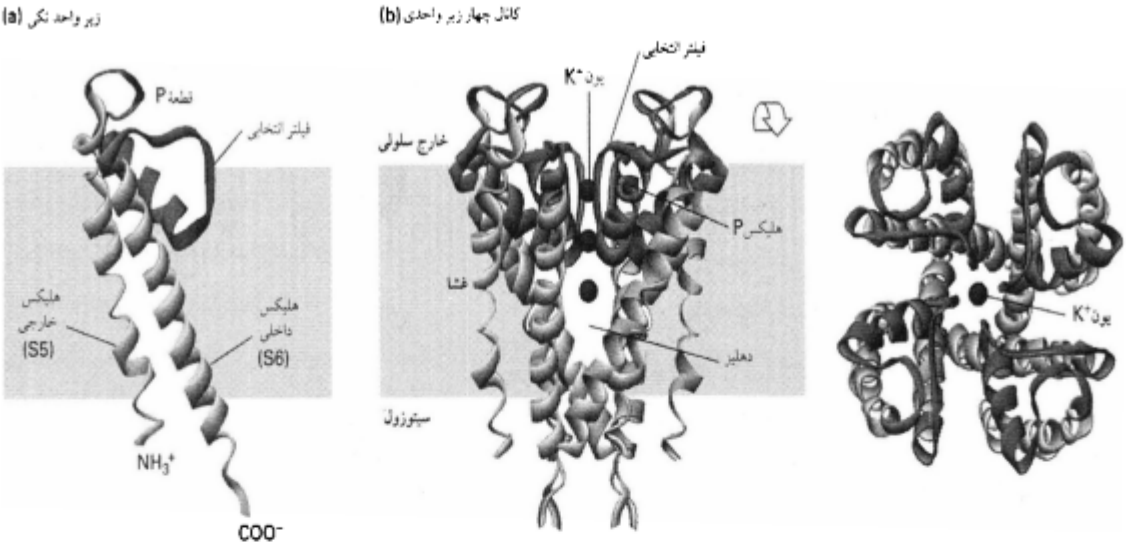
تعیین ساختار سه بعدی یک کانال K^+ باکتریایی در ابتدا نشان داد که چگونه این انتخاب عالی یون به دست می‌آید. مقایسه توالی کانال‌های K^+ و Na^+ و Ca^{2+} نشان داد که همه این قبیل پروتئین‌ها از یک ساختار عمومی استفاده‌می کنند و احتمالاً شکل تکامل یافتهٔ یک نوع کانال پروتئینی هستند.

کانال‌های پتاسیمی باکتری شبیه به دیگر کانال‌های K^+ از چهار زیر واحد مشابه ساخته شده اند که به طور متقارن در اطراف یک حفره مرکزی آرایش یافته‌اند (شکل۱۹-۱۱). هر زیر واحد شامل دو مارپیچ آلفای گذرنده از غشا (S6 و S5) و یک قطعه P کوچک است (دُمین حفره) که قطعه P به طور جزئی در غشای دو لایه‌ای نفوذ می‌کند. در کانال‌های K^+ چهار زیر واحدی، هشت مارپیچ آلفای ناقل غشایی (دو عدد از هر زیر واحد) یک «چادر معکوسی»[1] را تشکیل می‌دهند که یک حفره پر شده از آب به نام دهلیز در قسمت وسط کانال تشکیل می‌شود که نیمی از مسیر آن بین غشا توسعه پیدا می‌کند. چهار لوپ توسعه یافته که قسمتی از چهار قطعه P هستند فیلتر انتخابی یونی واقعی را در قسمت باریکی از حفره در نزدیک سطح اگزوپلاسمی و در بالای دهلیز تشکیل می‌دهند. چندین مدرک نقش قطعات P در انتخاب یون‌ها را حمایت می‌کند. اول، توالی اسیدهای آمینه قطعات P به میزان بالایی در همه کانال‌های پتاسیمی شناخته شده مشابهند و با دیگر کانال‌های یونی متفاوتند. دوم، جهش در اسیدهای آمینه معین در این قطعات، قدرت کانالهای K^+ را در تمایز Na^+ از K^+ تغییر می‌دهد. و در نهایت اینکه جایگزینی قطعه P در یک کانال K^+ باکتریایی با قطعات مشابه از کانال‌های K^+ پستانداران، یک پروتئین کیمری را به وجود آورده است که انتخاب پذیری طبیعی برای K^+ با وجود یون‌های دیگر نشان می‌دهد. بنابراین تصور می‌شود همه کانال‌های K^+ همان مکانیسم تمایز K^+ از یون‌های دیگر را استفاده می‌کنند.

یون‌های سدیم کوچک‌تر از یون‌های پتاسیمی‌اند. پس چگونه یک پروتئین کانالی مانع ورود یون‌های Na^+ می‌شود در صورتی که K^+ را عبور می‌دهد. قدرت فیلترهای انتخاب یونی در کانال‌های K^+ برای انتخاب K^+ از Na^+ به طور عمده به اکسیژن کربونیل زنجیره اصلی در اسیدهای آمینه‌ای وابسته است که به صورت توالی Gly-Tyr-Gly قرار گرفته‌اند و در موقعیت مشابه در قطعه P کانال‌های پتاسیمی شناخته شده یافت می‌شود. همان طور که یون K^+ وارد فیلترهای انتخابی باریک می‌شود آبی که آن را آبپوشی کرده است از دست می‌دهد و با همان شکل هندسی به هشت کربونیل زنجیره اصلی متصل می‌شود، دو عدد از لوپ‌های توسعه یافته در هر یک از چهار قطعه P، کانال را آستر می‌کند (شکل ۲۰a-۱۱ سمت چپ). بنابراین برای جدا کردن هشت مولکول آب از یک یون K^+ آبپوشی شده انرژی کمی نیاز است و در نتیجه انرژی فعال سازی نسبتاً کمی برای عبور یون‌های K^+ از کانال مورد نیاز است . یک یون Na^+ دهیدراته برای اتصال به همه هشت اکسیژن کربونیل که فیلترهای انتخابی را آستر می‌کنند به همان شکل هندسی یون Na^+ که به طور طبیعی توسط هشت مولکول آب احاطه شده است خیلی کوچک است. در نتیجه یون‌های Na^+ ترجیح می‌دهند که بیشتر در آب باقی بمانند تا این که داخل فیلترهای انتخابی شوند و بنابراین انرژی فعال سازی برای عبور یون‌های Na^+ نسبتاً زیاد است (شکل ۲۰a-۱۱ سمت راست).

با این اختلاف در انرژی فعال سازی، ترجیح داده می‌شود K^+ در مقابل Na^+ با مضربی از ۱۰۰۰ برابر عبور کند. یون‌های دهیدراته

1- Inverted tepee



▲ **شکل ۱۹-۱۱ (شکل رنگی) ساختار کانال‌های پتاسیمی در حال استراحت باکتری استرپتومایسس لیویدانس** همه پروتئین‌های کانالی K^+ تترامرهایی شامل چهار زیرواحد مشابهند که هر کدام از دو مارپیچ آلفای محافظت شده گذرنده از عرض غشا تشکیل شده است که به طور قراردادی S5 و S6 نامیده می‌شوند. (زرد) و همچنین دارای یک P کوتاه‌تر با قطعه حفره‌ای است (صورتی). (a) یکی از زیرواحدها به طور جانبی با طرح‌های ساختاری کلیدی نشان داده شده است. (b) کل کانال‌های چهار واحدی از کنار (چپ) و از اتم‌های بالایی خارج سلولی (راست) نشان داده است. قطعه P نزدیک سطح اگزوپلاسمی قرار گرفته و به مارپیچ‌های آلفای S5 و S6 متصل می‌شوند. آنها از یک «کنگره»[1] غیر کروی تشکیل شده‌اند که قسمت فوقانی حفره را آستر می‌کنند و دارای یک مارپیچ آلفای کوتاه و یک لوپ توسعه یافته که به داخل باریک‌ترین قسمت حفره برآمدگی دارد هستند که فیلتر انتخابی یون را تشکیل می‌دهند. این فیلتر به K^+ (کره‌های ارغوانی) اجازه عبور می‌دهد و به دیگر یون‌ها اجازه عبور نمی‌دهد. پائین فیلتر، حفره مرکزی یا دهلیز است که توسط بخش داخلی یا مارپیچ‌های آلفای S6 آستر شده است. زیر واحدهای کانالهای پتاسیمی دریچه دار که در پاسخ به تحریکات خاصی باز و بسته می‌شوند دارای مارپیچ‌های ناقل غشایی اضافی هستند که در اینجا نشان داده نشده‌اند و در فصل ۲۳ بحث خواهند شد.

Ca^{2+} مشابه Na^+ از یون‌های دهیدراته K^+ کوچک‌تر هستند و نمی توانند به طور مناسب با اتم‌های اکسیژن در فیلتر انتخابی واکنش دهند. بنابراین انرژی بیشتری برای جدا کردن آب از Ca^{2+} آبپوشی نسبت به K^+ مورد نیاز است.

جدیداً مطالعات کریستالوگرافی اشعه X نشان می‌دهد که کانال‌ها در مواقع باز و بسته بودن دارای یون‌های پتاسیم در داخل فیلترهای انتخابی اند و بدون این یون‌ها احتمالاً کانال‌ها نظم خود را از دست می‌دهند. تصور می‌شود یون‌های K^+ در موقعیت‌های ۱و۳ و یا ۲ و۴ هم حضور داشته باشند و هر کدام توسط هشت اتم اکسیژن کربونیل احاطه شوند (شکل ۲۰b,c-۱۱). چندین یون K^+ به طور همزمان از طریق کانال حرکت می‌کنند. در مواقعی که یون روی سطح اگزوپلاسمی که تا حدودی از آبی که آنها را آبپوشی کرده است جدا شده‌اند به داخل موقعیت ۱ حرکت می‌کند، یونی که در موقعیت ۲ است به موقعیت ۳ پرش می‌کند و دیگری که در موقعیت ۴ است کانال را ترک می‌کند.

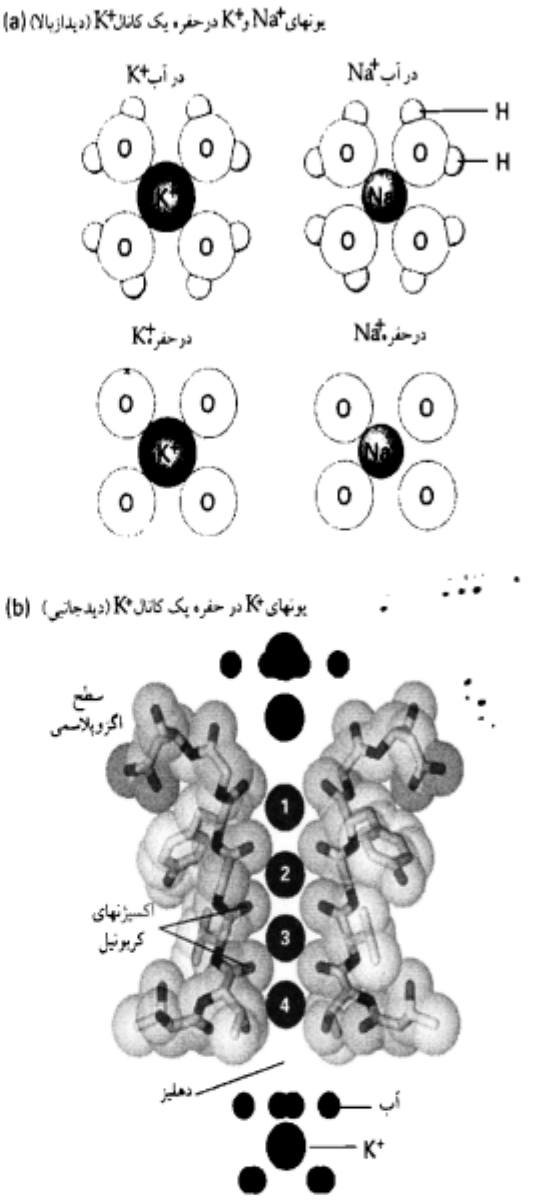
اگر چه توالی اسیدهای آمینه قطعه P در کانال‌های Na^+ و K^+ تا اندازه‌ای متفاوتند ولی آنها به اندازه کافی تشابه دارند تا بتوان پیشنهاد کرد که ساختار عمومی فیلترهای انتخابی یون در دو نوع کانال قابل مقایسه‌اند.

احتمال می‌رود که ابعاد فیلتر در کانال‌های Na^+ تا اندازه‌ای کوچک هستند که به یون‌های Na^+ دهیدراته اجازه می‌دهد به اکسیژن‌های کربونیل زنجیره اصلی بچسبند ولی یون‌های بزرگ K^+ داخل شده را دفع می‌کند. اما هنوز هیچ ساختار سه بعدی از کانال Na^+ موجود نیست.

تکنیک تکه ـ نگهداری اجازه اندازه‌گیری حرکات یونی را از طریق کانال‌های تکی می‌دهند

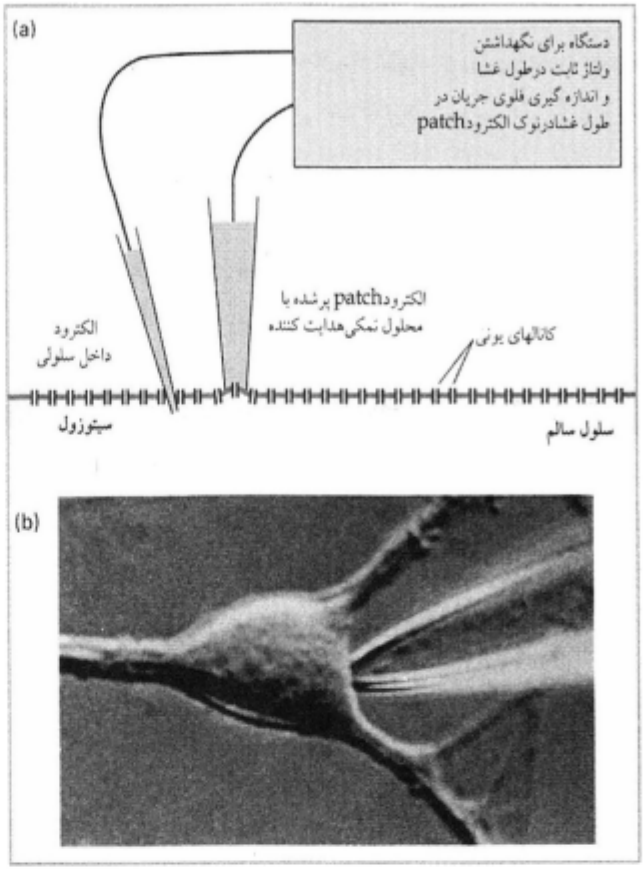
تکنیک تکه ـ نگهداری[2] محققین را قادر به بررسی باز شدن، بسته شدن، تنظیم و هدایت یون از یک کانال یونی منفرد می‌کند. در این تکنیک حرکت یون‌ها به سمت داخل یا خارج در عرض یک گیرهٔ

1- Turret 2- Patch clamping

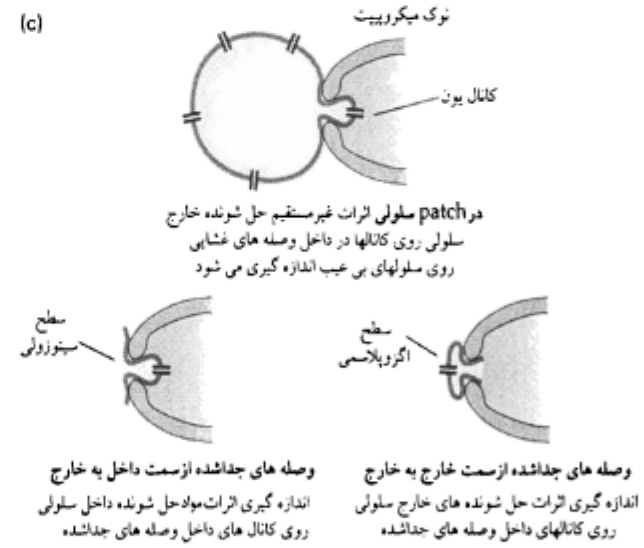


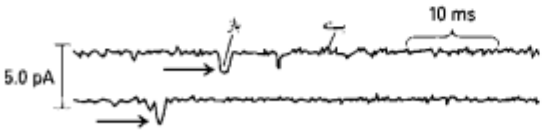
◀ **شکل ۲۰-۱۱ (شکل رنگی) مکانیسم انتخاب و انتقال یون در کانال‌های پتاسیمی در حالت استراحت.** (a) شکل شماتیک از یون‌های K^+ و Na^+ که درمحلول و حفره یک کانال K^+ آبپوشی شده‌اند. همان طور که یون‌های K^+ از طریق فیلترهای انتخابی عبور می‌کنند پیوندهایشان با مولکول‌های آب را از دست می‌دهند و در عوض با هشت اکسیژن کربونیل زنجیره اصلی همراه می‌شوند که چهار تا از آنها نشان داده شده است و آنها بخشی از اسیدهای آمینه حفاظت شده در لوپهای آستر کننده کانال در هر قطعه P هستند. یون‌های Na^+ کوچکتر به همراه لایهٔ مولکول‌های آب نمی‌توانند به طور کامل با اتم‌های اکسیژن کانال همراه شوند و بنابراین از طریق کانال به ندرت عبور می‌کنند. (b) نقشه تراکم الکترون با قدرت تفکیک بالا که از کریستالوگرافی اشعه x به دست آمده است عبور یون‌های K^+ (کره‌های ارغوانی) از طریق فیلتر انتخابی را نشان می‌دهد. تنها دو تا از این زیر واحدهای کانال به طور مورب متضاد یکدیگر نشان داده شده است. هر یون K^+ که بدون آب است در داخل فیلترهای انتخابی با هشت اتم اکسیژن کربونیل (خطاهای قرمز) آسترکننده کانال (۲ تا از هر یک از ۴ زیرواحد) برهم‌کنش می‌دهد. همان طور که هشت اتم آب آنها را آبپوشی کرده بودند. (c) تفسیر نقشه دانسیته الکترونی نشان‌دهنده‌دو حالت متغیر است که یون‌های پتاسیم از طریق کانال عبور می‌کنند. در حالت (۱)، حرکت از سمت اگزوپلاسمی کانال به طرف داخل، یون پتاسیم آبپوشی شده که با هشت مولکول آب پیوند دارد، یون پتاسیم در موقعیت‌های ۱ و ۳ در درون فیلتر انتخابی و یک یون پتاسیم که به طور کامل آبپوشی شده است در درون دهلیز دیده می‌شود. در طول حرکت K^+، هر یونی در حالت ۱، یک مرحله به سمت داخل حرکت می‌کند و حالت ۲ تشکیل می‌شود. بنابراین در حالت ۲ یون‌های K^+ در سطح اگزوپلاسمی کانال چهار تا از هشت مولکول آب خود را از دست می‌دهند و یون‌هایی که در حالت ۱ در موقعیت یک بودند به موقعیت ۲ حرکت می‌کنند و یون موجود در موقعیت ۳ در حالت ۱ به موقعیت ۴ حرکت می‌کند. هنگام رفتن از حالت ۲ به حالت ۱، K^+ موجود در موقعیت ۴ به داخل دهلیز جابجا می‌شود و هشت مولکول آب به دست می‌آورد. در این حالت، دیگر یون‌های K^+ آبپوشی شده به داخل کانال باز شده حرکت می‌کنند و دیگر یون‌های K^+ به یک مرحله قبل برمی‌گردند.

غشایی از روی مقدار جریان الکتریکی مورد نیاز برای حفظ پتانسیل غشا در مقدار وصله شده (تکه) ویژه کمّی سازی می‌شود (شکل ۲۱a,b-۱۱). برای حفظ خنثی بودن الکتریکی و نگهداری پتانسیل غشا در حالت ثابت، داخل شدن هر یون مثبت (مثل یک یون Na^+) به داخل سلول از طریق کانال موجود در قسمت وصله شده غشایی با

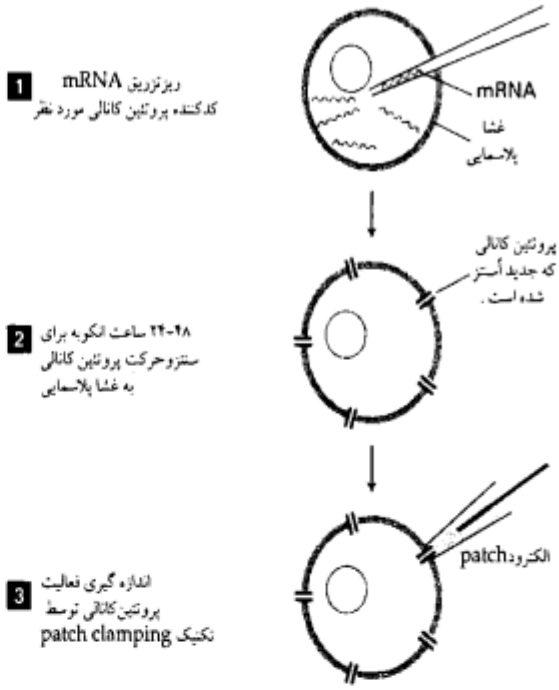


◀ شکل تجربی ۲۱-۱۱ جریان جاری شده از بین کانالهای یونی تکی به وسیله تکنیک تکه ـ نگهداری قابل اندازه‌گیری است. (a) آرایش آزمایشی پایه برای اندازه‌گیری جریان جاری شده از کانال‌های یونی تکی در غشای پلاسمایی یک سلول زنده. الکترود گیره‌ای که با یک محلول نمکی هدایت‌کننده جریان پر شده است با مکش جزئی غشای پلاسمایی به کار می‌رود. نوک آن با ابعاد ۰/۵μm منطقه‌ای که تنها شامل یک یا تعداد کمی کانال یونی است را می‌پوشاند. یک دستگاه ثبت، فلوی جریان را از طریق کانال‌ها در قسمت وصله شده غشای پلاسمایی اندازه‌گیری می‌کند. (b) میکروگراف نوری از سلول بدن یک عصب کِشت شده و نوک یک پیپت وصله شده که غشای سلول را لمس کرده است. (c) اشکال مختلف تکنیک تکه ـ نگهداری. وصله‌های جدا شده ایزوله بهترین شکل برای مطالعه اثرات غلظت‌های یونی مختلف و حل شونده‌هایی مثل هورمون‌های خارج سلولی و پیامبرهای ثانویه داخل سلولی مثل cAMP روی کانال‌ها هستند.





◀ شکل تجربی ۲۲-۱۱ (شکل رنگی) یون‌های جریان یافته از طریق کانال‌های Na^+ تکی با ردیابی تکه ـ نگهداری قابل محاسبه‌اند. هر وصله به سمت داخل - خارج غشای پلاسمایی ماهیچه در یک پتانسیل که به میزان جزئی کمتر از پتانسیل استراحت غشا است وصل می‌شوند. الکترود وصله محتوی NaCl است. پالس گذرای جریان الکتریکی با واحد پیکو آمپر (pA) به صورت انحرافات بزرگ رو به پائین ثبت می‌شود (فلش‌های آبی) و بیانگر باز بودن کانال سدیمی و حرکت یون‌های سدیم به سمت داخل از طریق غشا است. میانگین جریان از طریق یک کانال باز ۱/۶pA یا $۱/۶\times۱۰^{-۱۲}$ آمپر است. از آنجایی که ۹۶۵۰۰c/mol ÷ (۶×۱۰^{۲۳}molecule/mol)($۱۰^{-۳}$s/ms)($۱/۶\times۱۰^{-۱۲}$C/S) ۱ آمپر = ۱کولمب (c) بار در هر ثانیه است. این جریان برابر با حدود ۹۹۰۰ یون Na^+ در هر کانال در هر میلی ثانیه است



▲ شکل تجربی ۲۳-۱۱ سنجش بیان تخمک در مقایسه عملکرد طبیعی و اشکال جهش یافته یک پروتئین کانالی مفید است. یک فولیکول تخمک قورباغه در ابتدا با کلاژناز تیمار می‌شود تا سلول‌های فولیکولی احاطه‌کننده آن حذف شوند و یک تخمک عریان باقی بماند و از طریق ریز تزریق mRNA کدکنندهٔ پروتئین کانالی، این کانال تحت مطالعه می‌شود.

اضافه شدن یک الکترون به داخل سیتوزول متعادل می‌شود. یک دستگاه الکترونیکی تعداد الکترون‌های (جریان) مورد نیاز برای موازنه کردن یون‌های داخل ریخته شده از طریق کانال‌های غشایی را اندازه‌گیری می‌کند. به طور معکوس خروج هر یون مثبت از سلول (مثل یک یون K^+) توسط پس گرفتن یک الکترون از سیتوزول متعادل می‌شود. تکنیک تکه ـ نگهداری می‌تواند در همه سلول‌ها با وصله‌های غشایی جدا شده استفاده شود و اثرات مواد و غلظت‌های یونی در جریان یونی را اندازه بگیرد. (شکل ۲۲c-۱۱)

ردیابی تکه ـ نگهداری در شکل ۲۲-۱۱ نشان دهنده استفاده از این تکنیک برای مطالعه خواص کانالهای سدیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ در غشای پلاسمایی سلول‌های ماهیچه‌ای است. همان طور که در فصل ۲۳ بحث می‌شود این کانال‌ها به طور طبیعی در سلول‌های ماهیچه‌ای در حال استراحت بسته‌اند و در ادامه تحریک عصبی، باز می‌شوند. وصله‌هایی از غشای ماهیچه که هر کدام شامل یک کانال Na^+ است در یک ولتاژی که کمی از پتانسیل غشای در حال استراحت کم‌تر است بسته شده است. در این وضعیت پالس‌های گذرای جریان در طول غشا، کانال‌های سدیمی تکی را باز و سپس می‌بندد. همچنین هر کانال به طور کامل باز یا کاملاً بسته می‌شود. در این قبیل ردیابی‌ها، زمانی که یک کانال باز است و یون‌ها در آن جریان می‌یابند قابل تعیین است. برای کانال‌های اندازه‌گیری شده در شکل ۲۲-۱۱، جریان حدود ۱۰ میلیون یون Na^+ در هر کانال در هر ثانیه است که یک مقدار تیپیک برای کانالهای یونی است. جایگزینی NaCl در داخل پیپت‌های گیره‌ای (متعلق به بیرون سلول) با KCl یا کلرید کولین جریان را در طول کانال‌ها از بین می‌برد و تصدیق می‌کند که آنها فقط یون‌های Na^+ را و نه K^+ یا یون‌های دیگری را هدایت می‌کند.

کانال‌های یونی جدید می‌توانند توسط ترکیب بیان تخمک و تکنیک تکه ـ نگهداری تعیین ویژگی شوند.

کلون‌سازی ژن‌هایی که عامل بیماری‌های انسانی‌اند و تعیین توالی ژنوم انسانی باعث شناسایی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کانالی مشهور شامل ۶۷ پروتئین کانال K^+ مشهور شده است. یک راه برای تعیین عملکرد این پروتئین‌ها رونویسی از یک cDNA کلون شده در سیستمی با سلول‌های آزاد است تا mRNA مربوطه تولید شود. تزریق این mRNA به تخمک قورباغه و اندازه‌گیری‌های تکه ـ نگهداری در پروتئین کانالی که جدیداً سنتز شده است اغلب نشان‌دهنده عملکرد آن است (شکل ۲۳-۱۱ را ملاحظه کنید). این رویکرد آزمایشی به طور اختصاصی مفید است زیرا تخمک قورباغه به طور طبیعی هیچ پروتئین کانالی را در سطح غشایی بیان نمی‌کند. بنابراین تنها کانال تحت مطالعه است که در غشا حضور دارد. به علاوه به علت اندازه بزرگ تخمک قورباغه انجام مطالعات تکه ـ نگهداری از نظر تکنیکی روی آنها آسانتر است تا این که روی سلول‌های کوچک‌تر انجام شود.

ورود سدیم به داخل سلول‌های پستانداران یک تغییر منفی در انرژی آزاد (ΔG) به وجود می‌آورد

همان طور که قبلاً ذکر شد دو نیرو در حرکت یون‌ها از طریق غشاهای نفوذپذیر انتخابی تأثیر دارند. ولتاژ و شیب غلظت یونی. در عرض غشا جمع این نیروها که شاید در یک جهت یا در جهت‌های مخالف عمل کنند، شیب الکترو شیمیایی را به وجود می‌آورد. برای محاسبه تغییرات انرژی آزاد ΔG مرتبط با انتقال هر یون از طریق یک غشا نیاز داریم که سهم مستقل هر کدام از نیروها را برای شیب الکتروشیمیایی بحث کنیم.

برای مثال وقتی Na^+ از سمت خارج به داخل سلول حرکت می‌کند تغییر انرژی آزاد تولید شده از شیب غلظت Na^+ به صورت زیر بدست می‌آید.

$$\Delta G_c = RT \ln \frac{[Na_{in}]}{[Na_{out}]} \qquad (۱۱-۵)$$

در غلظت‌هایی از Na_{in} و Na_{out} که در شکل ۲۴-۱۱ نشان داده شده است که به طور تیپیک در بسیاری سلول‌های پستانداران وجود دارند، ΔG_C تغییر در انرژی آزاد است که به شیب غلظت بستگی دارد و مقدار آن ۱/۴۵ Kcal- برای انتقال یک مول یون Na^+ از خارج به داخل سلول است البته با فرض این که پتانسیل الکتریکی غشا وجود ندارد. توجه کنید انرژی آزاد منفی است و باعث ایجاد حرکت خود به خودی Na^+ به داخل سلول می‌شود.

تغییر انرژی آزاد تولید شده از پتانسیل الکتریکی غشا به صورت زیر به دست می‌آید.

$$\Delta G_m = FE \qquad (۱۱-۶)$$

در اینجا F ثابت فارادی و E پتانسیل الکتریکی غشا است. اگر E=-۷۰mV، پس ΔG_m یعنی تغییر انرژی آزاد که به پتانسیل غشا بستگی دارد ۱/۶۱Kcal- برای انتقال یک مول یون Na^+ از خارج به داخل سلول است. البته با فرض این که شیب غلظت Na^+ وجود نداشته باشد. از آنجایی که این دو نیرو در حقیقت روی یون‌های Na^+ کار انجام می‌دهند. ΔG کل، جمع دو مقدار جزئی است.

$\Delta G = \Delta G_C + \Delta G_m = (-۱/۴۵) + (-۱/۶۱) =$
$-۳/۰۶$ Kcal/mol

در این مثال شیب غلظت Na^+ و پتانسیل الکتریکی غشا به طور برابر در ΔG کل انتقال یون‌های Na^+ سهیم‌اند. از آنجایی که $\Delta G < ۰$ است حرکت به سوی داخل یون‌های Na^+ از نظر ترمودینامیکی امکان پذیر است. همان طور که در قسمت‌های بعدی بحث خواهد شد پروتئین‌های هم انتقالی معینی از حرکت رو به داخل Na^+ برای تقویت حرکت سربالایی دیگر یون‌ها و چندین نوع مولکول کوچک به داخل یا خارج سلول‌های جانوری استفاده می‌کنند. حرکت مطلوب از نظر انرژیتکی و سریع یون‌های Na^+ از طریق کانال‌های Na^+ در تولید پتانسیل عمل در سلول‌های عصب و ماهیچه نقش محوری دارد که در فصل ۲۳ بحث خواهیم کرد.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۱

کانالهای یونی غیر دریچه‌دار و پتانسیل استراحت غشاء

■ یک پتانسیل الکتریکی منفی (ولتاژ) در حدود ۵۰-۷۰ mV در عرض غشاهای پلاسمایی تمام سلولها وجود دارد.

■ در سلولهای حیوانی، پتانسیل غشاء در ابتدا توسط حرکت یونهای K^+ سیتوزولی از میان کانالهای K^+ به محیط خارج سلول ایجاد می‌شود. برخلاف بسیاری از کانالهای یونی دریچه‌دار که فقط در پاسخ به پیام‌های متعددی باز می‌شوند این کانالهای K^+ غیر دریچه‌دار همیشه باز هستند.

■ در گیاهان و قارچها، پتانسیل غشاء توسط پمپ‌های پروتونی وابسته به ATP که پروتونها را از سیتوزول به سطح بیرونی سلول پمپ می‌کنند، ایجاد می‌شود.

■ کانالهای K^+ به صورت چهار زیرواحد مشابه همایش می‌یابند که هر کدام حداقل حاوی دو مارپیچ آلفا گذار غشایی حفاظت شده و یک بخشی غیرمارپیچی P که منفذ یون را می‌پوشاند و فیلتر انتخابی را تشکیل می‌دهد، می‌باشند.

■ ویژگی یونی مربوط به پروتئین‌های کانال K^+ به علت عملکرد هماهنگ انتخاب‌پذیری یون با اتمهای اکسیژن کربونیل اسیدهای آمینه در بخش‌های P می‌باشد که انرژی فعال‌سازی عبور انتخابی K^+ را در مقایسه با سایر یون‌ها پایین می‌آورد (شکل ۲۰-۱۱ را ملاحظه کنید).

■ تکنیک‌های تکه-نگهداری که امکان اندازه‌گیری حرکت یون‌ها را از میان یک کانال فراهم می‌کنند برای تعیین هدایت یونی کانال‌ها و اثرات پیامهای مختلف بر روی فعالیت آن نیز استفاده می‌شوند (شکل ۲۱-۱۱ را ملاحظه کنید).

■ فناوریهای DNA نوترکیب و تکنیک‌های تکه-نگهداری بیان و تعیین ویژگی عملکردی پروتئین‌های کانالی را در اووسیت قورباغه فراهم می‌آورند (شکل ۲۳-۱۱ را ملاحظه کنید)

■ شیب الکتروشیمیایی در عرض غشای نیمه‌تراوا جهت حرکت یونها را از میان پروتئین‌های کانالی تعیین می‌کنند. دو نیرو در ایجاد شیب الکتروشیمیایی دخیل است که عبارتند از پتانسیل الکتریکی غشاء و شیب غلظت یونی. این دو نیرو ممکن است در جهات مشابه یا مخالف عمل کنند (شکل ۲۴-۱۱ را ملاحظه کنید).

۱۱-۵ هم‌انتقالی توسط ناقل‌های همسو و ناهمسو

در قسمت قبلی دیدیم که چگونه پمپ‌های مصرف‌کننده ATP، شیب غلظت یونی در عرض غشاهای سلولی تولید می‌کنند و چگونه پروتئین‌های کانال یونی از این شیب‌ها برای ایجاد پتانسیل

الکتریکی در عرض غشاها استفاده می‌کنند. در این قسمت می‌خواهیم ببینیم چگونه ناقل‌های هم‌انتقالی انرژی ذخیره شده در شیب‌های پتانسیل الکتریکی و غلظت یون‌های Na^+ یا H^+ را برای تقویت حرکت سربالایی مواد دیگر استفاده می‌کنند که این مواد شاید یک مولکول آلی مثل گلوکز یا یک اسید آمینه یا یک یون متفاوت باشد (شکل ۲-۱۱ را ملاحظه کنید). برای مثال از نظر انرژتیکی حرکت یون Na^+ (یون هم‌انتقال) به داخل سلول از طریق غشای پلاسمایی که به وسیله شیب غلظت و شیب ولتاژ غشایی پیش می‌رود (شکل ۲۴-۱۱ را ملاحظه کنید) مطلوب بوده و می‌تواند با حرکت مولکول‌های انتقالی (مثل گلوکز یا لیزین) برخلاف شیب غلظت‌شان همراه شود. یک شکل مهم این **هم انتقالی**[۱] زمانی است که مولکول نمی‌تواند به تنهایی حرکت کند و حرکت دو مولکول با هم اجباری یا جفت شده[۲] است.

ناقل‌های هم‌انتقالی خصوصیات مشترک با ناقل‌های تکی مثل پروتئین‌های GLUT دارند. دو نوع ناقل، شباهت‌های ساختاری معینی را نشان می‌دهند، با سرعت‌های یکسان عمل می‌کنند و تغییرات ساختمان‌فضایی چرخه‌ای را در طول انتقال سوبستراهایشان طی می‌کنند. آنها با ناقلین تکی که تنها انتقال در جهت شیب غلظت را تسریع کرده و از نظر ترمودینامیکی مطلوب است متفاوتند. در حالی که ناقلهای هم انتقالی انرژی یک واکنش مطلوب جفت شده را مهار می‌کنند تا به طور فعال مولکول‌ها را بر خلاف شیب غلظت منتقل کنند.

وقتی مولکول‌های انتقالی و یون‌های هم انتقال در یک جهت حرکت کنند فرایند **انتقال همسو**[۳] نامیده می‌شود و وقتی در دو جهت متفاوت حرکت کنند فرایند **انتقال ناهمسو**[۴] نامیده می‌شود (شکل ۳-۱۱ را ملاحظه کنید). بعضی هم‌انتقالگرها تنها یون‌های مثبت (کاتیون) را انتقال می‌دهند در حالی که بعضی فقط یون‌های منفی (آنیون) را منتقل می‌کنند. یک مثال مهم از یک انتقالگر کاتیونی، انتقال‌دهنده ناهمسوی Na^+/H^+ است که H^+ را از سلول خارج می‌کند که این حرکت با ورود Na^+ که از نظر انرژتیکی مطلوب است همراه می‌شود. مثالی از هم انتقال‌دهنده، انتقال‌دهنده آنیونی AE1 است که مبادله یک به یک Cl^- و HCO_3^- را در عرض غشای پلاسمایی کاتالیز می‌کند. اما دیگر هم‌انتقالگرها واسطه حرکت کاتیون و آنیون با هم هستند. هم‌انتقالگرها در همه موجودات شامل باکتری‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارند و در این قسمت فعالیت و عملکرد چندین ناقل همسو و ناقل ناهمسو را که از نظر فیزیولوژیکی مهم‌اند شرح می‌دهیم.

ناقلین همسویی که به Na^+ می‌چسبند اسیدهای آمینه و گلوکز را بر خلاف شیب غلظت بالایشان به سلول‌های جانوری وارد می‌کنند

بسیاری از سلول‌های بدن گلوکز را در جهت شیب آن با استفاده از پروتئین‌های GLUT که این انتقال را تسهیل می‌کند از خون می‌گیرند. بااین‌حال سلول‌های معینی از قبیل آنهایی که روده کوچک را آستر می‌کنند و توبول‌های کلیه نیاز به ورود گلوکز از لومن روده یا تشکیل ادرار بر خلاف شیب غلظت بسیار بالا را دارند. این قبیل سلول‌ها از ناقل همسویی که دو سدیم و یک گلوگر را منتقل می‌کند استفاده می‌کنند. این انتقالگر پروتئینی است که ورود یک مولکول گلوکز را با ورود دو یون Na^+ همراه می‌کند

$$2Na^+_{out} + \text{گلوکز}_{out} \rightleftharpoons 2Na^+_{in} + \text{گلوکز}_{in}$$

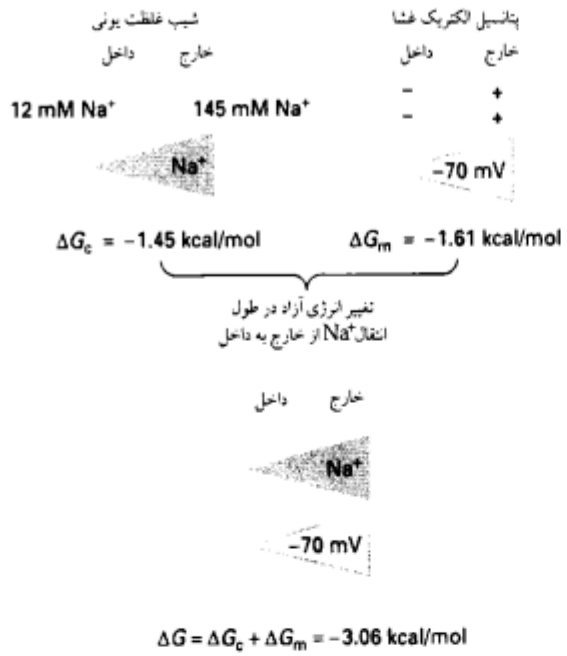
از نظر کمّی، تغییر انرژی آزاد برای هم انتقالی ۲ یون Na^+ و یک مولکول گلوکز می‌تواند به صورت زیر نوشته شود:

(۱۱-۷)

$$\Delta G = RT\ln\frac{[\text{گلوکز}_{in}]}{[\text{گلوکز}_{out}]} + 2RT\ln\frac{[Na^+_{in}]}{[Na^+_{out}]} + 2FE$$

بنابراین ΔG برای واکنش کلی، جمع تغییرات انرژی آزاد تولید شده توسط شیب غلظت گلوکز (یک مولکول منتقل شده است) و شیب غلظت Na^+ (۲ یون Na^+ منتقل شده است) و پتانسیل غشا (۲ یون Na^+ منتقل شده است) است. همان طور که از شکل ۲۴-۱۱ واضح است انرژی آزاد رها شده توسط حرکت Na^+ به داخل سلول‌های پستانداران در جهت شیب الکترو شیمیایی‌شان دارای تغییر انرژی آزاد (ΔG) در حدود ۳Kcal- برای هر مول Na^+ منتقل شده است. بنابراین ΔG برای انتقال دو مول Na^+ به سمت داخل در حدود ۶Kcal- است. این انرژی آزاد منفی در ورود سدیم با انتقال سربالایی گلوکز که فرایندی با ΔG مثبت است همراه می‌شود و ما می‌توانیم شیب غلظت سدیم را که در داخل بزرگتر از خارج است در مقابل آن گلوکزهایی که منتقل می‌شوند با درک این واقعیت که در حالت تعادل برای ورود گلوکز همراه شده با سدیم $\Delta G=0$ است، محاسبه کنیم. با جانشینی مقادیر برای ورود سدیم در معادله ۷-۱۱ و $\Delta G=0$، می‌بینیم که:

1- Cotransport 2- Coupled
3- Symport 4- Antiport



شکل ۲۴-۱۱ نیروهای غشایی عمل کننده روی یون‌های Na^+. حرکت یون‌های Na^+، از طریق غشای پلاسمایی همانند همه یون‌ها به وسیله جمع دو نیروی مجزا یعنی شیب غلظت یونی و پتانسیل الکتریکی غشا صورت می‌گیرد. در غلظت‌های تیپیک Na^+ در داخل و خارج سلول‌های پستانداران، این نیروها معمولاً هم جهت عمل می‌کنند و یون‌های Na^+ به سمت داخل که از نظر انرژتیکی مطلوب است حرکت می‌کنند.

$$0 = RT \ln \frac{[\text{گلوکز}_{in}]}{[\text{گلوکز}_{out}]} - 6kcal$$

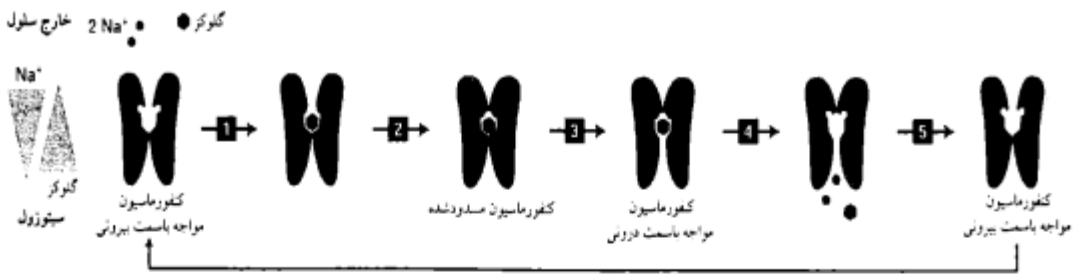
و می‌توان در حالت تعادل نسبت $\frac{\text{گلوکز}_{in}}{\text{گلوکز}_{out}} \approx 30000$ را محاسبه کرد. بنابراین جریان به سمت داخل ۲ مول Na^+، یک غلظت گلوکز داخل سلولی را تولید می‌کند که ۳۰۰۰۰ ≈ بار بزرگتر از غلظت خارجی است. اگر تنها یک یون سدیم با یک گلوکز وارد می‌شد ($\Delta G=-3Kcal/mol$)، انرژی موجود می‌توانست تنها غلظت گلوکز (خارج < داخل) در حدود ۱۷۰ برابر تولید کند. بنابراین همراه شدن انتقال دو یون Na^+ با یک گلوکز توسط ناقل همسوی لوسین ۱/Na^+-۲ به سلول‌ها اجازه داده می‌شود تا غلظت بسیار بالایی از گلوکز را نسبت به غلظت خارجی آن انباشته کنند. به این معنی که، حتی اگر غلظت گلوکز در لومن روده یا در تشکیل ادرار خیلی کم باشد می‌تواند با کارایی بالا به داخل سلول‌های آستر کننده منتقل شوند و از بدن دفع نمی‌شوند. تصور می‌شود ناقل همسوی گلوکز ۱ / $2Na^+$ دارای آلفا مارپیچ گذار غشایی با دو انتهایی C و N باشد که به داخل سیتوزول توسعه یافته است. یک پروتئین نوترکیب کوتاه شده تنها حاوی ۵ آلفامارپیچ ناقل غشایی با C انتهایی فقط می‌تواند به طور مستقل Na^+ را از طریق غشای پلاسمایی در جهت شیب غلظتش منتقل کند. بنابراین این قسمت از مولکول عملکردی مشابه با یک ناقل تکی گلوکز است. قسمت N انتهایی پروتئین شامل ۹-۱ مارپیچ است که نیاز به همراهی Na^+ متصل شده دارد تا گلوکز برخلاف شیب علظت منتقل شود.

شکل ۲۵-۱۱ جریان انتقال توسط ناقل همسوی گلوکز / Na^+ را رسم کرده است. این مدل مستلزم تغییرات ساختمان‌فضایی در پروتئین، مشابه با آنچه که در ناقل تکی مثل GIUT1 رخ می‌دهد است با این تفاوت که ناقل تکی نیاز به یون هم انتقال ندارد (شکل ۵-۱۱ را ملاحظه کنید). پیوند شدن همه سوبستراها به محل‌هایشان روی دُمین خارج سلولی قبل از این که پروتئین تغییر ساختمان‌فضایی را طی کند مورد نیاز است تا محل‌های پیوند شده به سوبسترا از سمت خارج به سمت داخل منتقل شوند. این عمل انتقال گلوکز و یون‌های سدیم همراه شده را تضمین می‌کند.

ساختار ناقل همسو در باکتری‌ها نشان‌دهنده مکانیسم پیوند شدن سوبسترا است

هیچ ساختار سه بعدی از ناقل همسوی سدیمی در پستانداران تعیین نشده است. اما ساختار چندین ناقل همسوی اسید آمینه، سدیم مشابه در باکتری اطلاعات قابل توجهی در مورد عمل انتقال همسو را فراهم کرده است. ناقل همسوی ۱-leucine / Na^+-۲ در شکل ۲۶a-۱۱ نشان داده شده است که دارای ۱۲ مارپیچ آلفای گذرنده از غشا است. دو تا از این مارپیچ‌ها (شماره ۱ و ۶) قطعات غیرکروی در غشای میانی‌اند که قسمتی از محل پیوند شده به لوسین را تشکیل می‌دهند.

ریشه‌های اسید آمینه‌ای که در پیوند شدن لوسین و دو یون سدیم درگیر هستند در قسمت میانی قطعات گذار از غشا قرار گرفته‌اند



▲ **شکل ۲۵-۱۱ مدل قابل استفاده برای ناقل همسوی گلوکز ۱ /$^+$۲Na**. به طور همزمان Na^+ و گلوکز به ساختمان‌فضایی که دارای محل‌های باند شونده به سمت خارج هستند متصل می‌شوند. (مرحله ❶). به علت تغییر شکل، پروتئینی که به سوبسترا متصل است به طور گذرا مسدود می‌شود و قادر به تفکیک در داخل هیچ محیطی نیست (مرحله ❷). در (مرحله ❸) پروتئین به صورت یک ساختمان‌فضایی سوم با محل‌هایی به سمت داخل فرض می‌شود. تفکیک پیوند Na^+ و گلوکز به داخل سیتوزول (مرحله ❹) به پروتئین اجازه برگشت به ساختمان‌فضایی اصلی به سمت خارج را می‌دهد (مرحله ❺) و برای انتقال سوبستراهای اضافی آماده می‌شود.

(همان طور که برای انتقالگر همراه گلوکز ۱ /$^+$Na- ۲ در شکل ۲۵-۱۱ نشان داده شده است.) و در ساختار سه بعدی فضایی نزدیک همدیگر قرار گرفته‌اند. این نشان می‌دهد که همراهی سوبسترا و یون انتقالی در این ناقل نتیجه‌ای از جهت یا تقریباً جهت برهم‌کنش‌های فیزیکی سوبستراها است. به علاوه، یکی از یون‌های سدیم (شماره یک در شکل ۲۶b-۱۱) به گروه کربوکسیل لوسین منتقل شده متصل می‌شود و نشان می‌دهد چگونه پیوند شدن سدیم و لوسین با هم جفت می‌شوند. هر یک از دو یون سدیم به شش اتم اکسیژن متصل می‌شوند. برای مثال سدیم یک همچنین به اکسیژن‌های کربونیل چندین اسید آمینه انتقالی (اکسیژن‌های کربونیل و اکسیژن هیدروکسیل ترئونین) متصل می‌شود. به طور برابر از نظر اهمیت، مولکول‌های آب احاطه کننده اتم‌های سدیم وجود ندارد و همچنین نمونه‌ای برای یون‌های K^+ در کانال‌های پتاسیمی است (شکل ۲۰-۱۱ را ملاحظه کنید). بنابراین یون‌های سدیم، آبی را که باعث آبپوشی آنها شده است از دست داده و به ناقل متصل می‌شوند یعنی به شش اتم اکسیژن با شکل هندسی مشابه متصل می‌شوند. این عمل انرژی فعال‌سازی برای پیوند شدن یون‌های سدیم را کاهش داده و مانع می‌شود که یون‌های دیگر مثل پتاسیم به مکان سدیم پیوند یابند.

یک طرح دقیق از ساختاری در شکل ۲۶-۱۱ نشان داده شده است که پیوند یون‌های سدیم و لوسین به صورت مسدود شده است یعنی آنها نمی‌توانند به بیرون از پروتئین به محیط احاطه کننده خارج سلولی یا سیتوپلاسمی منتشر شوند. ظاهراً در فرایند کریستاله کردن ین پروتئین‌ها، مواد پیوند شده به آنها در مرحله بینابینی انتقال به دام افتاده‌اند (شکل ۲۵-۱۱ را ملاحظه کنید). در این پروتئین تغییر از یک ساختمان‌فضایی با محل پیوندی در سطح اگزوپلاسمی به ساختمان‌فضایی با محل پیوندی در سطح سیتوزولی دیده شده است.

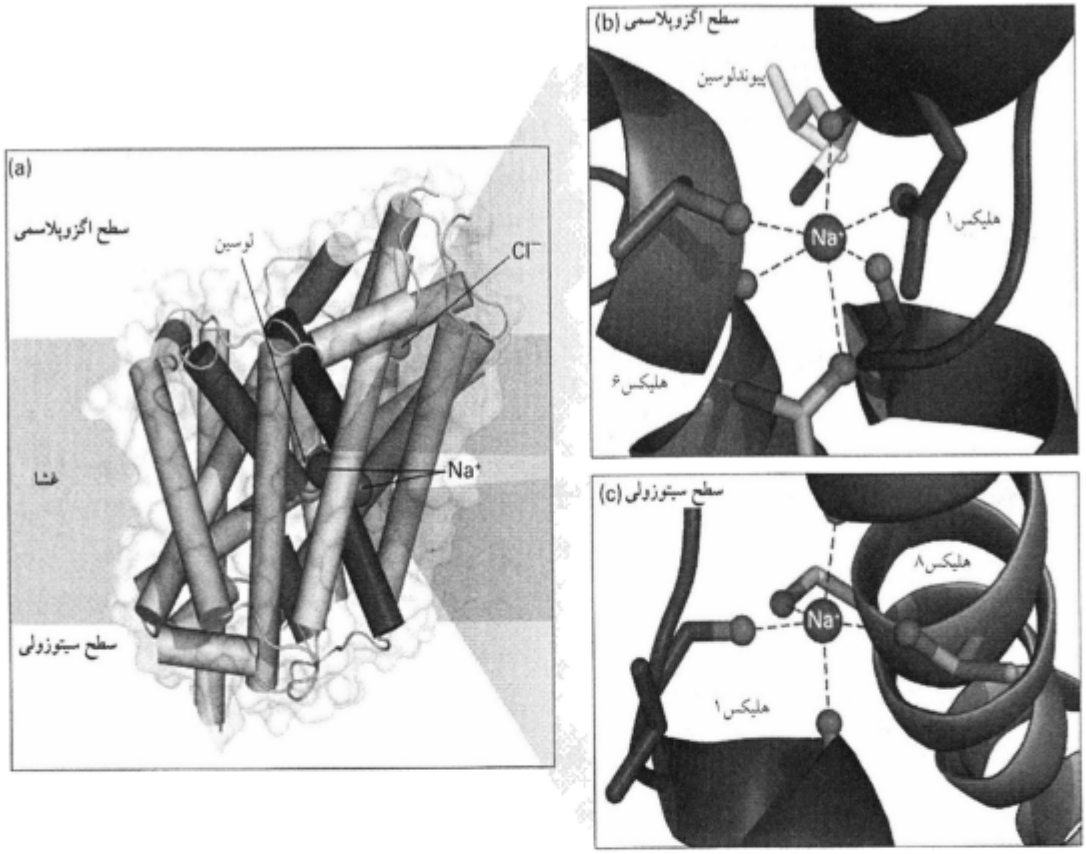
ناقل ناهمسوی Ca^{2+} که به Na^+ چسبیده است Ca^{2+} را از سلول‌های ماهیچه‌ای قلب خارج می‌کند.

در سلول‌های ماهیچه‌ای قلب، ناقل ناهمسوی $3Na^+/1\text{-}Ca^{2+}$ بیشتر از Ca^{2+}ATPase که قبلاً بحث شد وجود دارد و نقش اصلی در نگهداری غلظت کم Ca^{2+} سیتوزول بازی می‌کند. واکنش انتقالی که با واسطه این ناقل ناهمسوی کاتیونی وساطت می‌شود را می‌توان به صورت زیر نوشت:

$$3Na_{out} + Ca_{in}{}^{2+} \rightleftharpoons 3Na_{in} + Ca_{out}{}^{2+}$$

توجه کنید که حرکت ۳ یون Na^+ برای تولید نیروی محرکه خروج یک یون Ca^{2+} از سیتوزول مورد نیاز است. در سیتوزول $[Ca^{2+}]\approx ۲\times ۱۰^{-۷}M$ و در محیط خارج سلولی $[Ca^{2+}]\approx ۲\times ۱۰^{-۳}M$ است که یک شیب بیش از ۱۰۰۰۰ برابری برقرار است. در همه سلول‌های ماهیچه، بالا رفتن غلظت Ca^{2+} سیتوزولی در ماهیچه قلبی شروع‌کننده انقباض است. با کاهش Ca^{2+} سیتوزولی عملکرد ناقل ناهمسوی Na^+/Ca^{2+}، قدرت انقباضی ماهیچه قلبی کاهش می‌یابد.

Na^+/K^+ ATPase در غشای پلاسمایی سلول‌های ماهیچه‌ای قلب مانند دیگر سلول‌های بدن شیب غلظت Na^+ لازم برای خروج Ca^{2+} توسط ناقل ناهمسوی Ca^{2+} که به Na^+ چسبیده است را ایجاد می‌کند. همان طور که قبلاً

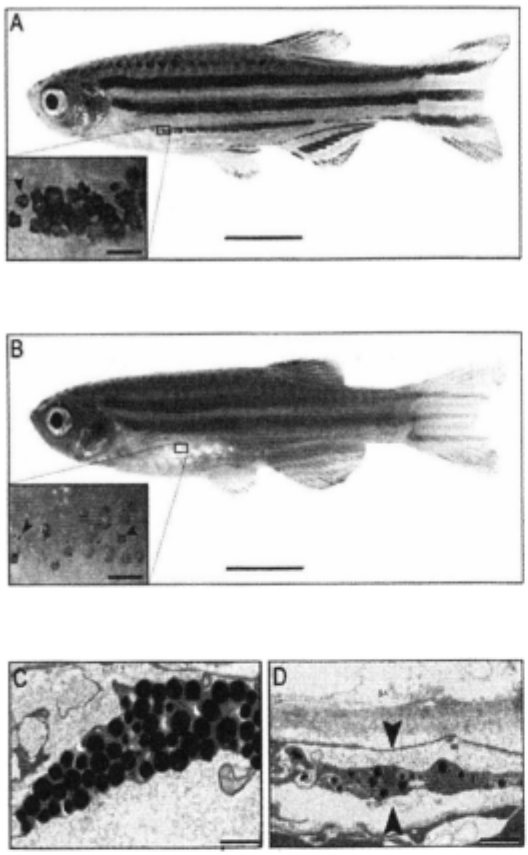


▲ **شکل ۲۶-۱۱ (شکل رنگی) ساختار سه بعدی از ناقل همسوی Leucin-۱ / Na^+-۲ از باکتری Aquifix maeolicus. (a)** پیوند L - لوسین و دو یون سدیم و یک یون کلرید به صورت مدل CPK به ترتیب در قسمت‌های زرد، ارغوانی و سبز نشان داده شده است. سه مارپیچ آلفای گذرنده از غشا که به Na^+ یا لوسین چسبیده‌اند به رنگ‌های قهوه‌ای، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند. (b) چسبیدن دو یون سدیم به اتم‌های اکسیژن کربونیل زنجیره اصلی یا اکسیژن‌های کربوکسیل زنجیره جانبی (قرمز) که قسمتی از مارپیچ ۱ (قهوه‌ای)، ۶ (آبی) یا ۸ (نارنجی) هستند. این مهم است که یکی از یون‌های سدیم (بالا) هم به گروه کربوکسیل لوسین انتقالی (زرد) متصل می‌شود.

ذکر شد مهار Na^+/K^+ ATPase توسط داروهای اوآباین و دیگوکسین غلظت K^+ سیتوزولی را کاهش می‌دهد و همان طور که در اینجا مناسب است به طور همزمان Na^+ سیتوزولی کاهش می‌یابد. کاهش شیب الکترو شیمیایی Na^+ در عرض غشا باعث می‌شود ناقل ناهمسوی Ca^{2+} که به Na^+ چسبیده است تمایل کمتری به ایفای نقش داشته باشد. در نتیجه یون‌های Ca^{2+} کمتر خارج می‌شوند و غلظت Ca^{2+} سیتوزولی افزایش می‌یابد و باعث می‌شود ماهیچه به طور قوی‌تری منقبض شود. داروهای اوآباین و دیگوکسین به علت قابلیتشان در افزایش دادن نیروی انقباضی عضله قلب که Na^+/K^+ ATPase را مهار می‌کنند به طور وسیع در درمان نارسایی قلب استفاده می‌شوند.

چندین ناقل هم انتقالی pH سیتوزول را تنظیم می‌کنند

محصول متابولیسم غیرهوازی گلوکز، اسید لاکتیک و محصول متابولیسم هوازی آن، CO_2 است که با H_2O ترکیب شده و اسید کربنیک (H_2CO_3) را تشکیل می‌دهد. این اسید ضعیف تفکیک شده و محصول آن یون‌های H^+ (پروتون‌ها) است. اگر این پروتون‌های اضافی از سلول‌ها حذف نشوند، pH سیتوزولی سریعاً افت می‌کند و عملکردهای سلولی به خطر می‌افتد. دو نوع پروتئین ناقل هم انتقالی به حذف تعدادی از پروتون‌های اضافی که در طی متابولیسم در سلول‌های جانوری تولید می‌شود کمک می‌کنند. یکی از از آنها ناقل ناهمسوی $Na^+HCO_3^-/Cl^-$ است که یک یون سدیم را همراه با HCO_3^- وارد می‌کند و در عوض یک یون Cl^- را خارج می‌کند. آنزیم سیتوزولی کربنیک انیدراز تفکیک یون‌های HCO_3^- به CO_2 و یون OH^- (هیدروکسیل) را کاتالیز می‌کند:



▲ **شکل۲۷-۱۱ (شکل رنگی) در ماهی زبرا جهش‌ها در ژن کدکننده تعویض‌گر کاتیونی به نام SLC24A5 باعث فنوتیپ رنگ پوست طلایی می‌شود.** دید جانبی نوع وحشی بالغ (a) و طلایی (b) در ماهی زبرا. ضمیمه‌ها نشان دهنده ملانوفورها می‌باشند. (پیکان‌ها) مقیاس‌های میله‌ای ۵mm (ضمیمه ۰/۵mm) جهش یافته‌های طلایی دارای ملانوفورهایی هستند که به طور میانگین کوچک‌تر، رنگ پریده‌تر و شفاف‌تر از نوع طبیعی‌اند و میکروگراف عبور الکترون در ملانوفورهای پوست در لاروهای نوع وحشی (c) و طلایی (d) نشان می‌دهد که ملانوفورهای پوست طلایی (پیکان‌های نشان داده شده در لبه‌ها) نازکترند و نسبت به نوع طبیعی ملانوزوم‌های کمتری دارند.

$$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2 + OH^-$$

یون‌های OH^- با پروتون‌های داخل سلولی ترکیب می‌شوند و آب تشکیل می‌شود و CO_2 به بیرون سلول منتشر می‌شود. بنابراین عمل کلی این ناقل مصرف یون‌های H^+ سیتوزولی و بدین وسیله افزایش pHسیتوزولی است. همچنین در افزایش pH سیتوزولی ناقل ناهمسوی Na^+/H^+ هم اهمیت دارد که ورود یک یون Na^+ به داخل سلول را در جهت شیب غلظتش با خروج یک یون H^+ همراه می‌کند.

pH سیتوزولی، تحت شرایط معین می‌تواند به بالاتر از حد نرمال ۷/۵-۷/۲ صعود کند. بسیاری از سلول‌های جانوری برای مقابله با یون‌های OH^- اضافی مربوط به pH بالا از یک ناقل ناهمسوی آنیونی که مبادله یک به یک HCO_3^- و Cl^- را در عرض غشای پلاسمایی کانالیز می‌کند استفاده می‌کنند. این ناقل ناهمسوی Cl^-/HCO_3^- در pH بالا، خروج HCO_3^- را (که به عنوان کمپلکس OH^- و CO_2 در نظر گرفته می‌شود) با ورود Cl^- مبادله می‌کند. بنابراین pH سیتوزول کاهش می‌یابد. ورود Cl^- در جهت شیب غلظتش (Cl^- سیتوزول < Cl^- محیط) نیروی محرکه انتقال را تأمین می‌کند.

فعالیت هر سه این پروتئین‌های ناقل ناهمسو به pH بستگی دارد و مکانیسم‌های وفق‌دهنده ظریفی را برای سلول‌ها فراهم می‌کنند تا pH سیتوزول را کنترل کنند. دو ناقل ناهمسو که برای‌افزایش pH سیتوزولی عمل می‌کنند وقتی pH سیتوزولی افت کند فعال می‌شوند. به طور مشابه، افزایش pH به بالای ۷/۲، ناقل ناهمسوی Cl^-/HCO_3^- را تحریک می‌کند و منجر به سریع‌تر شدن خروج HCO_3^- و کاهش pH سیتووزلی می‌شود. به این روش pH سیتوزولی سلول‌های در حال رشد بسیار نزدیک به pH ۷/۴ نگه داشته می‌شود.

یک پروتئین مبادله‌کننده کاتیونی مشهور نقش کلیدی در تکامل رنگی شدن پوست انسان بازی می‌کند

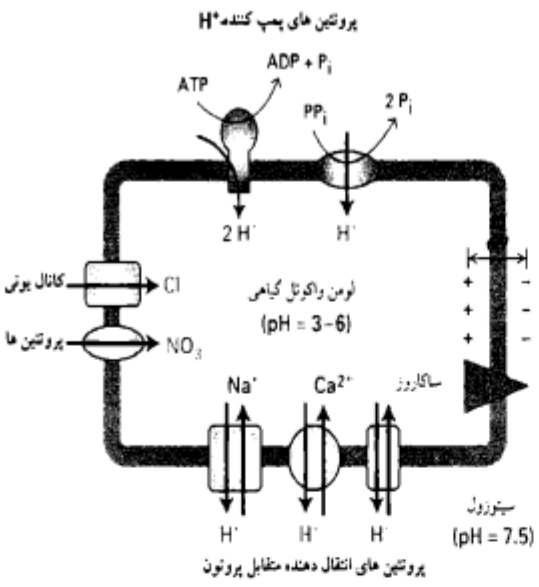
توالی ژنوم‌های انسان، موش و موش صحرایی حضور صدها پروتئین انتقالی مشهور را نشان می‌دهد ولی عملکرد اغلب آنها هنوز ناشناخته است. یک ناقل انسانی خاص جالب به نام SLC24A5 از مطالعه ماهی زبرا که دارای رنگ پوست غیرطبیعی است مشخص شده است. در ماهی هموزیگوت جهش یافته طلایی، خط‌های افقی سیاه مشخص خیلی کم‌رنگ بودند (شکل ۲۷a,b-۱۱). با میکروسکوپ نشان داده شد که ماهی جهش یافته دارای مقدار کمتری رنگ دانه سیاه به نام ملانین است و وزیکول‌های ملانین که ملانوزوم نامیده می‌شوند کوچک‌تر و کم رنگ‌تر از نوع طبیعی بودند. (شکل ۲۷c,d-۱۱). کلون کردن ژن طلایی نشان داد که آن یک پروتئین مبادله‌کننده کاتیونی مشهور به نام SLC24A5 را کد می‌کند. مطالعات ایمونوفلورسانس نشان داد که این پروتئین در غشاهای داخل سلولی و احتمالاً ملانوزوم یا پیش‌سازهای آن یافت می‌شوند. اما یون‌های منتقل شده توسط SLC24A5 هنوز شناخته

نشده‌اند. از آنجایی که توالی اسیدهای آمینه در پروتئین SLC24A5 به ناقل ناهمسوی سدیم - کلسیم نزدیک است پس پروتئین فوق، احتمالاً یک ناقل ناهمسوی سدیم - کلسیم است.

به طور قابل توجهی دانشمندان نشان دادند که توالی نسخه انسانی SLC24A5 به میزان بالایی با توالی پروتئین ماهی زبرا مشابه است. وقتی پروتئین انسانی در ماهی زبرای طلایی جهش یافته بیان شود فنوتیپ جهش یافته را تکمیل می‌کند و ماهی دارای خط‌های سیاه طبیعی می‌شود. بیشتر از نظر تکاملی شکل حفاظت شده ژن یا آلل باعث شباهت بیشتر به ژن نوع وحشی زبرا می‌شود که در جمعیت‌های انسانی سیاه پوست آفریقا و آسیای شرقی غالب است. در مقابل تصور می‌شود یک نسخه یا آلل‌های متفاوت از ژن SLC24A5 با یک اسید آمینه منفرد تغییر یافته، پروتئینی با فعالیت کمتر را کد می‌کند که تقریباً در همه مردم مناطق اروپا یافت می‌شود. مطالعه فراوانی آلل‌ها در جمعیت‌های آمیخته نشان می‌دهد که اشکال مختلف یا پلی‌مورفیسم‌ها در این ناقل کاتیونی، یک نقش کلیدی در تعیین تیرگی رنگ پوست انسان بازی می‌کنند. به طور واضح، نیاز به درک زیاد در مورد نقش این ناقل‌ها در فیزیولوژی سلولی است و این که چگونه یک جهش نقطه‌ای منفرد در این ژن دلیلی موجّه برای اختلاف زیاد در مشخصات رنگی پوست افراد مناطق اروپا، آفریقا و آسیاست.

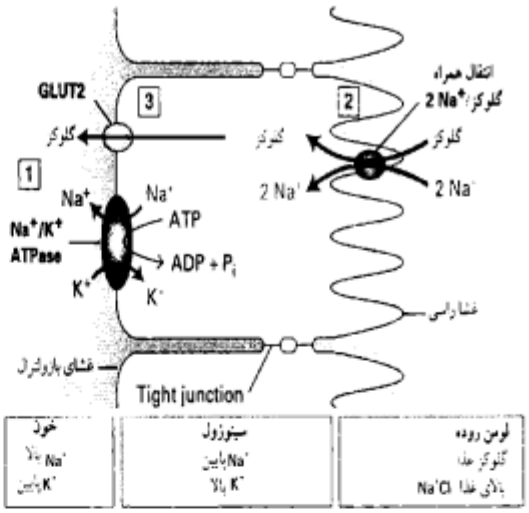
تعدادی پروتئین انتقالی واکوئل‌های گیاهی را قادر به تجمع متابولیت‌ها و یون‌ها می‌سازند

لومن واکوئل‌های گیاهی (pH = ۳ - ۶) اسیدی‌تر از سیتوزول (pH = ۷/۵) است. اسیدیته واکوئل توسط پمپ‌های پروتونی استفاده کننده از ATP که به گروه V متعلقند (شکل ۹-۱۱ را ملاحظه کنید) و توسط پمپ استفاده کننده از پیروفسفات که فقط در گیاهان وجود دارد حفظ می‌شود. دو عدد از این پمپ‌ها که در غشای واکوئلی قرار گرفته‌اند یون‌های H^+ را بر خلاف شیب غلظت لومن واکوئل وارد می‌کند. همچنین غشای واکوئلی شامل کانال‌های Cl^- و NO_3^- است که این آنیون‌ها را از سیتوزول به واکوئل منتقل می‌کند. ورود این آنیون‌ها بر خلاف شیب غلظت شان توسط پتانسیل مثبت داخلی که توسط پتانسیل مثبت داخلی تولید شده توسط پمپ‌های H^+ به دست می‌آید. عملکرد ترکیبی این پمپ‌های پروتونی و کانال‌های آنیونی باعث تولید پتانسیل الکتریکی مثبت داخلی در حدود ۲۰mV در عرض غشای واکوئلی و همچنین شیب pH قابل توجه می‌گردد (شکل ۲۸-۱۱).



▲ **شکل ۲۸-۱۱ (شکل رنگی) تغلیظ ساکاروز و یون‌ها توسط واکوئل‌های گیاهی.** غشای واکوئلی شامل دو نوع پمپ پروتونی است (نارنجی): یک H^+ ATPase متعلق به گروه V (چپ) و یک پمپ‌پروتونی هیدرولیز کننده پیرو فسفات (راست) که از انواع دیگر پروتئین‌های انتقال دهنده یونی متفاوت بوده و احتمالاً منحصر به گیاهان است. این پمپ‌ها یک pH لومنی پایین و پتانسیل الکتریکی داخلی مثبت را در طول غشای واکوئلی توسط پمپ کردن یون‌های H^+ به داخل تولید می‌کنند. پتانسیل مثبت داخلی نیروی حرکت Cl^- و NO_3^- را از سیتوزول از طریق پروتئین‌های کانالی مجزا (ارغوانی) تأمین می‌کنند. انتقال ناهمسوی پروتون (سبز) توسط شیب H^+ و تجمع Na^+ و Ca^{2+} و ساکاروز در داخل واکوئل تقویت می‌شود.

شیب الکتروشیمیایی پروتون در طول غشای واکوئل‌های گیاهی در بیشتر موارد همان روشی را که شیب الکترو شیمیایی Na^+ در طول غشای پلاسمایی سلول‌های جانوری تولید می‌شود مورد استفاده قرار می‌دهند تا نیروی جذب انتخابی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های کوچک توسط ناقل ناهمسوی تأمین شود. برای مثال در برگ ساکاروز اضافی تولید شده در طول فتوسنتز در طی روز در واکوئل ذخیره می‌شود. در طول شب ساکاروز ذخیره شده به داخل سیتوپلاسم حرکت می‌کند و به CO_2 و H_2O متابولیزه می‌شود که همراه با تولید ATP از ADP و Pi است. یک ناقل ناهمسوی پروتون / ساکاروز در غشای واکوئل برای تجمع ساکاروز در واکوئل‌های گیاهی فعالیت می‌کند. حرکت به سمت داخل ساکاروز توسط حرکت به سمت خارج H^+ تقویت می‌شود که حرکت به سمت خارج H^+ به دلیل شیب غلظتش (سیتوزول < لومن) و همچنین



▲ **شکل ۲۹-۱۱ انتقال ترانس سلولی گلوکز از لومن روده به داخل خون.** Na^+/K^+ ATPase در سطح بازولترال غشا شیب غلظت Na^+ و K^+ را تولید می‌کند (مرحله ❶). حرکت یون‌های K^+ به سمت خارج از طریق کانال‌های K^+ بدون دریچه (نشان داده نشده است) یک پتانسیل غشایی منفی را در داخل ایجاد می‌کند. شیب غلظت Na^+ و پتانسیل غشا برای پیشرفت جذب گلوکز از لومن روده مورد استفاده قرار می‌گیرد که توسط هم انتقالگر گلوکز ۱/Na^+-۲ که در غشای سطح رأسی قرار گرفته است انجام می‌شود (مرحله ❷). گلوکز سلول را از طریق انتشار تسهیل شده که توسط GLUT2 کاتالیز می‌شود ترک می‌کند. GIUT2 یک ناقل تکی گلوکز است که در غشای بازولترال قرار گرفته است (مرحله ❸).

پتانسیل سیتوزولی منفی در عرض غشای واکوئلی مطلوب است (شکل ۲۸-۱۱ را ملاحظه کنید). جذب Ca^{2+} و Na^+ از سیتوزول به داخل واکوئل بر خلاف شیب غلظتشان به طور مشابه با واسطه ناقل ناهمسوی پروتون صورت می‌گیرد.

درک پروتئین‌های انتقالی در غشاهای واکوئل‌های گیاهی توانی برای‌افزایش محصولات کشاورزی در خاک‌های با نمک بالا (NaCl) که در سراسر جهان یافت می‌شوند می‌باشد. به دلیل این که میوه‌هایی که از نظر کشاورزی مفیدند در این قبیل خاک‌های شور قادر به رشد نیستند. دانشمندان علم کشاورزی تلاش‌های زیادی را برای رشد گیاهان مقاوم به نمک توسط روش‌های مقاوم سازی سنتی انجام داده‌اند. امروزه محققان با استفاده ژن‌های کلون شده که ناقل ناهمسوی Na^+/H^+ واکوئلی را کد می‌کنند توانسته‌اند گیاهان ترانس ژنیک تولید کنند که به میزان زیادی این پروتئین‌های انتقالی را بیان می‌کنند و جدا سازی Na^+ در واکوئل افزایش می‌یابد. برای مثال گیاهان گوجه‌ای ترانس ژنیک که به میزان زیادی ناقل ناهمسوی Na^+/H^+ را بیان می‌کند قادر به رشد، گلدهی و تولید میوه در خاک‌های دارای NaCl هستند که این غلظت NaCl برای گیاهان نوع وحشی کشنده است. نکته جالب این است که با وجود این که برگهای این گوجه‌های تراس ژنیک مقدار زیادی نمک را انباشته می‌کنند اما میوه‌های آنها دارای محتوای نمکی خیلی کمی هستند.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۱

هم‌انتقالی توسط ناقلین همسو و ناهمسو

■ ناقلین هم‌انتقال از انرژی حاصل از حرکت یک یون (معمولاً H^+ یا Na^+) در جهت شیب الکتروشیمیایی برای ورود یا خروج مولکول‌های کوچک یا یونهای مختلف برخلاف شیب غلظتی شان استفاده می‌کنند.

■ سلول‌های پوشانندهٔ رودهٔ کوچک و توبول‌های کلیه پروتئین‌های هم‌انتقالی را بیان می‌کنند که ورود Na^+ مطلوب از نظر انرژیتیکی را با ورود گلوکز و اسیدهای آمینه در جهت خلاف شیب غلظتی آنها جفت می‌کنند (شکل ۲۵-۱۱ را ملاحظه کنید).

■ ساختار مولکولی ناقل همسوی Na^+-اسید آمینه در باکتریها چگونگی جفت‌شدن اتصال Na^+ و لوسین و انتقال حداسطها را بدون اینکه پیوندهای سوبسترا به بیرون از پروتئین منتشر شوند را آشکار می‌سازد.

■ در سلولها عضلهٔ قلب، خروج Ca^{2+} با ورود Na^+ توسط ناقل ناهمسونی کاتیونی جفت می‌شود که ۳ یون Na^+ را به ازای خروج هر Ca^{2+} وارد سلول می‌کند.

■ با ایجاد جهش‌های در ماهی زبرا و پلی‌مورفیسم در انسان مشخص شده که ناقل ناهمسوی سدیم/کلسیم SLC24A5 نقش مهمی را در تولید گرانول ملانین و در تنظیم وضعیت پیگمانتاسیون انسان دارد.

■ دو ناقل ناهمسوی فعال شونده در pH پایین، به حفظ pH سیتوزول نزدیک ۷/۴ علی‌رغم تولید متابولیکی اسیدهای کربونیک و لاکتیک در سلول‌های حیوانی کمک می‌کند. یکی از اینها، ناقل ناهمسوی Na^+/H^+ است که پروتون‌های اضافی را خارج می‌کند و دیگری ناقل Na^+HCO3^-/Cl^- که $HCO3^-$ را وارد کرده که در سیتوزول تفکیک شده و با

افزایش یونهای OH^-، pH را متعادل می‌کند.

- ناقل ناهمسوی $Cl^-/HCO3^-$ که در pH بالا فعال می‌شود $HCO3^-$ را به هنگام بالارفتن pH سیتوزول خارج کرده و در نتیجه pH را کاهش می‌دهد.
- جذب سوکروز، Na^+، Ca^{2+} و سایر مواد به واکوئلهای گیاهی توسط ناقلین ناهمسوی پروتون در غشای واکوئل صورت می‌گیرد. کانالهای یونی و پمپهای پروتونی در غشاء برای تولید شیب‌های غلظتی بالا و کافی از پروتون به منظور تجمع یونها و متابولیت‌های در واکوئلها توسط این ناقلین ناهمسوی پروتونی حیاتی هستند.

۶-۱۱ انتقال ترانس اپیتلیالی

در قسمت‌های قبلی توضیح دادیم که چگونه چندین نوع از ناقل‌ها با همدیگر برای انجام عملکردهای سلولی مهم همکاری می‌کنند (شکل ۲-۱۱ را ملاحظه کنید). در اینجا ما مفاهیم را با تمرکز روی انتقال چند نوع مولکول و یون در عرض لایه‌های شبه صفحه‌ای سلول‌های اپی‌تلیال که سطح داخلی و خارجی اغلب اندام‌های بدن را می‌پوشانند ادامه می‌دهیم. یک سلول روده‌ای، شبیه همه سلول‌های اپی‌تیال **قطبی**[1] است زیرا غشای پلاسمایی آنها حداقل در دو منطقه مجزا سازماندهی شده است. در اینجا، لومن روده، رأس[2] یا قسمت بالایی یا سطحی نامیده می‌شود. و سطحی که با سمت داخل موجود، مواجه است سطح بازولترال[3] نامیده می‌شود. (شکل ۹-۱۹ را ملاحظه کنید).

مناطق خاصی از غشای پلاسمایی سلول اپیتلیال که **اتصالات سلولی**[4] نامیده می‌شود، سلول‌ها را به هم متصل می‌کند و استحکام و سختی را برای صفحات سلولی فراهم می‌کند. (شکل ۹-۱۹ را برای جزئیات ببینید). یکی از این اتصالات سلولی (اتصالات محکم[5]) به طور ویژه ای جذابند. اتصالات محکم مانع عبور بسیاری از مواد قابل حل در آب در یک طرف اپیتلیال به طرف دیگر از طریق فضای داخل سلولی بین سلول‌ها می‌شوند و به همین دلیل جذب مواد غذایی از لومن روده به داخل خون توسط فرایند دو مرحله‌ای به نام انتقال ترانس سلولی[6] رخ می‌دهد: مولکول‌های غشای پلاسمایی روی طرف رأسی سلول‌های اپی‌تلیال روده وارد می‌شوند و از طریق غشای پلاسمایی روی سطحی که به طرف خون است (بازولترال یا سروزی[7]) خارج می‌شوند (شکل ۲۹-۱۱). قسمت رأسی غشای پلاسمایی که به طرف لومن روده است، برای جذب قندها، اسیدهای آمینه و دیگر مولکول‌هایی که توسط آنزیم‌های گوارشی متعدد از غذا تولید می‌شوند اختصاصی‌اند. تعدادی برآمدگی‌های انگشت مانند (در ابعاد ۱۰۰nm) به نام میکروویلی[8] منطقه سطح رأسی را به میزان زیادی افزایش می‌دهند و تعداد پروتئین‌های انتقالی آن هم افزایش می‌یابد و باعث افزایش ظرفیت جذب سلولی می‌شود.

چندین پروتئین انتقالی برای حرکت گلوکز و اسیدهای آمینه از طریق اپی‌تلیال مورد نیازند

شکل ۲۹-۱۱ نشان‌دهنده پروتئین‌هایی است که جذب گلوکز از لومن روده به داخل خون را وساطت می‌کنند و این مفهوم را که انواع مختلف پروتئین‌ها در غشای رأسی بازولترال سلول‌های اپیتلیال متمرکز شده‌اند را شرح می‌دهد. در مرحله اول این فرایند یک ناقل ناهمسوی‌گلوکز ۱/Na^+-۲ که در غشای میکرو ویلی‌ها قرار گرفته است گلوکز را بر خلاف شیب غلظتش از لومن روده از طریق سطح رأسی سلول‌های اپی‌تلیال وارد می‌کند. همان طور که در بالا ذکر شد این ناقل همسو حرکت به سمت داخل یک ملکول گلوکز را که از نظر انرژی مطلوب نیست با حرکت به سمت داخل دو یون Na^+ که از نظر انرژی مطلوب است جفت می‌کند. (شکل ۲۵-۱۱ را ملاحظه کنید). در مرحله پایا[9] همه یون‌های Na^+ از لومن روده به داخل سلول در طول ناقل همسوی گلوکز - سدیم یا فرایند مشابه ناقل همسوی اسید آمینه - سدیم منتقل می‌شوند که از طریق غشای بازولترال که در برخورد با بافت لایه زیرین است به بیرون پمپ می‌شوند. بنابراین کم بودن غلظت داخل سلولی Na^+ حفظ می‌شود. Na^+/K^+ ATPase منحصراً در غشای بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال روده یافت می‌شود. عملکرد هماهنگ این دو پروتئین انتقالی باعث حرکت سر بالایی گلوکز و اسیدهای آمینه از روده به داخل سلول می‌شود. نیروی این مرحله در انتقال ناقل سلولی سرانجام توسط هیدرولیز توسط Na^+/K^+ ATPase تأمین می‌شود.

در مرحله دوم، گلوکز و اسیدهای آمینه تغلیظ شده در داخل سلول‌های روده که توسط ناقل همسو صورت گرفته است در جهت شیب غلظت شان از طریق پروتئین‌های انتقال دهنده تکی در غشای بازولترال به داخل خون وارد می‌شوند. در مورد گلوکز، این حرکت

1- Polarized
2- Apical
3- Basolateral
4- Cell junction
5- Tight junction
6- Transcellular transport
7- Serosal
8- Microvilli
9- Steady state

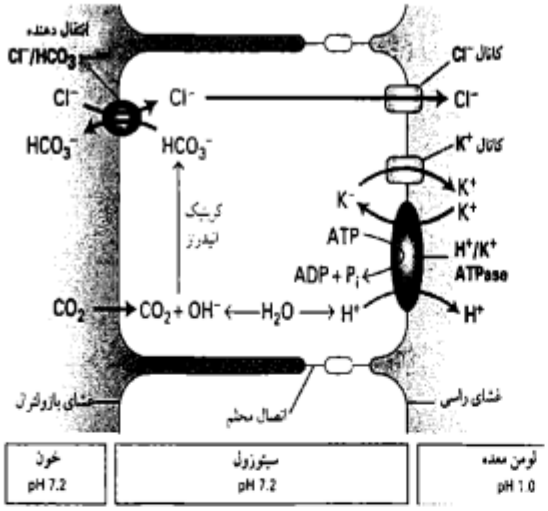
توسط GLUT2 وساطت می‌شود (شکل ۲۹-۱۱ را ملاحظه کنید). همان طور که قبلاً ذکر شد این ایزوفورم GLUT دارای میل ترکیبی نسبتاً کمی به گلوکز است، اما سرعت انتقالش در مواقعی که شیب گلوکز در عرض غشا افزایش یابد به طور اساسی افزایش می‌یابد (شکل ۴-۱۱ را ملاحظه کنید).

نتیجه کلی این فرایند دو مرحله‌ای حرکت یون‌های Na^+، گلوکز و اسیدهای آمینه از لومن روده در طول اپی‌تلیال روده به داخل محیط خارج سلولی است. اتصالات محکم بین سلول‌های اپیتلیال مانع می‌شوند تا این مولکول‌ها در جهت عکس به داخل لومن روده انتشار یابند و سرانجام آنها به داخل خون حرکت می‌کنند. افزایش‌فشار اسمزی به وسیله انتقال ناقل غشایی نمک، گلوکز و اسیدهای آمینه در طول اپیتلیال روده ایجاد می‌شود و آب را از لومن روده به داخل محیط خارج سلولی که سطح بازولترال را احاطه کرده است می‌کشد. به طور خلاصه، نمک‌ها، گلوکز و اسیدهای آمینه همراه خودشان آب را هم منتقل می‌کنند.

درمان ساده بازجذب مجدد به شیب اسمزی ایجاد شده توسط گلوکز و Na^+ بستگی دارد

مفهوم اسمز و جذب روده‌ای نمک و گلوکز پایه‌ای را برای درمان ساده تشکیل داده است که باعث زنده ماندن میلیون‌ها نفر در سال مخصوصاً در کشورهای که کمتر توسعه یافته می‌شود. در بعضی کشورها وبا و دیگر پاتوژن‌های روده‌ای علت اصلی مرگ کودکان هستند. سم رها شده از باکتری، جذب کلر توسط سلول‌های اپی‌تلیال روده را به داخل لومن فعال می‌کند و به دنبال آن از نظر اسمزی آب حرکت می‌کند و در نتیجه حجم زیادی از آب به دلیل اسهال دفع می‌شود و باعث از دست دادن آب و سرانجام مرگ می‌شود. نوعی معالجه ادعا دارد که نه تنها باکتری را با آنتی بیوتیک می‌کشد بلکه آبگیری مجدد باید جایگزین آبی شود که از خون و دیگر بافت‌ها دفع شده است.

نوشیدن آب به سادگی نمی‌تواند کمکی کند زیرا اغلب به محض ورود از قسمت روده‌ای - معده‌ای دفع می‌شود. بنابراین همان طور که ما آموختیم ناقل همسوی گلوکز و Na^+ از طریق اپی تلیوم روده یک شیب اسمزی اپی‌تلیالی را به وجود می‌آورد و باعث پیشرفت حرکت آب از لومن در عرض لایه سلولی و سرانجام به داخل خون می‌شود. بنابراین محلول قندی نمکی برای نوشیدن بچه‌ها موثر است و باعث جریان اسمزی آب از لومن روده به داخل خون و آبگیری مجدد می‌شود. محلول‌های قندی - نمکی مشابه مبنایی برای استفاده ازنوشیدنیهای محبوب توسط ورزشکاران هستند که برای تأمین نمک و آب به داخل بدن سریع‌تر و کار آمدترند.



▲ **شکل ۳۰-۱۱ اسیدی شدن لومن معده توسط سلول‌های جداری غشای رأسی آستر معده.** سلول‌های جداری حاوی H^+/K^+ ATPase (پمپ گروه P) و پروتئین‌های کانالی Cl^- و H^+ می‌باشند. به چرخه انتقال K^+ از طریق غشای رأسی توجه کنید. یون‌های K^+ توسط H^+/K^+ ATPase به داخل پمپ می‌شوند و از طریق کانال K^+ خارج می‌شوند. غشای بازولترال حاوی یک ناقل ناهمسوی آنیونی است که یون‌های HCO_3^- و Cl^- را مبادله می‌کند. عملکرد ترکیبی این چهار پروتئین انتقالی مختلف و کربنیک انیدراز، لومن معده را اسیدی می‌کند در حالی که pH سیتوزول به صورت خنثی حفظ می‌شود و از نظر الکتریکی نیز خنثی بودن آن حفظ می‌شود.

سلول‌های جداری[1] محتوای معده را اسیدی می‌کنند در حالی که pH سیتوزول را خنثی نگه می‌دارد

معده پستانداران حاوی محلول ۰/۱M هیدروکلریک اسید (HCl) است. این محیط اسیدی قوی بسیاری از پاتوژن‌های گوارشی را می‌کشد و بسیاری از پروتئین‌های گوارشی را قبل از این که آنها توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک (مثل پپسین) که در pH اسیدی فعالند تجزیه شوند دناتوره می‌کند. هیدروکلریک اسید توسط سلول‌های اپی‌تلیالی ویژه به نام سلول‌های جداری (به سلول‌های اکسینتیک[2] هم معروف است) در آستر معده به درون

1- Parietal cells 2- Oxyntic

معده ترشح می‌شوند. این سلول‌ها حاوی H^+/K^+ ATPase در غشای رأسی‌شان هستند که در تماس با لومن معده است و شیب غلظت H^+ را میلیون‌ها برابر تولید می‌کند. pH=۱ در لومن معده در مقابل pH=۷ در سیتوزول دیده می‌شود. این پروتئین انتقالی یک پمپ یونی مصرف کننده ATP از گروه P است و از لحاظ ساختار و عملکرد به Na^+/K^+ ATPase غشای پلاسمایی که قبلاً بحث شد شبیه است. تعدادی میتوکندری در سلول‌های جداری، ATP فراوانی را برای استفاده H^+/K^+ ATPase تولید می‌کنند.

اگر سلول‌های جداری به سادگی ورود یون‌های H^+ را با یون K^+ مبادله کنند از دست رفتن پروتون باعث افزایش غلظت یون‌های OH^- در سیتوزول می‌شود و بنابراین به طور قابل توجهی pH سیتوزولی افزایش می‌یابد. (یاد آوری می‌کنیم که $[H^+][OH^-]$ همیشه مقدار ثابت $10^{-14}M^2$ است). سلول‌های جداری با افزایش pH سیتوزولی در رابطه با اسیدی شدن لومن معده مقابله می‌کنند. این کار را با استفاده از ناقل ناهمسوی Cl^-/HCO_3^- که در غشای بازولترال قرار گرفته است انجام می‌دهند و برای خارج کردن یون OH^- اضافی از سیتوزول به خون عمل می‌کنند. همان طور که قبلاً ذکر شد این ناقل ناهمسوی آنیونی در pH بالای سیتوزولی فعال می‌شوند.

فرایند کلی اسیدی کردن لومن معده توسط سلول های جداری در شکل ۳۰-۱۱ شرح داده شده است. در یک واکنش که توسط کربنیک انیدراز کاتالیز می‌شود OH^- اضافی سیتوزولی با CO_2 که از خون منتشر شده است ترکیب می‌شود و HCO_3^- تشکیل می‌شود. با عمل کاتالیزوری ناقل ناهمسوی آنیونی در بازولترال، این یون بی‌کربنات از طریق غشای بازولترال خارج (و سرانجام به خون می‌رود) و با یون Cl^- مبادله می‌شود. سپس یون‌های Cl^- از طریق کانال‌های Cl^- در غشای رأسی خارج شده و وارد لومن معده می‌شوند. برای محافظت از خنثی بودن الکتریکی، وارد شدن هر یون Cl^- از طریق غشای رأسی به داخل لومن معده با یک K^+ از طریق یک کانال پتاسیمی مجزا که به سمت خارج حرکت می‌کند همراه می‌شود. در این مسیر یون‌های K^+ اضافی توسط H^+/K^+ ATPase به داخل پمپ می‌شوند و به لومن معده بر می‌گردند. بنابراین غلظت K^+ داخل سلولی در حد طبیعی نگه داشته می‌شوند. نتیجه کلی، ترشح مقادیر برابر از یون‌های H^+ و Cl^- (یعنی HCl) به داخل لومن معده است در صورتی که pH سیتوزول خنثی باقی می‌ماند و یون‌های OH^- اضافی به صورت HCO_3^- به داخل خون منتقل می‌شوند.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۱

انتقال ترانس اپی‌تلیالی

- قسمتهای رأسی و بازولترال غشای پلاسمایی سلولهای اپی‌تلیال حاوی پروتئین‌های انتقالی مختلفی بوده و از مکانیسم‌های انتقالی مختلفی استفاده می‌کنند.
- در سلولهای اپی‌تلیال روده، عملکرد هماهنگ ناقلین همسوی وابسته به Na^+ در غشای رأسی با ATPase Na^+/K^+ و تک‌انتقالی‌ها در غشای بازولترال، انتقال ترانس اپی‌تلیالی اسیدهای آمینه و گلوکز را از لومن روده به خون وساطت می‌کند (شکل ۲۹-۱۱ را ملاحظه کنید).
- عملکرد هماهنگ کربونیک آنیدراز و چهار پروتئین انتقالی مختلف به سلولهای اصلی معده کمک می‌کنند تا HCl را به لومن معده ترشح کنند در حالیکه pH سیتوزولی این سلولها در حد طبیعی نگه داشته می‌شود (شکل ۳۰-۱۱ را ملاحظه کنید).

چشم اندازی به آینده

در این فصل ما عمل پروتئین‌های انتقالی غشایی ویژه و فشردگی‌شان در طرح‌های فیزیولوژی انسانی را شرح دادیم. این قبیل نزدیکی‌های فیزیولوژی انسانی دارای کاربردهای پزشکی زیادی است. حتی امروزه مهار کننده‌ها و فعال کننده‌های اختصاصی کانالها، پمپ‌ها و ناقل‌ها بزرگترین گروه منفرد داروها را تشکیل می‌دهند. برای مثال یک مهار کننده H^+/K^+ ATPase معدی، که این ATPase معده را اسیدی می‌کند، دارویی است که اغلب به طور وسیع برای درمان زخم معده و سندرم رفلکس معدی استفاده می‌شود. مهار کننده‌های پروتئین کانالی در کلیه به طور وسیع برای کنترل فشار خون (فشار خون بالا) استفاده می‌شود. این داروها با مسدود کردن جذب آب از ادرار تشکیل شده به داخل خون، حجم خون و بنابراین فشار خون را کاهش می‌دهند. مسدود کننده‌های کانال‌های کلسیمی برای کنترل شدن انقباض قلب به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. داروهایی که کانال پتاسیم خاصی را در سلول‌های جزیره β مهار می‌کنند ترشح انسولین را افزایش می‌دهند. (شکل ۳۲-۱۵ را ملاحظه کنید) و برای درمان دیابت بزرگسالان (نوع II) به طور وسیع استفاده می‌شوند.

با تکمیل پروژه ژنوم انسانی توالی همه پروتئین‌های انتقالی غشای انسانی را تعیین موقعیت کرده‌ایم. هم اکنون می‌دانیم که جهش در بسیاری از آنها باعث بیماری می‌شود. مثلاً فیبروز

سیستیک به دلیل جهش در CFTR به وجود می‌آید. این پیشرفت‌های دانش پایه، محققان را قادر به تعیین انواع جدیدی از ترکیباتی کرده است که فقط یکی از این پروتئین‌های انتقالی غشا را مهار یا فعال می‌کند و روی همولوگ‌های آنها تاثیری ندارد. بنابراین یک چالش مهم فهمیدن نقش یک پروتئین انتقالی منفرد در هر یک از چندین بافتی است که در آنها بیان می‌شود.

دیگر چالش‌های اصلی درک چگونگی تنظیم هر کانال، ناقل و پمپ برای بر طرف کردن نیازهای سلول است. بسیاری از این پروتئین‌ها، مشابه دیگر پروتئین‌های سلولی، فسفریلاسیون و یوبیکوئیتیناسیون و دیگر تغییرات کووالانسی برگشت‌پذیر را طی می‌کنند که فعالیتشان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اما در اکثر موارد ما از اینکه چگونه این تنظیمات، عملکردهای سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند اطلاعی نداریم. بسیاری از کانال‌ها، ناقل و پمپ‌ها به صورت طبیعی روی غشاهای داخل سلولی مستقرند و روی غشای پلاسمایی نیستند و تنها وقتی یک هورمون خاص حضور داشته باشد به سمت غشای پلاسمایی حرکت می‌کنند. برای مثال اضافه کردن انسولین به ماهیچه باعث می‌شود ناقل گلوکز GLUT4 از غشاهای داخل سلولی به غشای پلاسمایی حرکت کند و سرعت جذب گلوکز افزایش می‌یابد. ما قبلاً گفتیم که اضافه کردن وازوپرسین به سلولهای معینی از کلیه به طور مشابه باعث می‌شود یک آکواپورین به غشای پلاسمایی منتقل شود و سرعت انتقال آب افزایش می‌یابد. اما با وجود تحقیقات فراوان، مکانیسم‌های سلولی واقعی که هورمون‌ها به وسیله آنها حرکت پروتئین‌های انتقالی را به درون یا بیرون غشای پلاسمایی تحریک می‌کنند ناشناخته باقی مانده است.

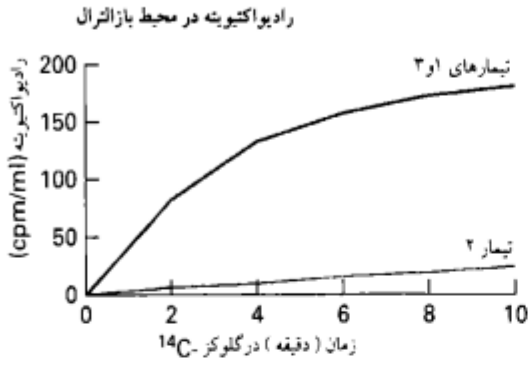
تجزیه و تحلیل داده‌ها

تصور کنید که انتقال اپی‌تلیالی گلوکز رادیواکتیو را بررسی می‌کنید. سلول‌های اپی‌تلیال روده در محیطی به شکل یک صفحه کامل رشد کرده است که مایع شست و شو دهندهٔ دُمین رأسی سلول‌ها (محیط رأسی) کاملاً از مایع شست و شو دهندهٔ دُمین بازولترال سلول‌ها (محیط بازولترال) مجزاست. گلوکز رادیواکتیو (^{14}C نشاندار) به محیط رأسی اضافه می‌شود و ظهور رادیواکتیویته در محیط بازولترال به صورت شمارش در هر میلیمتر (cpm/mL) به تصویر کشیده می‌شود و رادیواکتیویته در هر واحد حجم اندازه‌گیری می‌شود.

تیمار ۱: هر یک از محیط‌های رأسی و بازولترال شامل mM ۱۵۰Na^+ است (منحنی ۱).

تیمار ۲: محیط رأسی شامل ۱mM Na^+ و محیط بازولترال شامل ۱۵۰mM Na^+ است (منحنی ۲).

تیمار ۳: محیط رأسی شامل ۱۵۰mM Na^+ و محیط بازولترال شامل ۱mM Na^+ است (منحنی ۳).

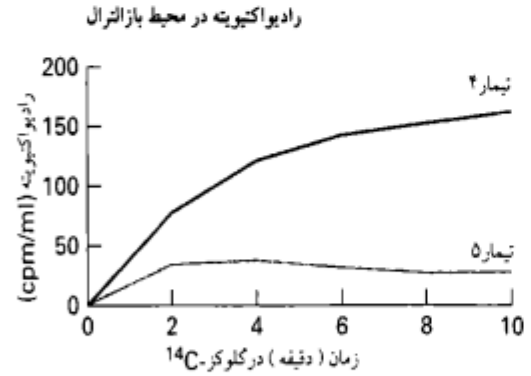


a) توضیح احتمالی نتایج مختلف به دست آمده در تیمارهای ۱ و ۳ در مقابل تیمار ۲ چیست؟

با مطالعات اضافی دارویی، اوآباین که Na^+/K^+ ATPase را مهار می‌کند اضافه شده است.

تیمار ۴: محیط رأسی و بازولترال شامل ۱۵۰mM Na^+ و محیط رأسی شامل اوآباین است (منحنی ۴).

تیمار ۵: محیط رأسی و بازولترال شامل ۱۵۰mM Na^+ و محیط بازولترال شامل اوآباین است. (منحنی ۵).

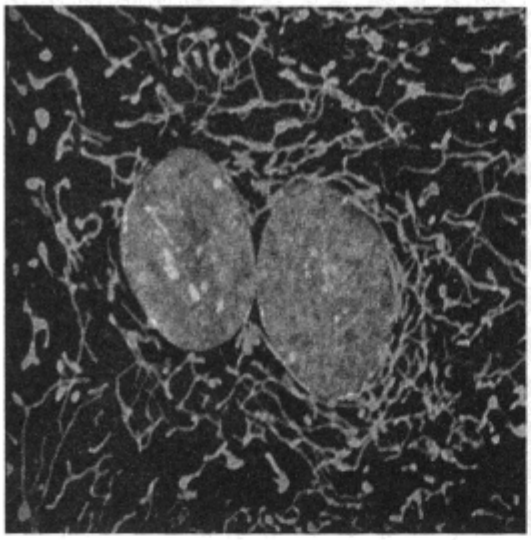


b) توضیح احتمالی برای نتایج مختلف به دست آمده در تیمار ۴ در مقابل تیمار ۵ چیست؟

c) تعدادی از سلول‌های اپی‌تلیال استفاده شده در مطالعات بالا، مهندسی شده‌اند به طوری که در غشای بازولترال آن GLUT1 بیش از GLUT2 بیان شده است. این سلول‌های مهندسی شده ضخامت کمتری از سلول‌های جداری را نشان داده‌اند و به مدت طولانی در محیط کشت زنده نمانده‌اند. دلیل منطقی این یافته چیست؟

فصل ۱۲

انرژیتیک سلولی



(شکل رنگی) میکروگراف ایمونوفلورسانس، شبکه دوتایی میتوکندری‌های (قرمز) سلول تخمدان بز کوهی Himalayan Tahr را نشان می‌دهد. هسته‌های دوقلوی غیرطبیعی موجود در این سلول به رنگ آبی دیده می‌شود.

رئوس مطالب

۱۲.۱ مراحل اولیه کاتابولیسم گلوکز و اسید چرب: گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک

۱۲.۲ زنجیره انتقال الکترون و ایجاد نیروی محرکه پروتونی

۱۲.۳ جفت شدن نیروی محرکه پروتون با فرایندهای انرژی‌خواه

۱۲.۴ فتوسنتز و رنگیزه‌های جذب‌کننده نور

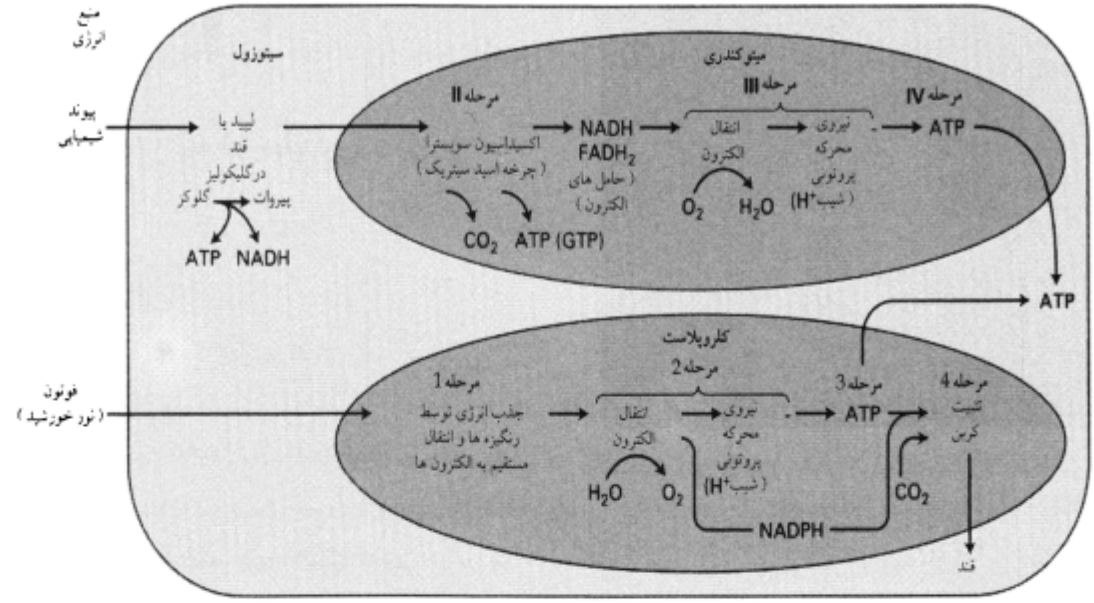
۱۲.۵ آنالیز مولکولی فتوسیستم‌ها

۱۲.۶ متابولیسم CO_2 در فتوسنتز

از رشد و تقسیم یک سلول تا تپیدن قلب و فعالیت الکتریکی یک نورون، انرژی لازم است. سلول‌ها سیستم‌های پیچیده‌ای می‌باشند که در آنها چندین واکنش شیمیایی و فرایندهای انتقالی به‌طور هماهنگ در زمان و مکان مشخصی تنظیم می‌گردد. سلول‌ها بدون کسب ماده و انرژی از محیط خودشان نمی‌توانند ساختارهای بسیار سازمان یافته خود را حفظ کنند و متابولیسم (مثل سنتز کربوهیدرات‌ها) انجام دهند. در این فصل به مکانیسم‌های مولکولی که طی آن سلول‌ها از نور خورشید یا مواد غذایی به عنوان منابع انرژی استفاده می‌کنند پرداخته می‌شود و بیشتر بر روی چگونگی تبدیل این منابع انرژی خارجی به حامل عمومی انرژی یعنی **آدنوزین تری‌فسفات** یا **ATP** متمرکز خواهد شد (شکل ۱ـ۱۲). ATP در تمامی انواع موجودات زنده یافت می‌گردد و احتمالاً در اشکال اولیه حیات وجود داشته و از ADP و فسفات معدنی HPO_4^{2-} ساخته می‌شود (HPO_4^{2-} به‌طور مخفف اغلب به صورت Pi نشان داده می‌شود). سلول‌ها از انرژی حاصله از هیدرولیز پیوند فسفوانیدریدی پر انرژی ATP (شکل ۳۱ـ۲ را ملاحظه کنید)، بسیاری از فرایندهای انرژی خواه را پیش می‌برند. مثال‌هایی از این موارد شامل سنتز پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک از نوکلئوتیدها (فصل ۴)، انتقال مولکول‌ها بر خلاف شیب غلظت توسط پمپ‌های وابسته به ATP (فصل ۱۱)، انقباض عضلانی (فصل ۱۷)، و زنش مژک (فصل ۱۸) می‌باشند.

انرژی لازم برای سنتز ATP از ADP (ΔG = ۷/۳ kcal/mol) توسط دو فرایند فراهم می‌شود: **اکسیداسیون هوازی**، که در **میتوکندری‌های** تمامی سلول‌های یوکاریوتی رخ می‌دهد (شکل ۱ـ۱۲ بالا)، و **فتوسنتز** که در کلروپلاست‌های سلول‌های برگ گیاهان (شکل ۱ـ۱۲ پایین) و در موجودات تک سلولی مثل سیانوباکترها رخ می‌دهد. دو فرایند دیگر، گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک، به عنوان منابع مستقیم و غیرمستقیم ATP در سلول‌های جانوری و گیاهی می‌باشد.

در اکسیداسیون هوازی، شکست فراورده‌های قندی (کربوهیدرات‌ها) و اسیدهای چرب (هیدروکربن‌ها) که در جانوران هر دو از هضم مواد غذایی به وجود می‌آید توسط اکسیداسیون با O_2 منجر به تولید دی‌اکسیدکربن و آب می‌شود. انرژی که از این واکنش کلی آزاد می‌گردد به انرژی شیمیایی پیوندهای فسفوانیدریدی در ATP تبدیل می‌شود. این فرایند شبیه سوختن چوب (کربوهیدرات‌ها) یا بنزین (هیدروکربن‌ها) در کوره‌ها یا موتور اتومبیل‌ها که حرارت تولید می‌کند، می‌باشد. در هر دو مورد O_2 مصرف می‌شود و



▲ **شکل ۱-۱۲ مرور کلی بر اکسیداسیون هوازی و فتوسنتز.** سلول‌های یوکاریوتی به منظور تبدیل منابع خارجی انرژی به ATP از دو مکانیسم اساسی استفاده می‌کنند. (بالا) در اکسیداسیون هوازی، مولکول‌های «سوختی» (قندها و اسیدهای چرب) در سیتوزول متحمل پردازش اولیه می‌شوند، مثل شکست گلوکز به پیروات (**مرحله** I) و سپس به میتوکندری، محلی که آنها توسط اکسیداسیون با O_2 به دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌گردند (**مرحله** II **و** III) انتقال یافته و ATP تولید می‌کند (**مرحله** IV). (پایین) در فتوسنتز، که در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد، انرژی نور خورشید توسط رنگیزه‌های خاصی جذب می‌گردد (**مرحله** I)، انرژی جذب شده در اکسیداسیون آب به O_2 و ایجاد شرایط (مرحله II) لازم در تولید ATP (**مرحله** III) و کربوهیدرات‌ها از CO_2 (تثبیت کربن، **مرحله** IV) استفاده می‌گردد. در هر دو مکانیسم حامل‌های الکترونی احیایی پر انرژی ($FADH_2$، NADPH، NADH) و انتقال الکترون‌ها به سمت شیب پایین پتانسیل الکتریکی در یک زنجیره انتقال الکترونی غشاهای ویژه، درگیر هستند. انرژی موجود در این الکترون‌ها آزاد می‌گردد و به نیروی محرکه پروتونی (شیب الکتروشیمیایی پروتونی) تبدیل شده، به‌طوری که سپس در سنتز ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد. باکتری‌ها نیز از فرایندهای مشابهی استفاده می‌کنند.

دی‌اکسیدکربن و آب به وجود می‌آید. تفاوت عمده در این است که سلول‌ها واکنش کلی را در چندین مرحله انجام می‌دهند. این عمل باعث می‌گردد که مقدار انرژی آزاد شده در هر مرحله دقیقاً برابر با مقدار انرژی مورد نیاز برای مرحله بعدی فرایند باشد. هرگاه این تناسب دقیق وجود نداشته باشد، انرژی اضافی آزاد شده به صورت گرما از دست خواهد رفت (که بسیار ناکارآمد خواهد بود) و یا انرژی کافی برای پیش بردن مرحله بعدی آزاد نخواهد شد (که بسیار غیرمؤثر است).

در فتوسنتز، انرژی نور خورشید توسط رنگیزه‌هایی مثل کلروفیل جذب می‌گردد و در تولید ATP و کربوهیدرات‌ها (ساکارز و نشاسته) مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر خلاف اکسیداسیون هوازی که از کربوهیدرات‌ها و O_2 برای تولید CO_2 استفاده می‌کند، در فتوسنتز از CO_2 به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود و O_2 و کربوهیدرات تولید می‌شود.

ارتباط متقابل بین اکسیداسیون هوازی در میتوکندری‌ها و فتوسنتز در کلروپلاست‌ها نشان‌دهندهٔ یک ارتباط همزیستی قوی بین موجودات فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی می‌باشد و مسئول حیات در کره زمین می‌باشد. اکسیژن تولید شده در هنگام فتوسنتز منبع تمامی اکسیژن موجود در هوا است و کربوهیدرات تولید شده منبع نهایی انرژی تقریباً تمام موجودات غیرفتوسنتزی می‌باشد (استثناء در این مورد باکتری‌هایی هستند که در اعماق اقیانوس‌های عمیق زندگی می‌کنند و موجوداتی که از آنها تغذیه می‌کنند ـ به منظور تبدیل CO_2 به کربوهیدرات‌ها انرژی خود را از اکسیداسیون ترکیبات معدنی احیایی که در اعمال اقیانوس‌ها آزاد می‌گردد، کسب می‌کنند).

در نگاه اول، به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های مولکولی فرایندهای فتوسنتز و اکسیداسیون هوازی وجه اشتراک کم‌تری دارند.

علی‌رغم این، کشفیات تکاملی موجود در زیست‌شناسی سلولی ثابت کرده است که باکتری‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها از مکانیسم‌های مشابهی، موسوم به **شیمیواسمزیس**[1] به منظور تولید ATP از ADP و P_i بهره‌مند می‌شوند. در شیمیواسمزیس (به جفت شدن شیمیواسموتیک نیز معروف است)، به واسطه انرژی آزاد شده از عبور الکترون‌ها از **زنجیره انتقال الکترون** یک شیب الکتروشیمیایی پروتونی در عرض غشاء ایجاد می‌گردد. انرژی ذخیره شده در این شیب الکتروشیمیایی، که **نیروی محرکه پروتونی** نامیده می‌شود، مستقیماً در سنتز ATP و پیش بردن سایر فرایندهای انرژی خواه استفاده می‌گردد (شکل ۲ـ۱۲). در این فصل ما مکانیسم‌های مولکولی این دو فرایند را که در این مکانیسم مرکزی مشترک هستند مورد بررسی قرار می‌دهیم. ابتدا بر روی اکسیداسیون هوازی و سپس فتوسنتز متمرکز خواهیم شد.

۱۲-۱ مراحل اولیه کاتابولیسم گلوکز و اسید چرب: گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک

در یک موتور اتومبیل، سوخت هیدروکربنی به صورت انفجاری در یک فرایند تک مرحله‌ای اصلی به کار مکانیکی (مثل راندن پیستون) تبدیل می‌گردد. به دلیل اینکه در این فرآیند هم مقدار بیشتری از انرژی شیمیایی ذخیره شده در سوخت در هنگام تبدیل شدن به گرما تلف می‌گردد و هم مقدار زیادی سوخت به‌طور ناقص اکسید می‌گردد و به صورت مواد سمی کربنی خارج می‌گردد، این فرآیند ناکارآمد می‌باشد. موجودات زنده برای زنده ماندن نمی‌توانند منابع محدود انرژی خودشان را صرف فرایندهای ناکارامد بکنند. سلول‌ها به‌طور فوق‌العاده‌ای مکانیسم‌های کارامدی برای سوزاندن هیدروکربن (اسید چرب) و کربوهیدرات (قند) و تبدیل آنها به ATP دارند. این مکانیسم اکسیداسیون هوازی نام دارد. هر مرحله از تبدیل سوخت به انرژی دارای چندین واکنش است که توسط پروتئین‌های ویژه‌ای کاتالیز یا هدایت می‌گردد. این استراتژی دارای مزایای زیر می‌باشد:

- با چند مرحله‌ای شدن یک فرآیند، چند حد واسط حامل انرژی تولید می‌شود، انرژی موجود در پیوندها به‌طور کارایی در سنتز ATP صرف می‌شود و تولید گرما به حداقل می‌رسد.
- سوخت‌های مختلف به حد واسط‌های مشترکی ختم می‌شوند به‌طوری که مسیرهای بعدی سوختن و سنتز ATP در آنها مشترک می‌باشد.
- از آنجایی که انرژی ذخیره شده در پیوندهای مولکول‌های اولیه سوختی اساساً بیشتر از انرژی مورد نیاز برای سنتز یک مولکول ATP می‌باشد (~۷/۳ kcal/mol) بنابراین تعداد زیادی مولکول ATP تولید می‌گردد.

در بحث اکسیداسیون هوازی، ما سرنوشت دو فراورده غذایی مهم تولیدکننده انرژی قندها (اساساً گلوکز) و اسیدهای چرب را دنبال خواهیم کرد. تحت شرایط خاصی اسیدهای آمینه نیز در این مسیرهای متابولیکی وارد می‌شوند.

اکسیداسیون هوازی کامل هر مولکول گلوکز ۶ مولکول CO_2 آزاد می‌کند و انرژی آزاد شده در سنتز ۳۰ مولکول ATP مصرف می‌گردد. واکنش کلی به صورت زیر می‌باشد:

$$C_6H_{12}O_6+6O_2+30Pi^{2-}+30ADP^{3-}+30H^+ \rightarrow 6CO_2+30ATP^{4-}+36H_2O, \Delta G=686\ kcal/mol$$

اکسیداسیون گلوکز در یوکاریوت‌ها در چهار مرحله صورت می‌گیرد (شکل ۱ـ۱۲ را ملاحظه کنید).

I. تبدیل یک مولکول گلوکز ۶ کربنه به ۲ مولکول پیروات ۳ کربنه در سیتوزول **(گلیکولیز)**

II. تبدیل پیروات به CO_2 از طریق حد واسط استیل کوآنزیم A دو کربنه در میتوکندری **(چرخه اسید سیتریک)**

III. **انتقال الکترونی** به منظور تولید نیروی محرکه پروتونی

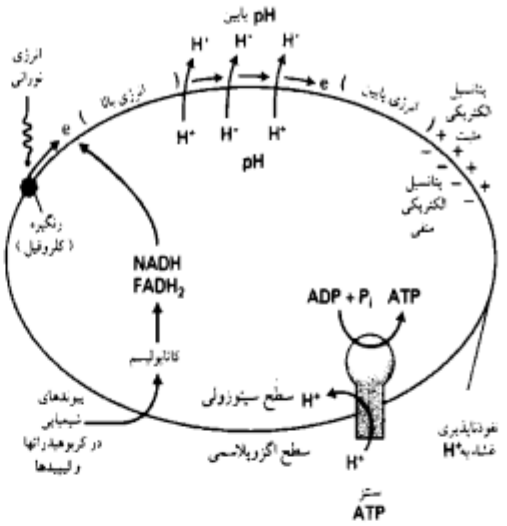
IV. سنتز ATP در میتوکندری **(فسفوریلاسیون اکسیداتیو)**

در این بخش، ما مرحله I و II را بحث می‌کنیم: مسیرهای بیوشیمیایی که گلوکز و اسیدهای چرب را به CO_2 تبدیل میکنند و باعث تولید ATP و الکترون‌های پر انرژی می‌گردد، در بخش بعدی سرنوشت الکترون‌های آزاد شده (مرحله III) بررسی می‌شود.

در گلیکولیز (مرحله I)، آنزیم‌های سیتوزولی گلوکز را به پیروات تبدیل می‌کنند

گلیکولیز در سیتوزول یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها رخ می‌دهد و نیاز به اکسیژن مولکولی ندارد؛ بنابراین گلیکولیز، **کاتابولیسم** بی‌هوازی گلوکز نامیده می‌شود (شکست بیولوژیکی مواد پیچیده به مواد ساده‌تر). ۱۰ آنزیم سیتوزولی محلول در آب واکنش‌های **مسیر گلیکولیز** (گلیکو به معنی «قند» لیز به معنی «شکست») را کاتالیز می‌کنند و طی آن یک مولکول گلوکز به دو مولکول پیروات تبدیل می‌گردد (شکل ۳ـ۱۲). تمام حد واسطهای تولید شده توسط این آنزیم‌ها محلول در آب و فسفریله هستند که ***حد واسط‌های***

1- Chemiosmosis



▲ **شکل ۲ـ۱۲ (شکل رنگی) نیروی محرکه پروتونی.** غلظت پروتونی و شیب (ولتاژ) الکتریکی عرض غشایی، نیروی محرکه پروتونی نامیده می‌شود و در هنگام اکسیداسیون هوازی و فتوسنتز در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها (باکتری‌ها) تولید می‌گردد. الکترون‌های پر انرژی حاصل از جذب نور توسط رنگریزه‌ها مثل کلروفیل یا حامل‌های حاصل از کاتابولیسم قندها و لیپیدها (مثل NADH، $FADH_2$) وارد زنجیره انتقال الکترون (فلش‌های آبی) پایین رفته و انرژی خود را در طی این فرایند آزاد می‌کند. انرژی باعث پمپ کردن پروتون‌ها از عرض غشاء (فلش‌های قرمز) می‌گردد و تولید نیروی محرکه پروتونی می‌کند. در جفت شدن شیمیواسموتیک، انرژی حاصله از جریان پروتون به سمت پایین شیب آن باعث سنتز ATP می‌گردد. همچنین نیروی محرکه پروتونی می‌تواند باعث انتقال متابولیت‌ها از عرض غشاء بر خلاف شیب غلظتی و چرخش تاژک باکتری گردد.

متابولیکی نامیده می‌شود. علاوه بر تبدیل شیمیایی یک مولکول‌گلوکز به این‌حد واسطها و دو مولکول پیروات، این واکنش‌های آنزیمی بافسفریلاسیون چهار ADP (واکنش‌های ۷ و ۱۰) چهار مولکول ATP تولید می‌کنند، این فرایند **فسفریلاسیون در سطح سوبسترا** نامیده می‌شود تا از فسفریلاسیون اکسیداتیوی که در مرحله سوم اکسیداسیون هوازی ATP تولید می‌کند تفکیک شود. بر خلاف مرحله آخر تشکیل ATP در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، نیروی محرکه پروتونی در فسفریلاسیون در سطح سوبسترا نقشی ندارد. با وجود این، در فسفریلاسیون در سطح سوبسترا نیاز به دو فسفات اضافی می‌باشد (در واکنش‌های ۱ و ۳) که از دو مولکول ATP تامین می‌شود. این واکنش‌ها را می‌توان به صورت واکنش‌های آماده سازی[1] تصور کرد که طی آن با صرف انرژی کم‌تر انرژی بیشتری در مرحله بعدی به دست می‌آید. بنابراین در گلیکولیز به ازای هر مولکول گلوکز تنها دو مولکول ATP خالص تولید می‌شود.

معادله شیمیایی تبدیل گلوکز به پیروات نشان می‌دهد که چهار اتم هیدروژن (چهار پروتون و چهار الکترون) نیز آزاد می‌شود:

$$\underset{\text{گلوکز}}{C_5H_{12}O_6} \rightarrow \underset{\text{پیروات}}{2CH_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - OH} + 4H^+ + 4e^-$$

اگرچه در pH فیزیولوژیک پیروات به صورت یونیزه یافت می‌شود (ما در این‌جا برای فهم بیشتر آن را به شکل غیریونی، اسید پیرویک، نشان می‌دهیم). چهار الکترون و دو پروتون از چهار پروتون بر روی دو مولکول **نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD^+)** انتقال می‌یابند (شکل ۳ـ۱۲، واکنش ۶) و تولید شکل احیایی آن، NADH می‌کنند (شکل ۳۳ـ۲ را ملاحظه کنید).

$$2H^+ + 4e^- + 2NAD^+ \rightarrow 2NADH$$

بعداً ما خواهیم دید که انرژی موجود در الکترون‌های NADH و حامل مشابه آن و $FADH_2$، که شکل احیایی **فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (FAD)** می‌باشد، از طریق زنجیره انتقال الکترون در تولید ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد:

معادله شیمیایی خلاصه مرحله اول کاتابولیسم گلوکز به صورت زیر است:

$$C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ + 2ADP^{-3} + 2P_i^{-2} \rightarrow$$

$$2C_3H_4O_3 + 2NADH + 2ATP^{-4}$$

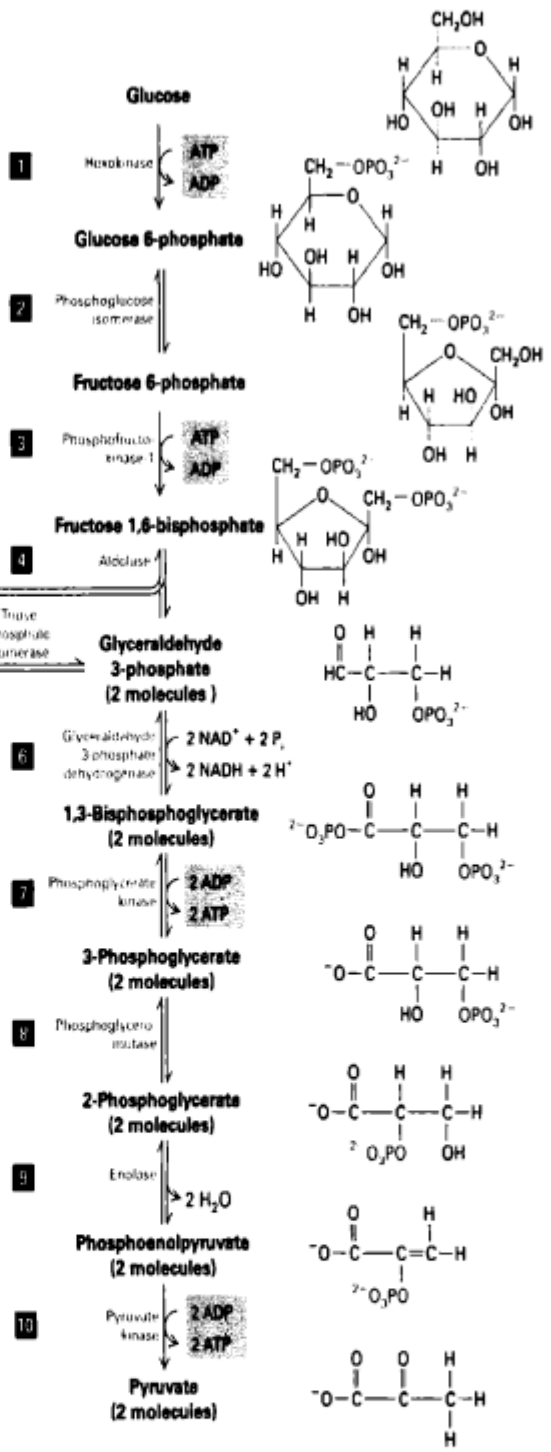
در گلیکولیز تنها بخش کوچکی از انرژی گلوکز به ATP و NADH تبدیل می‌شود و بقیه آن در پیوندهای کوالان دو مولکول پیروات باقی میماند. توانایی تبدیل موفق انرژی موجود در پیروات به ATP به اکسیژن مولکولی بستگی دارد. همان‌طور که خواهیم دید، در حضور اکسیژن (شرایط **هوازی**)، تبدیل انرژی کاملاً با صرفه است. در عدم حضور اکسیژن (شرایط **بی‌هوازی**) فرایند کارایی کم‌تری دارد.

سرعت گلیکولیز بر حسب نیاز سلول به ATP تنظیم می‌گردد

واکنش‌های آنزیمی و مسیرهای متابولیکی توسط سلول‌ها تنظیم می‌شوند تا مقادیر مورد نیاز متابولیت تولید شود. عمل اصلی

---

1 - Pump Priming



◀ **شکل ۳ـ۱۲ (شکل رنگی) مسیر گلیکولیز.** گلوکز به پیروات تجزیه می‌گردد. در دو واکنش ATP مصرف می‌شود و ADP و قندهای فسفریله شده (قرمز) تولید می‌شود، در دو واکنش ATP از ADP توسط فسفریلاسیون در سطح سوبسترا (سبز) تولید می‌گردد و در یک واکنش با احیاء NAD^+، NADH تولید می‌شود (زرد). توجه شود که تمامی حد واسطهای بین گلوکز و پیروات ترکیبات فسفریله می‌باشند. واکنش ۱، ۳ و ۱۰ که با یک فلش نشان داده شده‌اند در شرایط معمول سلول برگشت‌ناپذیرند (مقادیر ΔG منفی بزرگی دارند).

اکسیداسیون گلوکز در مسیر گلیکولیز تولید NADH، FADH می‌باشد که اکسیداسیون آنها در میتوکندری باعث تولید ATP می‌گردد. عملکرد مسیر گلیکولیز (مرحله I) به علاوه چرخه اسید سیتریک (مرحله II) به‌طور مداوم توسط مکانیسم‌های **آلوستریکی** تنظیم می‌گردد تا نیاز سلولی به ATP برطرف گردد (برای درک اصول عمومی کنترل آلوستریک به فصل ۳ رجوع شود).

سه آنزیم کنترلی گلیکولیز به‌طور آلوستریک نقش کلیدی در تنظیم تمام مسیرهای گلیکولیز بازی می‌کند (شکل ۳ـ۱۲). **هگزوکیناز** (واکنش ❶) توسط محصول واکنش خود، گلوکز ۶ ـ فسفات مهار می‌گردد. ***پیروات کیناز*** (در واکنش ❿) توسط ATP مهار می‌گردد بنابراین گلیکولیز در حضور ATP زیاد مهار می‌گردد. آنزیم سوم، ***فسفوفروکتوکیناز ـ ۱*** (واکنش ❸)، آنزیم اصلی محدودکننده سرعت مسیر گلیکولیز می‌باشد. رمز اهمیت این آنزیم در تنظیم سرعت گلیکولیز این است که این آنزیم به‌طور آلوستریک توسط چندین مولکول کنترل می‌گردد (شکل ۴ـ۱۲).

به عنوان مثال، فسفوفروکتوکیناز ـ ۱ به‌طور آلوستریکی توسط ATP مهار و توسط AMP فعال می‌گردد. در نتیجه می‌توان فهمید که سرعت گلیکولیز به انرژی سلول خیلی حساس است و توسط نسبت ATP:AMP منعکس می‌گردد. چون ATP یکی از سوبستراهای این آنزیم می‌باشد مهار آلوستریکی فسفوفروکتوکیناز ـ ۱ توسط ATP ممکن است به نظر غیرطبیعی برسد. اما تمایل مکان اتصال سوبسترا به ATP از تمایل مکان آلوستریکی آنزیم به ATP بسیار بالاتر است (K_m پایین). بنابراین ATP در غلظت‌های پایین به مکان کاتالیتیک و نه مکان مهار آلوستریکی متصل می‌شود و کاتالیز آنزیمی در سرعت‌های

نسبتاً بیشینه پیش می‌رود. در غلظت‌های بالا، ATP به مکان آلوستریکی نیز متصل می‌گردد و باعث القا تغییر کنفورماسیونی می‌گردد که تمایل آنزیم به سایر سوبستراها، فروکتوز ۶ ـ فسفات، را کاهش می‌دهد و در نتیجه سرعت این واکنش و در نتیجه سرعت کلی گلیکولیز را کاهش می‌دهد.

فعال‌کننده آلوستریکی دیگر فسفوفروکتوکیناز ـ ۱، فروکتوز ۲، ۶ بیس فسفات می‌باشد. این متابولیت توسط آنزیمی به نام فسفوفروکتوکیناز ـ ۲ از فروکتوز ۶ ـ فسفات تولید می‌گردد. فروکتوز ۶ ـ فسفات تشکیل فروکتوز ۲، ۶ بیس فسفات را تسریع می‌کند که آن هم به نوبه خود فسفوفروکتوکیناز ـ ۱ را فعال می‌سازد. این نوع کنترل به فعال‌سازی پیش نوردی[1] معروف است که طی آن مقدار زیاد یک متابولیت (در این‌جا فروکتوز ۶ ـ فسفات) باعث تسریع متابولیسم بعدی آن می‌گردد.

در سلول‌های کبدی فروکتوز ۲، ۶ ـ بیس فسفات به‌طور آلوستریکی با کاهش اثر مهاری ATP بالا و با افزایش تمایل فسفوفروکتوکیناز ـ ۱ به یکی از سوبستراهای آن، فروکتوز ۶ ـ فسفات، باعث فعال‌سازی فسفوفروکتوکیناز ـ ۱ می‌گردد.

سه آنزیم گلیکولیزی، واکنش‌هایی که میزان $\Delta G^{\circ\prime}$ بسیار منفی دارند و تحت شرایط معمول اساساً برگشت‌ناپذیر هستند را کاتالیز می‌کنند. بنابراین این آنزیم‌ها به‌طور اساسی در تنظیم کل مسیر گلیکولیز مناسب هستند. کنترل دیگری نیز وجود دارد که توسط گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات دهیدروژناز، آنزیمی که احیاء NAD^+ به NADH را کاتالیز می‌کند، صورت می‌گیرد (شکل ۳ـ۱۲، مرحله ❻ را ملاحظه کنید). هرگاه NADH سیتوزولی کم‌تر وارد اکسیداسیون میتوکندریایی گردد، این واکنش از نظر ترمودینامیکی مساعد نخواهد بود.

متابولیسم گلوکز در بافت‌های مختلف پستانداران به‌طور متفاوت کنترل می‌گردد تا احتیاجات متابولیکی موجود زنده را برطرف سازد. برای مثال در زمان گرسنگی کربوهیدراتی، ضروری است که کبد به گردش خون گلوکز آزاد کند. به منظور این عمل، کبد پلیمر گلیکوژن، شکل ذخیره‌ای گلوکز (فصل ۲)، را مستقیماً به گلوکز ۶ ـ فسفات (بدون دخالت آنزیم هگزوکیناز، مرحله ❶) تبدیل می‌کند. تحت این شرایط سطح فروکتوز ۲، ۶ ـ بیس فسفات و فعالیت فسفوفروکتوکیناز ۱ ـ کاهش می‌یابد (شکل ۴ـ۱۲). در نتیجه گلوکز ۶ ـ فسفات حاصله از گلیکوژن به پیروات تبدیل نمی‌شود بلکه توسط یک آنزیم فسفاتاز به گلوکز تبدیل شده و وارد خون می‌شود تا سلول‌های مغزی و سلول‌های قرمز خون که سوخت اولیه آن‌ها اساساً گلوکز است بتوانند از آن تغذیه کنند. در تمام موارد فعالیت این آنزیم‌های تنظیمی توسط سطح متابولیت‌های کوچک مولکولی، عموماً با میانکنش‌های آلوستریکی، یا با واکنش‌های فسفریلاسیون با واسطه هورمون کنترل می‌گردد (در فصل ۱۵ جزئیات بیشتری درباره کنترل هورمونی متابولیسم گلوکز در کبد و عضله آورده شده است).

گلوکز تحت شرایط بی‌هوازی تخمیر می‌گردد

بسیاری از یوکاریوت‌ها ***هوازی اجباری***[2] هستند: آنها تنها در حضور اکسیژن مولکولی رشد می‌کنند و گلوکز (یا قندهای مربوطه) را به همراه تولید مقدار زیادی ATP به CO_2 تبدیل می‌کنند. با وجود این بسیاری از یوکاریوت‌ها می‌توانند از طریق متابولیسم بی‌هوازی مقداری ATP تولید کنند. تعداد کمی از یوکاریوت‌ها ***بی‌هوازی‌های اختیاری***[3] هستند: آنها می‌توانند هم در حضور و هم در عدم حضور اکسیژن رشد بکنند. برای مثال کرم حلقوی *annelids* حلزون‌ها و بعضی از مخمرها می‌توانند چندین روز بدون اکسیژن زندگی و رشد بکنند.

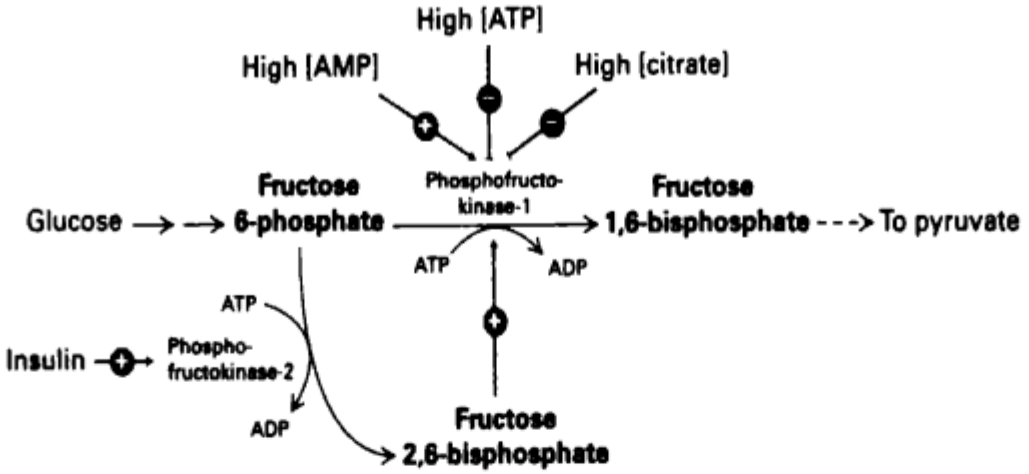
در عدم حضور اکسیژن، مخمرها پیروات تولید شده از گلیکولیز را به یک مولکول اتانول و CO_2 تبدیل می‌کنند؛ در این واکنش‌ها به ازای تبدیل دو مولکول پیروات به اتانول دو مولکول NADH به NAD^+ تبدیل می‌شود و بنابراین مجدداً NAD^+ تأمین می‌شود (شکل a ۵ـ۱۲، چپ). این تجزیه بی‌هوازی گلوکز **تخمیر**[4] نامیده می‌شود و اساس تولید آبجو و مشروبات می‌باشد.

فقر اکسیژن نیز می‌تواند متابولیسم گلوکز در جانوران را تحت تأثیر قرار دهد. در هنگام انقباضات طولانی سلول‌های عضلات اسکلتی پستانداران ـ برای مثال در هنگام فعالیت ـ اکسیژن در بافت عضلانی محدود می‌شود و کاتابولیسم گلوکز به گلیکولیز محدود می‌شود (مرحله I). متعاقباً، سلول‌های عضلانی پیروات حاصله از گلیکولیز را طی واکنش احیایی، که در آن دو مولکول NADH نیز به دو مولکول NAD^+ تبدیل می‌گردد، به اسید لاکتیک تبدیل می‌کنند (شکل a ۵ـ۱۲، راست). گرچه اسید لاکتیک از عضله به داخل خون سرازیر می‌گردد ولی هرگاه غلظت آن بیشتر از حد باشد، می‌تواند در بافت عضله تجمع یافته و باعث دردهای مفصلی گردد. وقتی که اسیدلاکتیک به خون ترشح می‌گردد، مقداری از آن به کبد رفته و درکبد مجدداً به پیروات تبدیل می‌شود تا پیروات حاصله به CO_2 و

1- Feed-forward activation

2- Obligate aerobes 3- Facultative anaerobes

4 - Fermentation



▲ **شکل ۴ـ۱۲ تنظیم آلوستریکی متابولیسم گلوکز.** آنزیم تنظیمی کلیدی در گلیکولیز، فسفوفروکتوکیناز ـ ۱، به‌طور آلوستریکی توسط AMP و فروکتوز ۲، ۶ ـ بیس فسفات فعال می‌گردد این دو ترکیب زمانی که ذخیره انرژی سلول پایین است افزایش می‌یابند. این آنزیم توسط ATP (زمانی که ذخیره انرژی سلول بیشتر است) و سیترات مهار می‌گردد، هر دو آنها در زمانی که سلول فعالانه گلوکز را به CO_2 تبدیل می‌کند افزایش می‌یابد. بعداً ما خواهیم دید که چگونه سیترات در مرحله II اکسیداسیون گلوکز تولید می‌گردد. فسفوفروکتوکیناز ـ ۲ (PFK2) یک آنزیم دوکاره[1] است: شکل کینازی آن فروکتوز ۶ ـ فسفات را به فروکتوز ۲، ۶ بیس فسفات تبدیل می‌کند، و شکل فسفاتازی آن واکنش معکوس را کاتالیز می‌کند. انسولین، که در هنگام بالا بودن سطح گلوکز خون از لوزالمعده آزاد می‌گردد، فعالیت کینازی PFK2 را فعال می‌کند و بنابراین گلیکولیز را تحریک می‌کند. در غلظت پایین گلوکز خون، گلوکاگون توسط سلول‌های لوزالمعده آزاد می‌گردد و در کبد فعالیت فسفاتازی PFK2 را فعال می‌کند، که به‌طور غیرمستقیم گلیکولیز را آهسته می‌کند.

یا به گلوکز تبدیل گردد. در قلب به دلیل آن که خون زیادی وارد آن می‌گردد مقدار بیشتری لاکتات به CO_2 تبدیل می‌گردد. در طول تمرین و فعالیت که عضلات اسکلتی لاکتات ترشح می‌کنند، قلب متابولیسم هوازی انجام می‌دهد. باکتری‌های اسید لاکتیکی (موجوداتی که شیر را فاسد می‌کنند) و سایر پروکاریوت‌ها نیز با تخمیر گلوکز به لاکتات می‌توانند ATP تولید کنند.

تحت شرایط هوازی، میتوکندری‌ها فعالانه پیروات را اکسید می‌کنند و ATP تولید می‌کنند (مراحل II تا IV)

پیرواتی که طی گلیکولیز تشکیل شده است در حضور اکسیژن، به داخل میتوکندری منتقل شده و از طریق یک سری واکنش‌های اکسیداسیون در آنجا با استفاده از O_2 به CO_2 و H_2O اکسید می‌گردد. فرایند کلی که در آن سلول‌ها از O_2 استفاده می‌کنند و CO_2 تولید می‌کنند روی هم رفته *تنفس سلولی*[2] نامیده می‌شود (شکل ۵ـ۱۲ b). در تنفس، که در میتوکندری‌ها صورت می‌گیرد (مراحل II تا IV)، به ازای هر مولکول گلوکز تقریباً ۲۸ مولکول ATP تولید می‌گردد که بسیار بیشتر از میزان ATP تولید شده در متابولیسم بی‌هوازی گلوکز می‌باشد.

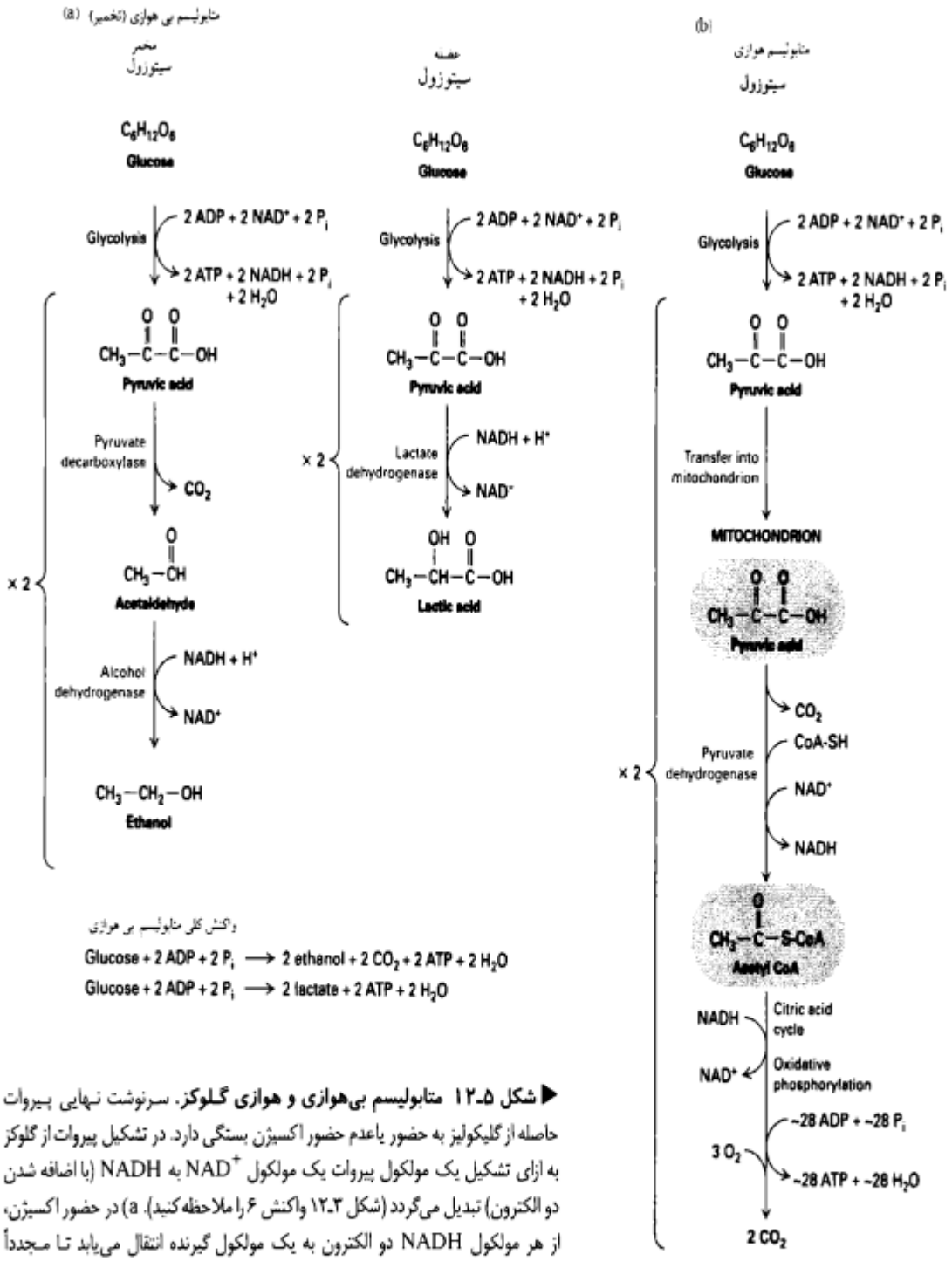
سیانوباکتری‌های فتوسنتزی تولیدکننده اکسیژن تقریباً ۲/۷ بیلیون سال قبل به وجود آمده‌اند. انباشت اتمسفر زمین از اکسیژن در یک بیلیون سال بعد باعث شد که موجودات زنده مسیر بسیار کارامد اکسیداسیون هوازی را انتخاب کنند که به نوبه خود باعث تکامل اجسام بزرگ و پیچیده و آغاز فعالیت‌های متابولیکی گردیده، این دوران، دوران انفجار کامبرینی نامیده می‌شود. در واقع، میتوکندری‌ها کارخانه‌های تولیدکننده ATP هستند که از این اکسیژن فراوان حداکثر استفاده را می‌کنند. ما ابتدا ساختار و سپس واکنش‌هایی را که در تجزیه پیروات درگیر هستند بحث می‌کنیم.

میتوکندری‌ها اندامک‌های دینامیکی هستند که از نظر ساختاری و عملکردی دارای غشاهای متفاوت می‌باشند

میتوکندری‌ها (شکل ۶ـ۱۲) یکی از اندامک‌های بزرگ در داخل سلول‌ها می‌باشند. یک میتوکندری از نظر اندازه تقریباً شبیه یک باکتری *E.coli* می‌باشد، زیرا عقیده بر این است که باکتری‌ها از نظر

1- Bifunctional enzyme

2- Cellular respiration



◀ **شکل ۵ـ۱۲ متابولیسم بی‌هوازی و هوازی گلوکز.** سرنوشت نهایی پیروات حاصله از گلیکولیز به حضور یاعدم حضور اکسیژن بستگی دارد. در تشکیل پیروات از گلوکز به ازای تشکیل یک مولکول پیروات یک مولکول NAD^+ به NADH (با اضافه شدن دو الکترون) تبدیل می‌گردد (شکل ۳ـ۱۲ واکنش ۶ را ملاحظه کنید). a) در حضور اکسیژن، از هر مولکول NADH دو الکترون به یک مولکول گیرنده انتقال می‌یابد تا مجدداً NAD^+ تولید شود، NAD^+ تولید شده برای ادامه گلیکولیز ضروری است. در مخمرها (چپ) استالدهید گیرنده الکترون و اتانول فراورده است. این فرایند تخمیر الکلی نامیده می‌شود. زمانی که اکسیژن در سلول‌های عضلانی کاهش می‌یابد، NADH پیروات را به اسید لاکتیک تبدیل می‌کند و NAD^+ تولید می‌شود. (b) در حضور اکسیژن پیروات به میتوکندری‌ها منتقل می‌شود. ابتدا آن توسط پیروات دهیدروژناز به CO_2 و اسید استیک تبدیل می‌شود، اسید استیک به کوآنزیم A (CoA-SH) متصل شده و استیل CoA تشکیل می‌شود به همراه این واکنش‌ها یک مولکول NAD^+ به NADH تبدیل می‌شود. در متابولیسم بعدی استیل کوآنزیم A و NADH به ازای هر مولکول گلوکز تقریباً ۲۸ مولکول ATPتولید می‌شود.

تکاملی پیش‌ساز میتوکندری‌ها می‌باشند (فصل ۶ و بحث فرضیه همزیستی درونی را ملاحظه کنید، پایین). بیشتر سلول‌های یوکاریوتی دارای‌میتوکندری‌های زیادی می‌باشند بطوریکه روی هم رفته تقریباً ۲۵٪ حجم سیتوپلاسم را میتوکندری‌ها اشغال می‌کنند. تعداد میتوکندری‌های یک سلول، در سلول‌های پستانداران صدها تا هزاران، طوری تنظیم می‌گردد که احتیاجات سلول به ATP را تأمین کنند (برای مثال سلول‌های معده‌ای، که به ATP زیادی برای ترشح اسید نیاز دارند، میتوکندری‌های زیادی دارند). آنالیز میتوکندری‌های نشاندار با فلورسنت در سلول‌های زنده نشان داده است که میتوکندری‌ها بسیار دینامیک هستند. آنها متحمل آمیزش و تقسیم می‌شوند و شبکه لوله‌ای و در بعضی مواقع شبکه شاخه‌دار ایجاد می‌کنند (شکل ۷ـ۱۲)، که ممکن است علت وجود انواع متنوع مورفولوژی میتوکندری سلول‌های مختلف باشد. آمیزش و تقسیم میتوکندری به‌طور آشکارا نقش کلیدی و عملکردی دارد زیرا مشخص شده است که اختلال ژنتیکی در ژن‌های فوق خانواده GTPase، که برای این فرایندهای دینامیکی ضروری است، می‌تواند فعالیت‌های آن مثل حفظ پتانسیل الکتریکی غشای داخلی را مختل کند و در نتیجه باعث به وجود آمدن بیماری‌های انسانی مثل بیماری عصبی عضلانی Charcot-Marie-Tooth subtyp2A گردد.

جزئیات ساختاری میتوکندری را می‌توان توسط میکروسکوپ الکترونی به وضوح مشاهده کرد (شکل ۸ـ۹ را ملاحظه کنید). میتوکندری‌ها دو نوع غشای متفاوت دارند. غشای خارجی، بخش صاف بیرونی میتوکندری را مشخص می‌کند. غشای داخلی فرورفتگی‌های زیاد به نام **کریستا** دارد (شکل ۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). این غشاها از نظر فضایی دو بخش زیر میتوکندریایی[1] را مشخص می‌سازند: **فضای بین غشایی**، فضای بین غشاهای خارجی و داخلی، و **ماتریکس**، یا بخش مرکزی، که باعث تشکیل لومن داخلی می‌دهد. زمانی که میتوکندری‌ها آمیزش می‌یابند، هر کدام از بخش‌های مشخص با یکدیگر ترکیب می‌گردد (برای مثال ماتریکس با ماتریکس، غشای داخلی با غشای داخلی). با جداسازی و تخلیص این غشاها و بخش‌ها می‌توان پروتئین‌ها، DNA و ترکیب فسفولیپیدی آنها را تعیین کرد و محل واکنش‌های آنزیمی را در یک غشای ویژه یا بخش ویژه مشخص کرد. تقریباً برای حفظ و عملکرد میتوکندری‌ها تعداد ۱۰۰۰ پلی‌پپتید نیاز است. تنها بخش کوچکی از این پلی‌پپتیدها ـ در انسان ۱۳ تا ـ توسط ژن‌های DNA میتوکندریایی کد می‌گردد، بقیه پروتئین‌ها توسط ژن‌های هسته‌ای کد می‌گردند (فصل ۶).

بیشترین پروتئین موجود در غشای خارجی **پورین**[2] میتوکندریایی می‌باشد، پورین یک پروتئین کانالی سراسری می‌باشد که از نظر ساختاری مشابه پورین‌های باکتریایی می‌باشد (شکل ۱۸ـ۱۰ را ملاحظه کنید). یون‌ها و بسیاری از مولکول‌های کوچک (تا تقریباً ۵۰۰۰ Da) می‌توانند از این کانال‌ها عبور کنند. اگر چه ممکن است برای باز شدن پورین‌های میتوکندریایی تنظیم متابولیکی خاصی وجود داشته باشد تا متابولیت‌ها از غشاء خارجی عبور کنند، ولی غشاء داخلی مهم‌ترین سد نفوذپذیر بین سیتوزول و ماتریکس میتوکندریایی می‌باشد و سرعت اکسیداسیون میتوکندریایی را محدود می‌کند.

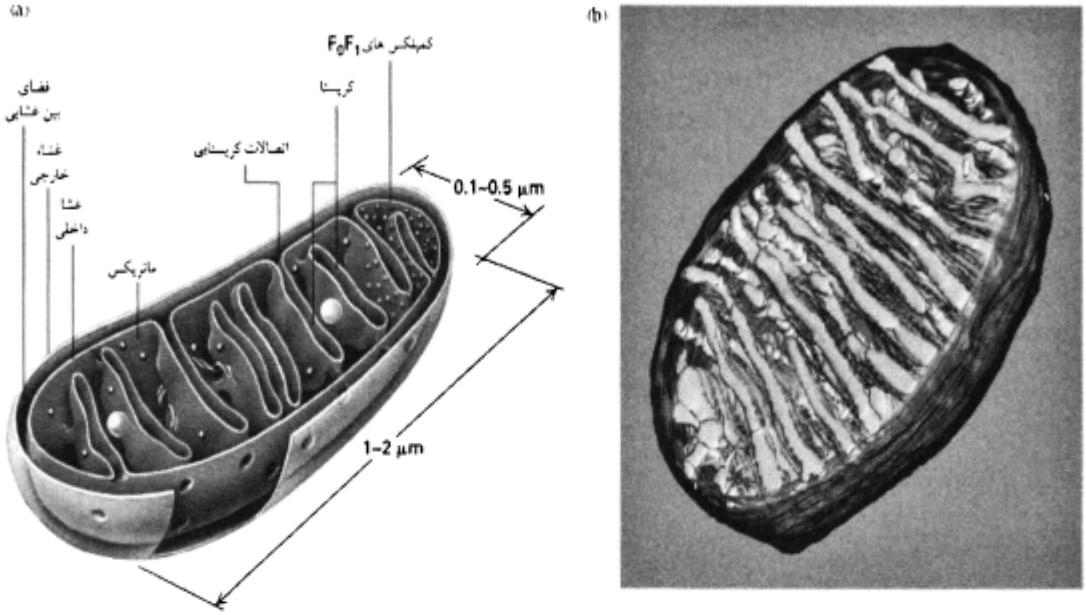
۷۶٪ وزن کل غشاء داخلی را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. بسیاری از این پروتئین‌ها در تنفس سلولی نقش مهمی دارند. آنها شامل ATP سنتاز، پروتئین‌های انتقال دهنده الکترون و انواع بیشتری از پروتئین‌های انتقالی که باعث جا به جایی متابولیت‌ها بین سیتوزول و ماتریکس میتوکندریایی می‌شوند، می‌باشند. ژنوم انسان ۴۸ عضو از خانواده پروتئین‌های انتقالی میتوکندری را کد می‌کند. یکی از این پروتئین‌ها پروتئین حامل ADP/ATP می‌باشد، که یک آنتی‌پورتر است و باعث خروج ATP سنتز شده به خارج از ماتریکس و فضای بین غشایی (و سرانجام به سیتوزول) و ورود ADP از سیتوزول به ماتریکس می‌گردد. بدون وجود این آنتی‌پورتر مهم، انرژی ذخیره شده در پیوندهای شیمیایی ATP میتوکندریایی در دسترس بقیه قسمت‌های سلول قرار نمی‌گرفت.

کریستاها بطور وسیعی سطح غشای داخلی میتوکندری را افزایش داده است و به این ترتیب باعث افزایش ظرفیت تولید ATP می‌گردد (شکل ۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). برای مثال در میتوکندری‌های کبدی سطح غشای داخلی، کریستا، تقریباً ۵ برابر غشاء خارجی می‌باشد. در واقع سطح کل تمام غشاهای میتوکندریایی در سلول‌های کبدی ۱۷ برابر سطح غشای پلاسمایی آنها می‌باشد. میتوکندری‌های موجود در سلول‌های عضلات قلبی و اسکلتی تقریباً ۳ برابر میتوکندری‌های کبدی کریستا دارند که نشان دهنده نیاز بیشتر به ATP در سلول‌های عضلانی می‌باشد.

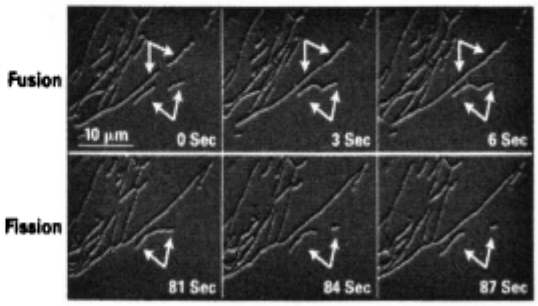
توجه شود در گیاهان نیز میتوکندری وجود دارد و تنفس سلولی در آنها انجام می‌شود. در گیاهان، کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای، غالباً به شکل نشاسته، به گلوکز هیدرولیز می‌گردد. سپس در گلیکولیز پیروات

1- Submitochodrial Compartments

2 - Porin



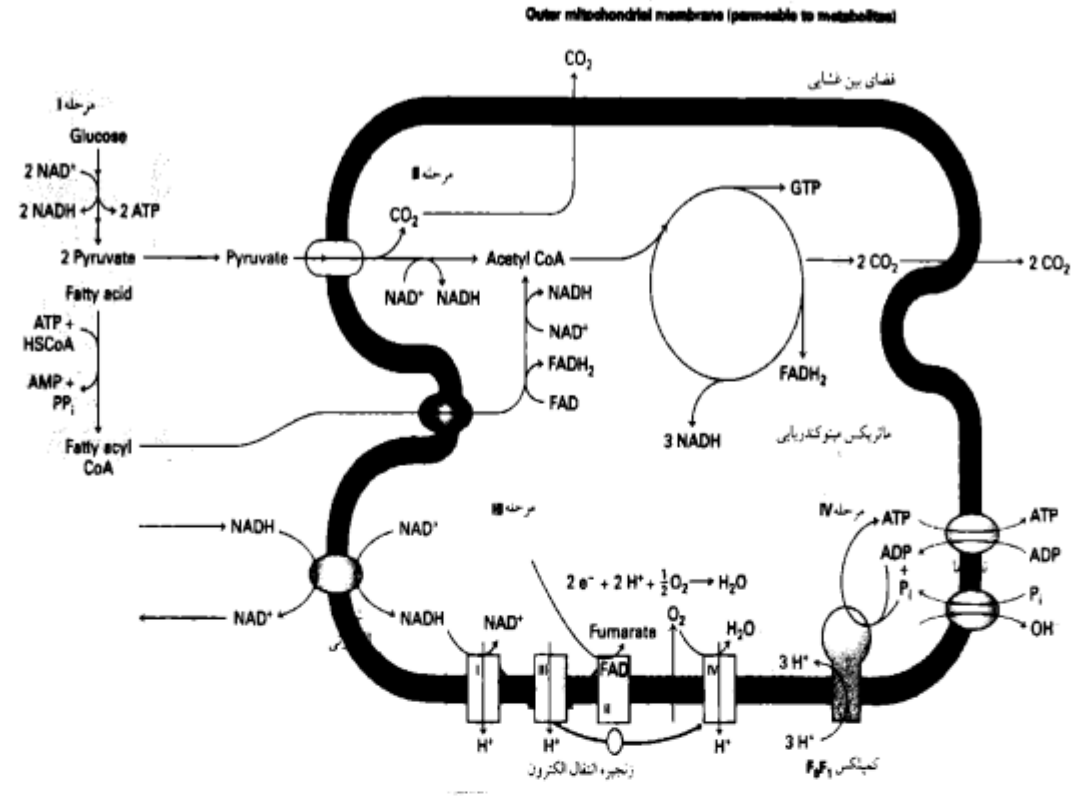
▲ **شکل ۶ـ۱۲ (شکل رنگی) ساختار داخلی یک میتوکندری.** a) شکل بصورت شماتیکی غشاها و اجزای اصلی میتوکندری را نشان می‌دهد. کریستاها با فرو رفتگی‌های غشای داخلی باعث تشکیل اشکال لوله‌ای و صفحه‌ای می‌گردند و از طریق ساختارهای نسبتاً کوچک لوله‌ای و هم شکل بنام اتصالات کریستایی[1] به غشای داخلی وصل می‌شوند. به نظر می‌رسد فضای بین غشایی تا لومن هر کریستا کشیده شده است. کمپلکس‌های F_0F_1 (دانه‌های کوچک قرمز)،که مکان سنتز ATP می‌باشد، ذرات داخل غشایی هستند که روی کریستاها و غشای داخلی قرار دارند و به سمت درون ماتریکس کشیده شده‌اند. ماتریکس دارای DNA میتوکندریایی (رشته آبی)، ریبوزوم‌ها (دانه‌های کوچک آبی رنگ) و گرانول (دانه‌های کوچک زرد رنگ) می‌باشد. (b) مدل رایانه‌ای مقطع یک میتوکندری مغز جوجه. این مدل براساس تصاویر سه‌بعدی میکروسکوپ الکترونی از مجموعه‌ای از میکروگراف‌های الکترونی دوبعدی بازسازی شده است. این تکنیک آنالوگ توموگرام x-ray سه‌بعدی یا اسکن CAT در تصویربرداری پزشکی می‌باشد. به کریستاهای شدیداً متراکم (سبز ـ زرد)، غشای داخلی (آبی روشن)، و غشای خارجی (آبی تیره) توجه گردد.



▶ **شکل تجربی ۷ـ۱۲ (شکل رنگی) میتوکندری‌های سلولی متحمل آمیزش و شکافت سریع می‌گردند.** میتوکندری‌های فیبروبلاست جنینی موش نشاندار با یک پروتئین فلورسنت توسط میکروسکوپ فلورسنت مروری مشاهده می‌شود. میتوکندرهایی که دچار آمیزش (بالا) و یا شکافت (پایین) شدند با فلش و رنگ آبی نشان داده شده است.

تولید می‌شود که همانند سلول‌های جانوری به میتوکندری منتقل می‌گردد. اکسیداسیون میتوکندریایی پیروات و تشکیل ATP در سلول‌های فتوسنتزی، در هنگام تاریکی، زمانی که فتوسنتز ممکن نیست، در ریشه و سایر بافت‌های غیرفتوسنتزی رخ می‌دهد.

1- Crista junctions



▲ **شکل ۸ـ۱۲ (شکل رنگی) خلاصه اکسیداسیون هوازی گلوکز و اسیدهای چرب. مرحله I**: در سیتوزول، گلوکز به پیروات (گلیکولیز) و اسید چرب به اسیل چرب CoA تبدیل می‌گردد. سپس پیروات و اسیل چرب CoA به میتوکندری وارد می‌شوند. غشای خارجی میتوکندری به دلیل وجود پروتئین‌های پورین به متابولیت‌ها نفوذپذیر است اما برای وارد شدن پیروات (زرد) و اسیدهای چرب (آبی) به ماتریکس پروتئین‌های ناقل ویژه‌ای (بیضی‌های رنگی) نیاز است. گروه‌های اسیل چرب از اسیل چرب CoA بر روی یک حامل حد واسط منتقل شده، از غشای داخلی عبور کرده (بیضی آبی) و سپس مجدداً در بخش ماتریکس به CoA متصل می‌گردند. **مرحله II**: در ماتریکس میتوکندریایی، پیروات و اسیل چرب CoA به استیل CoA تبدیل شده و سپس اکسید می‌شوند و CO_2 آزاد می‌کنند. پیروات به استیل CoA تبدیل می‌شود و به همراه آن NADH و CO_2 تشکیل می‌گردد، دو کربن اسیل چرب CoA به استیل CoA تبدیل می‌شود و به همراه آن $FADH_2$ و NADH تشکیل می‌شود. در اکسیداسیون استیل CoA در چرخه اسید سیتریک، NADH و $FADH_2$، GTP و CO_2 تولید می‌شود. **مرحله III**: انتقال الکترون باعث احیا اکسیژن به آب و تولید نیروی محرکه پروتونی می‌کند. الکترون‌های کوآنزیم‌های احیا شده (آبی) از طریق کمپلکس‌های انتقال‌دهنده الکترون (مستطیل‌های آبی) به O_2 منتقل می‌گردند و به همراه آن یون‌های H^+ (قرمز) از ماتریکس به فضای بین غشایی انتقال داده می‌شود تا باعث تولید نیروی محرکه پروتونی می‌گردد. الکترون‌های NADH مستقیماً از کمپلکس I به کمپلکس III حرکت کرده و از کمپلکس II عبور نمی‌کنند. الکترون‌های $FADH_2$ مستقیماً از کمپلکس II به کمپلکس III می‌روند و وارد کمپلکس I نمی‌شود. **مرحله IV**: ATP سنتاز، کمپلکس F_0F_1 (نارنجی) با استفاده از نیروی محرکه پروتونی، در ماتریکس ATP می‌سازد. پروتئین‌های آنتی‌پورتر (بیضی‌های ارغوانی و سبز) ADP و P_i را به داخل ماتریکس انتقال می‌دهند و گروه‌های هیدروکسیل و ATP را به خارج منتقل می‌کنند. NADH سیتوزولی مستقیماً به ماتریکس انتقال داده نمی‌شود زیرا غشاء داخلی به NAD^+ و NADH نفوذناپذیر است؛ اما یک سیستم شاتلی (قرمز) الکترون‌ها را از NADH سیتوزولی به NAD^+ ماتریکسی انتقال می‌دهد. O_2 به داخل ماتریکس و CO_2 به خارج آن انتشار می‌یابند.

مکان بیشتر واکنش‌های درگیر در اکسیداسیون پیروات واسیدهای چرب به CO_2 و H_2O غشای داخلی میتوکندری، کریستا، و ماتریکس می‌باشد. هر واکنش در یک غشای یا فضای مشخصی در میتوکندری رخ می‌دهد (شکل ۸ـ۱۲).

سه مرحله آخر از چهار مرحله اکسیداسیون گلوکز عبارتند از:

■ **مرحله II**. تبدیل پیروات به استیل کوآنزیم A و اکسیداسیون

آن به CO_2 در چرخه اسید سیتریک. این اکسیداسیون با احیا NAD^+ به $NADH_2$ و FAD به $FADH_2$ همراه است (در اکسیداسیون اسید چرب نیز مسیر مشابهی دنبال می‌شود و اسیدچرب به استیل کوآنزیم A تبدیل می‌گردد). بیشتر این واکنش‌ها در درون غشای یا بخش ماتریکسی میتوکندری رخ می‌دهد.

■ **مرحله III.** انتقال الکترونی از NADH و $FADH_2$ به O_2 از طریق زنجیره انتقال الکترونی موجود در غشای داخلی که باعث تولید نیروی محرکه پروتونی در عرض غشاء می‌گردد.

■ **مرحله IV.** استفاده از انرژی موجود در نیروی محرکه پروتونی به منظور سنتز ATP در غشای داخلی میتوکندری. مراحل III و IV را روی هم رفته فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌نامند.

در مرحله II، پیروات به CO_2 تبدیل می‌گردد و الکترون‌های پر انرژی در کوآنزیم‌های احیایی ذخیره می‌گردند

پیروات تولید شده در سیتوزول در مرحله I طی گلیکولیز به ماتریکس میتوکندریایی منتقل می‌گردد (شکل ۸ـ۱۲). در مرحله II سه عمل اتفاق می‌افتد: ۱ـ پیروات سه کربنه به سه مولکول CO_2 تبدیل می‌شود؛ ۲ـ **حامل‌های الکترون** پر انرژی (NADH و $FADH_2$) تولید می‌شود که در انتقال الکترون (مرحله III) مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ و ۳ـ یک مولکول GTP تولید می‌شود که سپس به ATP تبدیل می‌گردد:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

مرحله II را می‌توان به دو بخش مجزا تقسیم کرد: ۱ـ تولید **استیل CoA** به علاوه یک مولکول CO_2 و NADH و ۲ـ تبدیل استیل کوآنزیم A به دو مولکول CO_2 و حد واسط‌های پر انرژی NADH (سه مولکول)، $FADH_2$، و GTP

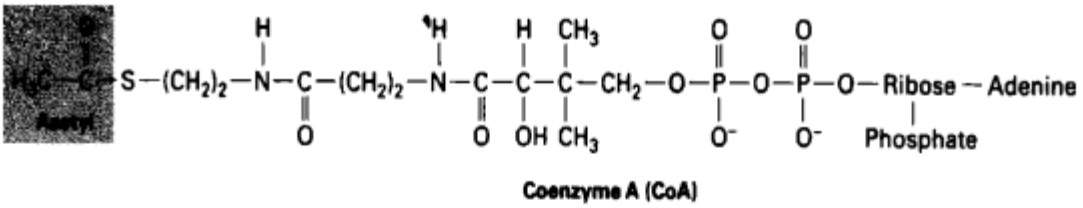
تولید استیل CoA. در ماتریکس میتوکندریایی، پیروات با کوآنزیم A واکنش می‌دهد و CO_2 و استیل کوآنزیم A و NADH تشکیل می‌دهد (شکل ۸ـ۱۲). این واکنش توسط ***پیروات دهیدروژناز*** کاتالیز می‌گردد و بسیار انرژی‌زا ($\Delta G^{\circ\prime}$ = -8.0 kcalmol) و اساساً برگشت‌ناپذیر است.

در اکسیداسیون اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه، استیل CoA (شکل ۹ـ۱۲) نقش مرکزی بازی می‌کند. به علاوه استیل CoA یک حد واسط در بسیاری از واکنش‌های بیوسنتزی، مثل انتقال گروه استیل به پروتئین‌های هیستونی و بسیاری از پروتئین‌های پستانداران، و سنتز لیپیدهایی مثل کلسترول می‌باشد. با وجود این در میتوکندری‌ها، گروه استیل موجود در استیل CoA تقریباً همیشه از طریق چرخه اسید سیتریک به CO_2 تبدیل می‌گردد.

چرخه اسید سیتریک. نُه واکنش متوالی به منظور تبدیل استیل CoA به CO_2 به صورت چرخه‌ای عمل می‌کنند. این چرخه با نام‌های مختلفی معروف است: چرخه اسید سیتریک، چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک (یا TCA) و چرخه کربس. نتیجه نهایی این چرخه تولید دو مولکول CO_2 ، سه مولکول NADH، و یک مولکول $FADH_2$ و GTP به ازای هر گروه استیلی که به صورت استیل CoA وارد آن می‌گردد می‌باشد.

همان‌طور که در شکل ۱۰ـ۱۲ نشان داده شده است، چرخه با اتصال گروه استیل از استیل CoA به مولکول چهار کربنه ***اگزالواستات*** و تشکیل ***اسید سیتریک*** ۶کربنه آغاز می‌گردد. به دلیل اینکه اولین ترکیب ساخته شده در این چرخه، اسیدسیتریک می‌باشد این چرخه، چرخه اسیدسیتریک نامگذاری شده است. در واکنش‌های ۴ و ۵ یک مولکول CO_2 آزاد می‌گردد و NAD^+ به NADH احیا می‌گردد. هم‌چنین در واکنش ۹ نیز NAD^+ به NADH احیا می‌گردد؛ بنابراین به ازای هر دور چرخه، سه NADH تولید می‌گردد. در واکنش ۷، دو الکترون و دو پروتون به FAD منتقل شده و باعث تشکیل شکل احیایی این کوآنزیم، $FADH_2$ می‌گردد. واکنش ۷ واکنش ویژه است زیرا نه تنها از اجزای داخلی چرخه اسید سیتریک می‌باشد (مرحله II) بلکه این واکنش توسط یک آنزیم متصل به غشاء، که جزئی از زنجیره انتقال الکترون می‌باشد، نیز کاتالیز می‌گردد (مرحله II). در واکنش ۶، هیدرولیز پیوند پر انرژی تیواستری سوکسینیل کوآنزیم A با سنتز یک مولکول GTP طی فرایند فسفریلاسیون در سطح سوبسترا همراه شده است (به دلیل این‌که GTP و ATP به یکدیگر تبدیل می‌شوند می‌توان آن را به عنوان یک مرحله تولیدکننده ATP در نظر گرفت). واکنش ۹ باعث تولید مجدد اگزالواستات می‌گردد بنابراین چرخه می‌تواند دوباره آغاز گردد. توجه شود که O_2 مولکولی در چرخه اسید سیتریک نقشی ندارد.

بسیاری از آنزیم‌ها و مولکول‌های کوچک درگیر در چرخه اسید سیتریک در ماتریکس میتوکندریایی محلول هستند. این مواد شامل CoA، استیل CoA، سوکسینیل CoA، NAD^+، و NADH به علاوه هشت آنزیم چرخه می‌باشد. با وجود این، ***سوکسینات دهیدروژناز*** (واکنش ۷)، یکی از اجزای پروتئین سراسری غشای داخلی میتوکندری است ولی جایگاه فعال آن به سمت ماتریکس است. زمانی که میتوکندری‌ها توسط لرزش ملایم اولتراسونیکاسیون یا لیزاسموتیک شکسته می‌شوند، آنزیم‌های غیرمتصل به غشاء



▲ **شکل ۱۲-۹ ساختار استیل** CoA. این ترکیب در اکسیداسیون هوازی پیروات، اسیدهای چرب، و بسیاری از اسیدهای آمینه یک حد واسط مهم می‌باشد. هم‌چنین آن در بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی گروه‌های استیل را فراهم می‌کند.

درگیر در چرخه اسید سیتریک به صورت کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ آزاد می‌گردند. عقیده بر این است که در چنین کمپلکس‌هایی، فراورده واکنش یک آنزیم بدون انتشار به محلول مستقیماً به آنزیم بعدی منتقل می‌شود. با وجود این تحقیقات زیادی به منظور تعیین ساختارهای این کمپلکس‌های آنزیمی بزرگ درون سلولی نیاز است.

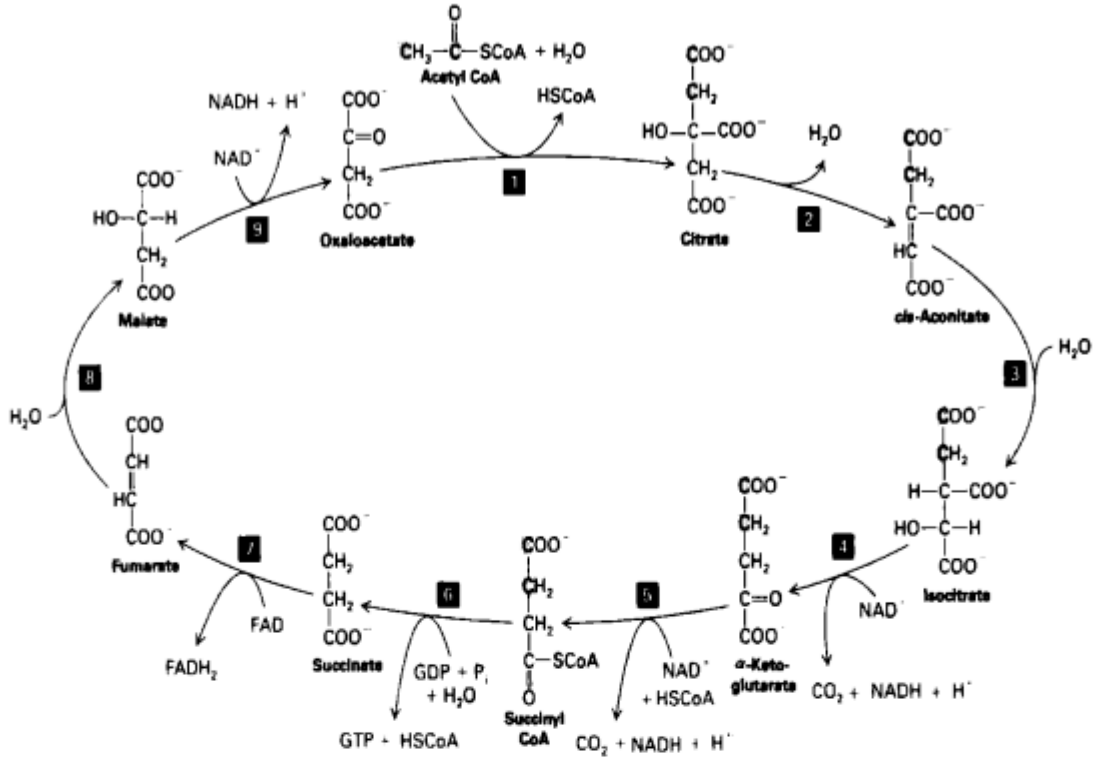
اگرچه در گلیکولیز از یک مولکول گلوکز دو مولکول استیل CoA تولید می‌گردد، در واکنش‌های مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک به ازای هر مولکول گلوکز ۶ مولکول CO_2، ۱۰ مولکول NADH و ۲ مولکول $FADH_2$ تولید می‌گردد (جدول ۱-۱۲). هر چند که در طی این واکنش‌ها چهار پیوند فسفواتیدریدی پر انرژی به شکل دو مولکول ATP و دو مولکول GTP تولید می‌گردد، این‌ها تنها بخش کوچکی از انرژی موجود در اکسیداسیون کامل هوازی گلوکز می‌باشد. باقیمانده انرژی به صورت الکترون‌های پر انرژی در کوآنزیم‌های احیا شده NADH و $FADH_2$ ذخیره می‌گردد. هدف مراحل III و IV تبدیل این انرژی به ATP است.

ناقل‌های موجود در غشای داخلی میتوکندری به حفظ غلظت مناسب NAD^+ و NADA در سیتوزول و ماتریکس کمک می‌کند

در سیتوزول، NAD^+ در واکنش مرحله ۶ گلیکولیز (شکل ۳-۱۲ را ملاحظه کنید)، و در ماتریکس میتوکندریایی NAD^+ در تبدیل پیروات به استیل CoA و سه واکنش چرخه اسید سیتریک (۴، ۵ و ۹ در شکل ۱۰-۱۲) ضروری می‌باشد. در موارد فوق NADH فراورده واکنش می‌باشد. در گلیکولیز و اکسیداسیون پیروات، NAD^+ بایستی دوباره با اکسید شدن NADH ساخته شود. (به‌طور مشابه، هرگاه به واکنش‌های وابسته به FAD نیاز باشد بایستی $FADH_2$ تولید شده در واکنش‌های مرحله II دوباره به FAD اکسید شود. همان‌طور که در بخش بعدی خواهیم دید در مرحله II زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری، NADH به NAD^+ و $FADH_2$ به FAD تبدیل می‌شود، O_2 به آب تبدیل شده و انرژی ذخیره شده در الکترون‌های پر انرژی موجود در اشکال احیایی این مولکول‌ها به نیروی محرکه پروتون تبدیل می‌گردد. اگرچه O_2 در هیچ کدام از واکنش‌های چرخه اسید سیتریک درگیر نیست ولی در عدم حضور O_2، این چرخه به دلیل این‌که ذخیره میتوکندریایی NAD^+ و FAD کاهش می‌یابد متوقف می‌گردد. کاهش NAD^+ و FAD به دلیل ناتوانی زنجیره انتقال الکترون در اکسید کردن NADH و $FADH_2$ می‌باشد. این مشاهدات باعث ایجاد این سؤال می‌گردد که چگونه NAD^+ سیتوزولی مجدداً تولید می‌شود.

هر گاه NADH سیتوزولی بتواند به ماتریکس میتوکندریایی منتقل گردد و توسط زنجیره انتقال الکترون اکسید گردد و هرگاه NAD^+ اکسید شده بتواند به سیتوزول برگردد، تولید مجدد NAD^+ سیتوزولی بسیار ساده خواهد بود. علی‌رغم این، غشای داخلی میتوکندری به NADH نفوذناپذیر است. به منظور رفع این مشکل، سلول‌ها از چندین *شاتل الکترونی* استفاده می‌کنند تا الکترون‌ها را از NADH سیتوزولی به NAD^+ ماتریکسی انتقال دهند، به این طریق الکترون‌های NADH سیتوزولی به‌طور غیرمستقیم از طریق زنجیره انتقال الکترون به O_2 می‌رسند. طرز کار شاتل معروف **مالات - آسپارتات** در شکل ۱۱-۱۲ به تصویر کشیده شده است. در هر «دور» کامل از چرخه، هیچ گونه تغییر کلی در تعداد مولکول‌های NADH و NAD^+ یا حد واسطهای آسپارتات یا مالات شاتل مشاهده نمی‌گردد. علی‌رغم این در سیتوزول، NADH به NAD^+ و در ماتریکس، NAD^+ به NADH تبدیل می‌گردد تا به ترتیب در گیکولیز و تولید ATP در مراحل **III** و **IV** مورد استفاده قرار گیرند.

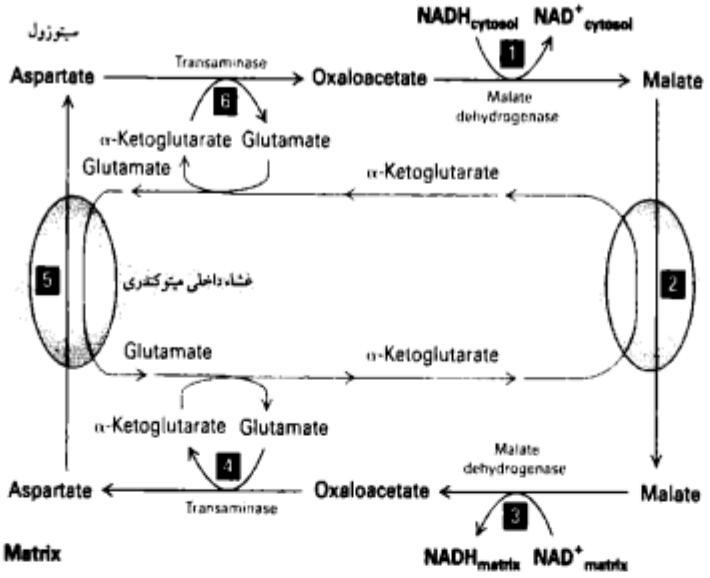
$$\underset{\text{سیتوزول}}{NADH} + \underset{\text{ماتریکس}}{NAD^+} \rightarrow \underset{\text{سیتوزول}}{NAD^+} + \underset{\text{ماتریکس}}{NADH}$$



▲ **شکل ۱۰ـ۱۲ چرخه اسید سیتریک.** استیل CoA به CO_2 و حامل‌های الکترونی پر انرژی NADH و $FADH_2$ تبدیل می‌شود. در واکنش ۱، یک ریشه دو کربنه استیل از استیل CoA با مولکول چهار کربنه اگزالات ترکیب شده و سیترات ۶کربنه را به وجود می‌آورد. در بقیه واکنش‌ها (۲ـ۹) مولکول‌های سیترات سرانجام به اگزالواستات تبدیل می‌شود و طی این فرایند دو مولکول CO_2 از دست می‌دهد. در هر دور چرخه، چهار جفت الکترون از اتم‌های کربن برداشته شده و سه مولکول NADH و یک مولکول $FADA_2$ و یک مولکول GTP ساخته می‌شود. دو اتم کربنی که به صورت استیل CoA وارد چرخه می‌شود به رنگ آبی در سوکسینیل CoA نشان داده شده است. در سوکسینات و فومارات، که مولکول‌های متقارنی هستند، نمی‌توان آنها را به‌طور ویژه مشخص کرد. در مطالعاتی که با نشاندار کردن ایزوتوپی انجام شده است، مشخص شده است که اتم‌های کربن استیل CoA در دور اول چرخه به صورت CO_2 از دست نمی‌روند بلکه یک اتم در دور بعدی و دیگری در دوره‌های بعدی از دست می‌رود.

جدول ۱ـ۱۲ فرآورده خالص مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک

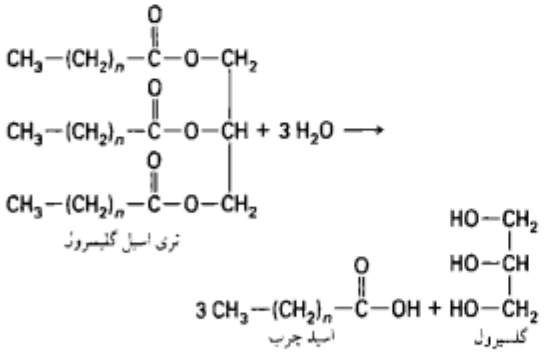
واکنش	تعداد مولکول‌های CO_2 تولید شده	تعداد مولکولهای NAD^+ احیاء شده به NADH	تعداد مولکولهای FAD احیاء شده به $FADH_2$	ATP(یاGTP)
یک مولکول گلوکز به ۲- مولکول پیروات	۰	۲	۰	۲
دو مولکول پیروات به ۲ مولکول استیل کوآ	۲	۲	۰	۰
دو مولکول استیل کوآ به ۴ مولکول CO_2	۴	۶	۲	۲
جمع	۶	۱۰	۲	۴



▲ **شکل ۱۱ـ۱۲ (شکل رنگی) شاتل مالات.** در این واکنش‌های چرخه‌ای، الکترون‌ها از NADH سیتوزولی (فضای بین غشایی) به NAD^+ موجود در ماتریکس منتقل شوند. نتیجه نهایی، تبدیل NADH به NAD^+ در سیتوزول و NAD^+ به NADH در ماتریکس می‌باشد. مرحله ❶: مالات دهیدروژناز سیتوزولی الکترون‌ها را از NADH سیتوزولی به اگزالوستات منتقل کرده و تشکیل مالات می‌دهد. مرحله ❷: آنتی‌پورتر موجود در غشای داخلی (بیضی آبی رنگ) مالات را در مبادله با α ـ کتوگلوتارات به داخل ماتریکس انتقال می‌دهد. مرحله ❸: مالات دهیدروژنات میتوکندریایی مالات را به اگزالواستات تبدیل می‌کند و طی این فرایند NAD^+ به NADH تبدیل می‌گردد. مرحله ❹: اگزالواستات که مستقیماً از غشاء داخلی نمی‌تواند عبور کند با اضافه شدن یک گروه آمینو از گلوتامات به α ـ کتوگلوتارات تبدیل می‌گردد. مرحله ❺: آنتی‌پورتردوم (بیضی قرمز رنگ) آسپارتات را در مبادله با گلوتامات به سیتوزول انتقال می‌دهد. مرحله ❻: ترانس آمیناز سیتوزولی آسپارتات را به اگزالواستات و α ـ کتوگلوتارات را به گلوتامات تبدیل کرده و چرخه را کامل می‌کند. فلش‌های آبی رنگ حرکت α ـ کتوگلوتارات، فلش‌های قرمز رنگ حرکت گلوتامات و فلش‌های سیاه رنگ آسپارتات / مالات را نشان می‌دهد. توجه شود که آسپارتات و مالات بصورت ساعت گرد و گلوتامات و α ـ کتوگلوتارات به صورت پادساعت‌گرد چرخش می‌کنند.

اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری باعث تولید ATP می‌شود

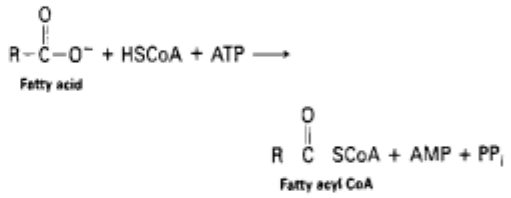
تا به حال درباره اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها، اساساً گلوکز، در تولید ATP متمرکز شدیم. اسیدهای چرب منابع مهم دیگر انرژی سلولی می‌باشند. سلول‌ها می‌توانند به کمک پروتئین‌های ناقل ویژه‌ای هم گلوکز و هم اسید چرب را از محیط خارج سلولی جذب کنند (فصل ۱۱). هر گاه سلولی نیاز به سوزاندن سریع این مولکول‌ها نداشته باشد، آنها را به صورت پلیمرهای گلوکز که گلیکوژن نامیده می‌شود (در عضله یا کبد)، و یا به صورت تریمرهای اسید چرب که به گلیسرول متصل شده است و **تری‌گلیسرول** یا **تری‌گلیسرید** نامیده می‌شود& ذخیره می‌کند. در برخی سلول‌ها گلوکز مازاد به اسید چرب تبدیل شده و به حالت تری‌اسیل گلیسرول ذخیره می‌گردد. با وجود این، بر خلاف میکروارگانیسم‌ها، جانوران قادر به تبدیل اسیدهای چرب به گلوکز نمی‌باشند. زمانی که سلول‌ها نیاز به انرژی دارند برای مثال وقتی عضله شروع به فعالیت می‌کند، آنزیم‌های ویژه‌ای گلیکوژن را به گلوکز و یا تری‌اسیل گلیسرول را به اسید چرب هیدرولیز می‌کنند، که اکسید شده و در نهایت ATP تولید می‌کنند.



اسیدهای چرب منبع مهم انرژی برای بسیاری از بافت‌ها مخصوصاً عضله قلب بالغین می‌باشد. در انسان‌ها، به منظور تولید ATP، اکسیداسیون چربی از نظر کمیّت مهم‌تر از اکسیداسیون گلوکز می‌باشد. اکسیداسیون ۱ گرم تری‌اسیل گلیسرول به CO_2 تقریباً ۶ برابر بیشتر از اکسیداسیون یک گرم گلیکوژن آبدار، ATP تولید می‌کند. بنابراین تری‌گلیسریدها در ذخیره انرژی از کارایی بالاتری برخوردارند زیرا آنها به صورت بی‌آب ذخیره می‌شوند و در هنگام

سوختن به دلیل این‌که به‌طور ذاتی از کربوهیدرات‌ها احیاترند (هیدروژن بیشتری دارند) می‌توانند انرژی بیشتری تولید کنند. در پستانداران مکان اصلی ذخیره تری‌گلیسریدها بافت چربی (آدیپوز) است در حالی که مکان اصلی ذخیره گلیکوژن عضلات و کبد می‌باشد.

همانند اکسیداسیون گلوکز، در اکسیداسیون اسید چرب نیز ۴ مرحله وجود دارد. به منظور بهینه‌سازی کارایی تولید ATP، بخشی از مرحله II (اکسیداسیون استیل CoA در چرخه اسید سیتریک) و تمام مراحل III و IV اکسیداسیون اسید چرب شبیه اکسیداسیون گلوکز می‌باشد. تنها تفاوت‌های موجود مربوط به مرحله I سیتوزولی و بخش اول مرحله II میتوکندریایی می‌باشد. در مرحله I، اسیدهای چرب در سیتوزول به اسیل چرب CoA تبدیل می‌گردد. در طی این واکنش ATP به AMP و PP_i (پیروفسفات معدنی) تبدیل می‌شود (شکل ۸ـ۱۲ را ملاحظه کنید):



هیدرولیز بعدی PP_i به دو مولکول P_i باعث تکمیل شدن این واکنش می‌گردد. گروه اسیل چرب به منظور انتقال به ماتریکس میتوکندری نیاز به مولکولی به نام کارنیتین دارد. گروه اسیل چرب به صورت متصل به کارنیتین توسط پروتئین ناقل اسیل کارنیتین[1] از غشای داخلی میتوکندری عبور کرده (شکل ۸ـ۱۲، بیضی آبی) و سپس در سمت ماتریکس، گروه اسیل چرب از کارنیتین آزاد شده و دوباره به یک مولکول دیگر CoA متصل می‌گردد. فعالیت ناقل اسیل کارنیتین تنظیم می‌گردد تا هنگامی که سلول‌ها ATP کافی دارند از اکسیداسیون اسیدهای چرب ممانعت گردد.

در بخش اول مرحله II، هر مولکول اسیل چرب CoA در میتوکندری طی چهار واکنش تکراری که در آن اتم‌های کربن به استیل CoA تبدیل می‌گردد، اکسید می‌شود. طی این واکنش‌ها به همراه تولید استیل CoA، $FADH_2$ و NADH تولید می‌گردد (شکل ۱۲ـ۱۲ a). برای مثال، اکسیداسیون میتوکندریایی هر مولکول اسید استئاریک ۱۸ کربنه ، $CH_3(CH_2)_{16}COOH$، ۹ مولکول استیل CoA و ۸ مولکول NADH و $FADH_2$ تولید می‌کند. در بخش دوم مرحله II، همانند استیل CoA تولید شده از پیروات، این گروه‌های استیل به چرخه اسید سیتریک وارد شده و به CO_2 تبدیل می‌شوند. در بخش بعد توضیح داده خواهد شد که NADH و $FADH_2$ دارای الکترون‌های پر انرژی، در مرحله III تولید نیروی محرکه پروتونی، که به نوبه خود در مرحله IV به منظور تولید سنتز ATP استفاده خواهد شد، مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

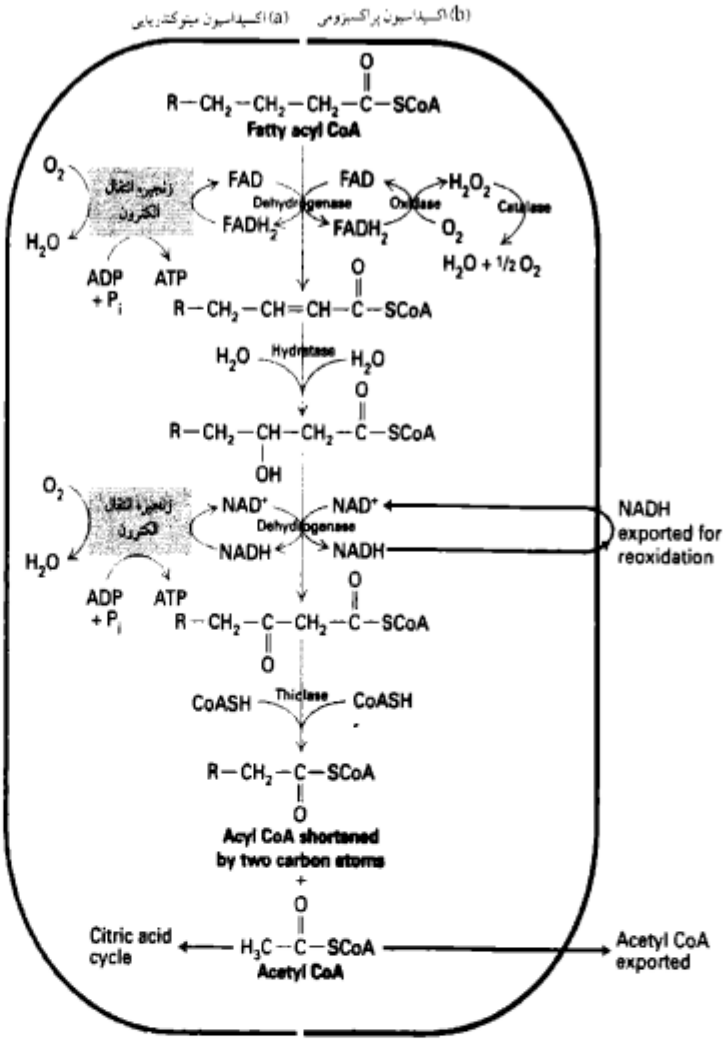
اکسیداسیون پراکسیزومی اسیدهای چرب در پراکسیزوم‌ها ATP تولید نمی‌کند

اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری منبع مهم ATP در سلول‌های کبد پستانداران می‌باشد، و بیوشیمیست‌ها معتقدند که این پدیده در تمام انواع سلولها نیز صادق است. با وجود این، در رَت‌هایی که با کلوفیبرات، دارویی که متابولیسم لیپیدها را تغییر می‌دهد، تیمار شدند مشخص شد که میزان اکسیداسیون اسیدهای چرب و تعداد پراکسیزوم‌ها در سلول‌های کبد آنها افزایش یافت. این یافته‌ها نشان داد که پراکسیزوم‌ها مانند میتوکندری‌ها می‌توانند اسیدهای چرب را اکسید کنند. این اندامک‌های کوچک که تقریباً ۰/۲ـ۱μm قطر دارند توسط یک غشای واحد احاطه شده‌اند (شکل ۹ـ۴ را ملاحظه کنید). آنها در تمام سلول‌های پستانداران به جز اریتروسیت‌ها یافت می‌گردند و همچنین در سلول‌های گیاهان، مخمرها و احتمالاً بیشتر سلول‌های یوکاریوتی نیز وجود دارند.

میتوکندری‌ها ترجیحاً، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (زنجیره اسیل چرب کم‌تر از ۸ کربنه یا C_8>)، متوسط (C_8-C_{12}) و طویل (C_{14}-C_{20}) را اکسید می‌کنند؛ در حالی که پراکسیزوم‌ها ترجیحاً اسیدهای چرب با زنجیره بسیار طویل (VLCFAs، C_{20}<)، که میتوکندری نمی‌تواند آنها را اکسید کند، اکسید می‌کنند. بیشتر اسیدهای چرب موجود در مواد غذایی از نوع اسیدهای چرب با زنجیره طویل هستند، بنابراین می‌توانند در میتوکندری اکسید گردند. بر خلاف اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری که با تولید ATP همراه است، در اکسیداسیون پراکسیزومی اسیدهای چرب، ATP تشکیل نمی‌شود بلکه انرژی به صورت گرما آزاد می‌گردد.

مسیرهای واکنشی که طی آن اسیدهای چرب در پراکسیزوم‌ها به استیل CoA تجزیه می‌گردد مشابه مسیرهای موجود در میتوکندری‌ها می‌باشد (شکل ۱۲ـ۱۲ b). با وجود این پراکسیزوم‌ها فاقد زنجیره انتقال الکترون هستند و الکترون‌های $FADH_2$ تولید شده طی اکسیداسیون اسیدهای چرب فوراً توسط *اکسیدازها* به O_2 منتقل شده و FAD و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می‌نمایند.

1- Acylcarintine transporter protein



◀شکل ۱۲-۱۲ اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری‌ها و پراکسیزوم‌ها. در هر دو اکسیداسیون میتوکندریایی (a) و اکسیداسیون پراکسیزومی (b)، اسیدهای چرب توسط مجموعه‌ای از چهار واکنش آنزیمی (در وسط تصویر نشان داده شده است) به استیل CoA تبدیل می‌گردد. مولکول اسیل چرب CoA به استیل CoA تبدیل می‌شود و باقیمانده آن دو اتم کربن کوتاه‌تر شده است. به همراه این واکنش‌ها یک مولکول FAD به $FADH_2$ و یک مولکول NAD^+ به NADH احیا می‌گردد. کوتاه شدن اسیل CoA تا زمانی که اسید چرب کاملاً به استیل CoA تبدیل شود و یا به تعداد اتم‌های کربن فرد برسد، ادامه می‌یابد. در میتوکندری‌ها الکترون‌های $FADH_2$ و NADH وارد زنجیره انتقال الکترون می‌شوند و سرانجام در تولید ATP مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ استیل CoA تولید شده، در چرخه اسید سیتریک اکسید شده و تولید ATP و CO_2 می‌کند. به دلیل این‌که پراکسیزوم‌ها فاقد کمپلکس‌های انتقال الکترون، که از زنجیره انتقال الکترون و آنزیم‌های چرخه اسید سیتریک تشکیل شده است، می‌باشد. اکسیداسیون اسیدهای چرب در این اندامک‌ها به تولید ATP منجر نمی‌گردد.

پراکسیزوم‌ها علاوه بر اکسیدازها سرشار از *کاتالاز* نیز می‌باشند که‌سریعاً H_2O_2 بسیار سیتوتوکسیک را تجزیه می‌کند. NADH تولید شده در اکسیداسیون اسیدهای چرب به سیتوزول رفته و در آنجا اکسید می‌گردد؛ و نیازی به وجود شاتل مالات / آسپارتات نمی‌باشد. هم‌چنین پراکسیزوم‌ها فاقد چرخه اسید سیتریک هستند، بنابراین استیل CoA تولید شده در تجزیه پراکسیزومی اسیدهای چرب نمی‌تواند بیشتر اکسید گردد؛ و به جای آن به سیتوزول منتقل شده و در سنتز کلسترول (فصل ۱۰) و سایر متابولیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۲

مرحله اول کاتابولیسم گلوکز و اسید چرب: گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک

- در فرایندی بنام اکسیداسیون هوازی، سلول‌ها انرژی آزادشده از اکسیداسیون (سوخت) گلوکز یا اسیدهای چرب را به پیوند فسفوانیدریدی انتهای مولکول ATP تبدیل می‌کنند.
- در اکسیداسیون هوازی هر مولکول گلوکز، شش مولکول CO_2 و تقریباً ۳۰ مولکول ATP تولید می‌شود. کل فرایند که از سیتوزول آغاز و به میتوکندری ختم می‌شود، را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد: (۱) گلیکولیز به پیروات در سیتوزول، (۲) اکسیداسیون پیروات به CO_2 در میتوکندری،

(۳) انتقال‌الکترونی به منظور تولید نیروی محرکه پروتونی و تبدیل اکسیژن مولکولی به آب، و (۴) سنتز ATP.

■ میتوکندری دارای دو غشاء متفاوت (غشای داخلی و خارجی) و دو زیربخش متفاوت (فضای بین غشایی و ماتریکس) می‌باشد. اکسیداسیون هوازی در ماتریکس میتوکندریایی روی غشای داخلی میتوکندری رخ می‌دهد.

■ در هر چرخه از اسیدسیتریک دو مولکولی CO_2، سه مولکول NADH، یک مولکول $FADH_2$ ، و یک GTP تولید می‌شود.

■ در گلیکولیز (مرحله ۱)، آنزیم‌های سیتوزولی گلوکز را به دو مولکول پیروات تبدیل کرده و دو مولکول ATP و دو مولکول NADH تولید می‌کند.

■ سرعت اکسیداسیون گلوکز در گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک بر حسب نیاز سلول به ATP توسط آنزیم‌ها مهار یا تحریک می‌شود. زمانیکه ATP زیاد است گلوکز به صورت گلیکوژن یا چربی ذخیره می‌شود.

■ مقداری از انرژی آزادشده طی مراحل اولیه اکسیداسیون موقتاً در کوآنزیم‌های احیایی NADH و $FADH_2$ ذخیره می‌شود تا بعداً توسط الکترونهای پرانرژی خودشان زنجیره انتقال الکترون را پیش ببرند (مرحله ۳)

■ در عدم حضور اکسیژن (شرایط بی‌هوازی)، سلول پیروات را به لاکتات یا (در مورد مخمر) به اتانول و CO_2 تبدیل می‌کند. طی این فرایند NADH به NAD^+ تبدیل می‌شود که برای ادامه گلیکولیز ضروری است. در شرایط هوازی (در حضور اکسیژن)، پیروات به میتوکندری که در آنجا واکنش‌های مراحل ۲ تا ۴ رخ می‌دهد، منتقل می‌شود.

■ در مرحله ۲، مولکول پیروات سه کربنه ابتدا به یک مولکول CO_2، NADH، و استیل کوآنزیم A اکسید می‌شود. سپس استیل کوآنزیم A در چرخه اسیدسیتریک به CO_2 اکسید می‌شود.

■ اکسیژن مولکولی مستقیماً در گلیکولیز (مرحله ۱) و در چرخه اسید سیتریک (مرحله ۲) مورد استفاده قرار نمی‌گیرد.

■ شاتل مالات/آسپارتات NAD^+ سیتوزولی لازم برای ادامه گلیکولیز را فراهم می‌کند.

■ همانند اکسیداسیون گلوکز، اکسیداسیون اسیدهای چرب نیز چهار مرحله دارد. در مرحله ۱، اسیدهای چرب در سیتوزول به اسیل چرب CoA تبدیل می‌شود. در مرحله ۲، اسیل چرب CoA به چند مولکول استیل CoA تبدیل می‌شود که طی آن NADH و $FADH_2$ نیز تولید می‌شود. سپس مانند اکسیداسیون گلوکز، استیل CoA وارد چرخه اسید سیتریک می‌شوند. مراحل ۳ و ۴ در اکسیداسیون اسید چرب و گلوکز مشابه و یکسان می‌باشند.

■ در بیشتر سلول‌های یوکاریوتی اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و طویل در میتوکندری رخ می‌دهد و طی آن ATP تولید می‌شود در حالیکه اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره خیلی طویل در پراکسیزوم‌ها صورت می‌گیرد و ATP تولید نمی‌شود بلکه انرژی آزادشده به گرما تبدیل می‌شود.

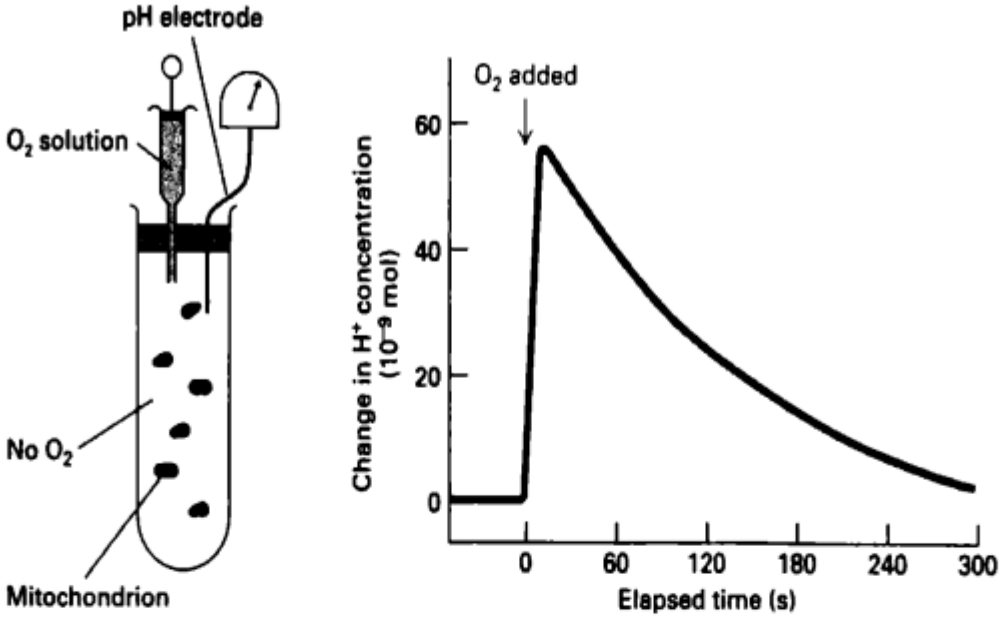
۱۲.۲ زنجیره انتقال الکترون و تولید نیروی محرکه پروتونی

بیشتر انرژی آزاد شده از اکسیداسیون گلوکز و اسیدهای چرب به CO_2 (مراحل I و II) به الکترون‌های پر انرژی در کوآنزیم‌های احیایی NADHd و $FADH_2$ تبدیل می‌گردد. ما اکنون به مرحله III بر می‌گردیم که در آن انرژی ذخیره شده در این کوآنزیم‌ها توسط زنجیره انتقال الکترون، به نام زنجیره تنفسی، به نیروی محرکه پروتونی تبدیل می‌گردد. ابتدا منطق و اجزای زنجیره انتقال الکترون و پمپ شدن پروتون‌ها را از عرض غشای داخلی توضیح می‌دهیم. سرانجام این بخش را با بحث مقدار نیروی محرکه پروتونی تولید شده توسط انتقال الکترون و پمپ پروتون خاتمه می‌دهیم. در بخش بعدی مرحله IV که بر روی ساختار سنتز ATP متمرکز شده است و این‌که چگونه آن از نیروی محرکه پروتون در سنتز ATP استفاده می‌کند، را بحث می‌کنیم.

انتقال الکترون بصورت مرحله‌ای، انرژی ذخیره شده در NADH و $FADH_2$ را باکارایی بیشتری آزاد می‌کند

در انتقال الکترون، الکترون‌ها از NADH و $FADH_2$ آزاد شده، سرانجام به O_2 می‌رسند و مطابق واکنش زیر H_2O تولید می‌کنند.

$$NADH + H^+ + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O,$$
$$\Delta G = -52/6 kcal/mol$$
$$FADH_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow FAD^+ + H_2O,$$
$$\Delta G = -43/4 kcal/mol$$



▲ **شکل تجربی ۱۳ـ۱۲ انتقال الکترون از NADH به O_2 با انتقال پروتون از عرض غشای میتوکندریایی همراه شده است.** هر گاه NADH به سوسپانسیون میتوکندری‌های بدون O_2 اضافه گردد، هیچ NADHای اکسید نمی‌گردد. هر گاه مقدار کم تری O_2 به سیستم اضافه گردد (فلش)، افزایش شدیدی در غلظت پروتونی محیط خارج از میتوکندری به وجود می‌آید (کاهش pH). بنابراین اکسیداسیون NADH توسط O_2 با حرکت پروتون به خارج از ماتریکس همراه شده است. وقتی که O_2 حذف می‌شود، پروتون‌های مازاد به آهستگی به میتوکندری بر می‌گردند (سنتز ATP را باعث می‌شود) و pH محیط خارج سلولی به مقدار اولیه خود بر می‌گردد.

به خاطر بیاورید که تبدیل ۱ مولکول گلوکز به CO_2 طی مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک باعث تولید ۱۰ مولکول NADH و ۲ مولکول $FADH_2$ می‌گردد (جدول ۱ـ۱۲ را ملاحظه کنید). اکسیداسیون این کوآنزیم‌های احیایی دارای $\Delta G^{\circ\prime}$ کلی kcal/mol ۶۱۳-، [(۴۳/۴-)۲+ (۵۲/۶-)۱۰] می‌باشند. بنابراین پتانسیل انرژی آزاد موجود در پیوندهای شیمیایی گلوکز (۶۸۶ kcal/mol-)، تقریباً ۹۰٪ در کوآنزیم‌های احیایی حفظ شده‌اند. چرا بایستی دو کوآنزیم مختلف NADH و $FADH_2$ وجود داشته باشد؟ اگرچه بسیاری از واکنش‌های دخیل در اکسیداسیون گلوکز و اسیدهای چرب انرژی کافی برای احیا NAD^+ را دارند، اما تمامی آنها قادر به این کار نیستند و انرژی کم‌تری دارند، بنابراین این واکنش‌ها با FAD جفت شده‌اند که به منظور احیا خود نیاز به انرژی کم‌تری دارد.

انرژی حمل شده در کوآنزیم‌های احیایی با اکسید شدن آنها آزاد می‌گردد. مشکلی که در میتوکندری وجود دارد تبدیل کارای انرژی آزاد شده توسط این اکسیداسیون به انرژی موجود در پیوند فسفوانیدریدی انتهای مولکول ATP می‌باشد.

$$P_i^{2-} + H^+ + ADP^{3-} \rightarrow ATP^{4-} + H_2O\ ,$$
$$\Delta G = +7/3 \text{kcal/mol}$$

در واکنش‌های نسبتاً ساده که در آن احیا یک مولکول کوآنزیم و سنتز یک مولکول ATP رخ می‌دهد بسیار ناکارا خواهد بود زیرا $\Delta G^{\circ\prime}$ تولید ATP و P_i اساساً کم‌تر از اکسیداسیون کوآنزیم خواهد بود و مازاد انرژی به صورت گرما از دست خواهد رفت. به منظور جلوگیری از هدر رفتن انرژی، در میتوکندری ابتدا انرژی حاصل از اکسیداسیون کوآنزیم توسط مجموعه‌ای از حامل‌های الکترونی، به نیروی محرکه پروتون تبدیل می‌گردد. به جز یکی از اجزای مجموعه حامل الکترونی، تمامی آنها از اجزای سراسری غشاء داخلی می‌باشند.

انتقال الکترون در میتوکندری‌ها با پمپ کردن پروتون همراه شده است

در انتقال الکترون از NADH و $FADH_2$ به O_2، پروتون‌ها از مکان‌های مختلف ماتریکس میتوکندری به بیرون از غشای داخلی

پمپ می‌شوند؛ بنابراین طی این عمل شیب غلظت پروتونی و شیب الکتریکی در عرض غشای داخلی ایجاد می‌گردد (شکل ۱۲-۲ را ملاحظه کنید). پمپ شدن پروتون‌ها باعث می‌شود که pH ماتریکس میتوکندری از pH فضای بین غشایی و سیتوزولی بالاتر باشد (غلظت H^+ پایین‌تر می‌آید). به دلیل پمپ شدن H^+ به خارج از ماتریکس، در عرض غشا پتانسیل الکتریکی به وجود می‌آید و باعث می‌شود که ماتریکس نسبت به فضای بین غشایی منفی گردد. بنابراین انرژی آزاد شده از اکسیداسیون NADH و $FADH_2$ هم به صورت پتانسیل الکتریکی و هم به صورت شیب غلظت پروتونی در عرض غشاء داخلی (روی هم رفته نیروی محرکه پروتونی) ذخیره می‌گردد. همان‌طور که خواهیم دید برگشت پروتون‌ها از عرض غشای داخلی، به دلیل نیروی محرکه، با سنتز ATP از ADP و P_i توسط ATP سنتاز همراه شده است.

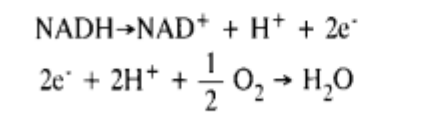
سنتز ATP از ADP و P_i، ناشی از انتقال الکترون‌ها (از NADH و $FADH_2$ به O_2)، منبع مهم ATP در سلول‌های هوازی غیرفتوسنتتیک می‌باشد. مدارک زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد در میتوکندری‌ها و باکتری‌ها این فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو، بستگی به تولید نیروی محرکه پروتونی در عرض غشای داخلی (میتوکندری‌ها) یا غشای پلاسمایی باکتری‌ها دارد. انتقال الکترون، پمپ کردن پروتون و تولید ATP همزمان رخ می‌دهد. برای مثال در آزمایشگاه، افزودن O_2 و سوبسترایی مثل پیروات یا سوکسینات به میتوکندری‌های سالم تنها زمانی منجر به سنتز ATP می‌گردد که غشای داخلی میتوکندری سالم باشد. در حضور مقادیر بسیار کم دترجنت که باعث سوراخ شدن غشاء می‌گردد، انتقال الکترون و اکسیداسیون این متابولیت‌ها توسط O_2 هنوز رخ می‌دهد. با وجود این، تحت این شرایط ATP ساخته نمی‌شود زیرا نشت پروتون مانع از حفظ شیب غلظت پروتون و پتانسیل الکتریکی بین غشایی می‌گردد.

جفت شدن انتقال الکترون از NADH (یا $FADH_2$) به O_2 و انتقال پروتون از عرض غشای داخلی میتوکندریایی را می‌توان به‌طور تجربی با میتوکندری‌های سالم جدا شده اثبات کرد (شکل ۱۳-۱۲). هرگاه به سوسپانسیون میتوکندری‌های موجود در یک محلول بدون O_2 که دارای NADH می‌باشد O_2 افزوده شود، محیط خارج میتوکندری به تدریج اسیدی می‌گردد (غلظت پروتون افزایش می‌یابد)، زیرا غشای خارجی به پروتون نفوذپذیر است (به خاطر داشته باشید که شاتل مالات / آسپارتات و سایر شاتل‌ها می‌توانند NADH موجود در محلول را به NADH ماتریکسی تبدیل کنند). زمانی که O_2 با احیا شدن تمام می‌شود، پروتون‌های مازاد محیط به آرامی به داخل ماتریکس نشت می‌کنند. با اندازه‌گیری تغییرات pH در این آزمایشات می‌توان محاسبه کرد که به ازای هر جفت الکترون منتقل شده از NADH به O_2 تقریباً ۱۰ پروتون به خارج از ماتریکس منتقل می‌گردد.

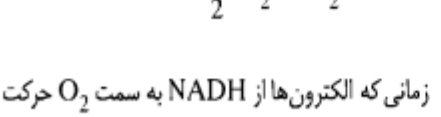
آزمایش بالا را می‌توان برای به دست آوردن تعداد $FADH_2$، تکرار کرد، اما به جای NADH از سوکسینات بایستی به عنوان سوبسترا استفاده کرد (به یاد بیاورید که اکسیداسیون سوکسینات به فومارات در چرخه سیتریک $FADH_2$ تولید می‌کند؛ شکل ۱۰-۱۲ را ملاحظه کنید). مقدار سوکسینات را می‌توان طوری تنظیم کرد که مقدار $FADH_2$ تولید شده برابر با مقدار NADH موجود در آزمایش اول باشد. مانند آزمایش اول، اضافه کردن اکسیژن باعث می‌گردد که محیط خارج میتوکندری اسیدی گردد، اما اسیدیته آن کم‌تر از وقتی است که NADH استفاده شد. این نتیجه شگفت‌انگیز نیست زیرا الکترون‌های موجود در $FADH_2$ انرژی پتانسیل کم‌تری (۴۳/۴ kcal/mol) از الکترون‌های موجود در NADH (۵۲/۶ kcal/mol) دارد، و بنابراین باعث انتقال پروتون کم‌تری نسبت به NADH از ماتریکس به فضای بین دو غشاء می‌گردد و در نتیجه تغییر کم‌تری در pH به وجود می‌آورد.

الکترون‌ها از طریق چهار کمپلکس چند پروتئینی از $FADH_2$ و NADH به O_2 جریان می‌یابند

اکنون ما حرکت الکترون‌ها را از NADH و $FADH_2$ به پذیرنده نهایی الکترون، O_2، بررسی می‌کنیم. برای سادگی، روی $NADH_2$ بحث می‌کنیم. در میتوکندری‌های در حال تنفس، هر مولکول NDAH دو الکترون به زنجیره انتقال الکترون آزاد می‌کند؛ این الکترون‌ها در نهایت یک اتم اکسیژن (نصف مولکول O_2) را احیا کرده و یک مولکول آب تولید می‌کنند.

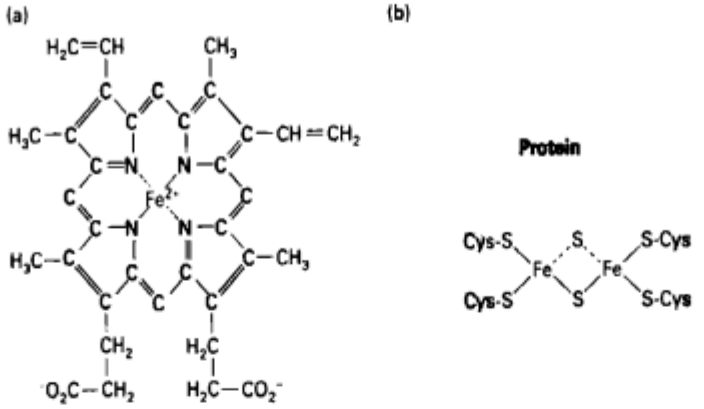


$$NADH \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^-$$



$$2e^- + 2H^+ + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$$

زمانی که الکترون‌ها از NADH به سمت O_2 حرکت می‌کنند پتانسیل آنها به اندازه ۱/۱۴ V کاهش می‌یابد که معادل با ۲۶/۲ kcal/mol الکترون، یا ۵۳ kcal/mol برای یک جفت الکترون منتقل شده، می‌باشد. همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، بیشتر این انرژی به صورت نیروی محرکه پروتونی در عرض غشای داخلی



▲ **شکل ۱۴ـ۱۲(شکل رنگی) هِم و گروه‌های پروستتیک آهن ـ سولفور موجود در زنجیره انتقال الکترون.** (a) بخش هِم سیتوکروم‌های b_L و b_H که جزو $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III) می‌باشند. حلقه پورفیرینی یکسانی (زرد) در تمام هِم‌ها موجود می‌باشد. استخلاف‌های شیمیایی که به حلقه پورفیرینی متصل شده‌اند در سیتوکروم‌های موجود در زنجیره انتقال الکترون متفاوت هستند. تمامی هِم‌ها الکترون را به‌طور جداگانه می‌پذیرند و آزاد می‌کنند (b) مجموعه[1] آهن ـ سولفور دیمر (Fe-S). هر اتم آهن به ۴ اتم گوگرد متصل شده است: دو تا از اتم‌های گوگرد سولفور معدنی هستند و دوتا از آنها سولفور موجود در زنجیره جانبی اسیدآمینه سیستئین موجود در پروتئین می‌باشد. تمام مجموعه‌های Fe-S الکترون را به‌طور جداگانه پذیرفته و آزاد می‌کنند.

جدول ۲ـ۱۲ گروه‌های پروستتیک حامل الکترون در زنجیره تنفسی

PROTEIN COMPONENT	PROSTHETIC GROUPS*
NADH-CoQ reductase (complex I)	FMN Fe-S
Succinate-CoQ reductase (complex II)	FAD Fe-S
$CoQH_2$-cytochrome *c* reductase (complex III)	Heme b_L Heme b_H Fe-S Heme c_1
Cytochrome *c*	Heme *c*
Cytochrome *c* oxidase (complex IV)	Cu_a^{2+} Heme *a* Cu_b^{2+} Heme a_3

میتوکندریایی حفظ می‌گردد.

چهار کمپلکس چند پروتئینی بزرگ در زنجیره انتقال الکترون وجود دارد که در غشای داخلی میتوکندری قرار گرفته‌اند: NADH-CoQ ردوکتاز (**کمپلکس I**، ۴۰ < زیر واحد)، سوکسینات CoQ ردوکتاز (**کمپلکس II**، ۴ زیر واحد)، $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (**کمپلکس III**، ۱۱ زیر واحد) و سیتوکروم C اکسیداز (**کمپلکس IV**، ۱۳ زیر واحد). الکترون‌های NADH از کمپلکس I به سمت III و از IV به سمت III حرکت کرده و کمپلکس II را رد می‌کنند؛ الکترون‌های $FADH_2$ از کمپلکس II به سمت III و IV حرکت کرده و کمپلکس I را رد می‌کنند (شکل ۸ـ۱۲ را ملاحظه کنید).

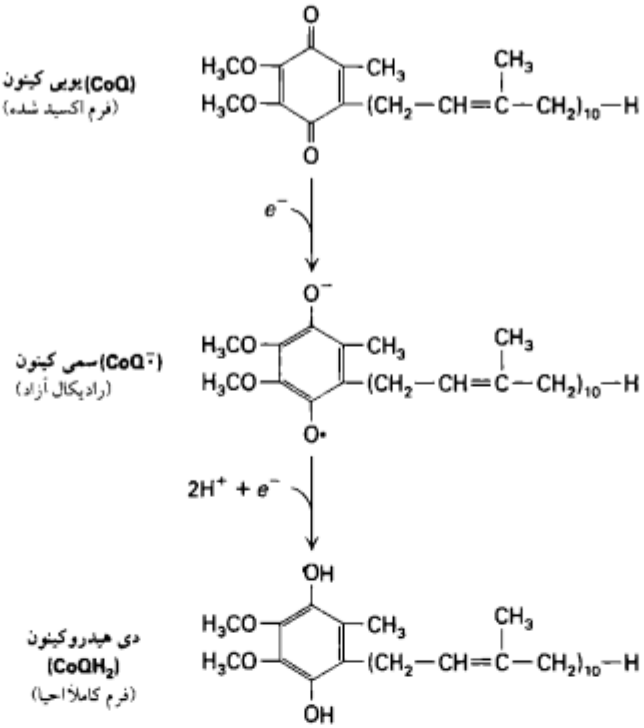
هر کمپلکس دارای چند **گروه پروستتیک** می‌باشد که در حرکت الکترون‌ها مشارکت می‌کنند. این مولکول‌های آلی غیرپپتیدی کوچک یا یون‌های فلزی، شدیداً و به‌طور ویژه به کمپلکس‌های چند پروتئینی متصل شده‌اند.

هِم و سیتوکروم‌ها. انواعی از هِم‌ها، گروه پروستتیک دارای آهن شبیه به آنچه که در هموگلوبین و میوگلوبین یافت می‌شود (شکل a ۱۴ـ۱۲)، به‌طور محکم (کووالان یا غیرکووالان) به یک سری از پروتئین‌های میتوکندریایی که **سیتوکروم** نامیده می‌شوند متصل شده‌اند. سیتوکروم با حروف a، b، c یا c_1 نشان داده می‌شوند. حرکت الکترون‌ها از طریق سیتوکروم‌ها به وسیله اکسیداسیون و احیا اتم آهن موجود در مرکز مولکول هِم رخ می‌دهد.

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

به دلیل این‌که حلقه هِم موجود در سیتوکروم‌ها دارای اتم‌هایی با

1- Cluster



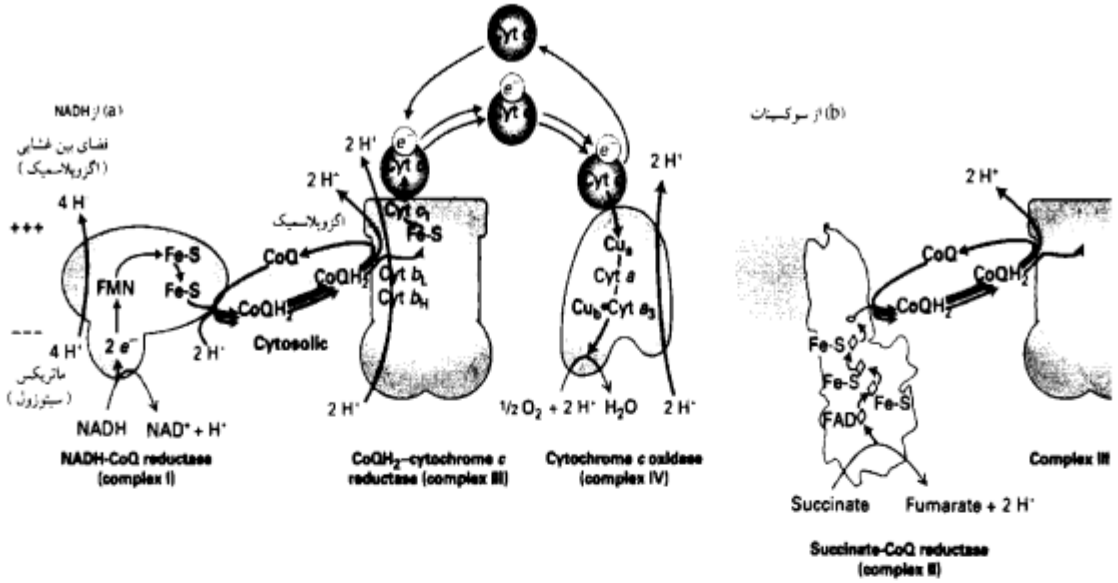
▲ **شکل ۱۵ـ۱۲ اشکال اکسید شده و احیایی کوانزیم Q (CoQ)، که می‌تواند دو پروتون و دو الکترون را می‌تواند حمل کند.** به دلیل «دم» هیدروکربنی طویل CoQ که از واحدهای ایزوپرنی تشکیل شده است این ترکیب در بخش هیدروفوب دو لایه فسفولیپیدی محلول و بسیار متحرک است. CoQ، یوبی‌کینون نیز نامیده می‌شود. احیا CoQ به شکل کاملاً احیایی آن، QH_2 (دی‌هیدروکینون) در دو مرحله و با واسطه نیمه احیایی از نوع رادیکال آزاد که سمی کنیون نامیده می‌شود، اتفاق می‌افتد.

پیوند دوگانه، و یگانه می‌باشد، اشکال هیبرید رزونانسی در آنها یافت می‌شود. این عمل باعث می‌شود که الکترون‌های اضافی که به سیتوکروم‌ها می‌رسند از طریق اتم‌های کربن و نیتروژن و یون آهن موجود در هم نیز جابه‌جا شوند.

سیتوکروم‌های متنوع دارای گروه هِم و اتم‌های نسبتاً متفاوت (بنام لیگاندهای محوری) هستند، که محیط‌های متفاوتی را برای یون آهن فراهم می‌کنند. بنابراین، هر سیتوکروم دارای پتانسیل احیایی یا تمایل به پذیرفتن الکترون متفاوتی می‌باشد ـ یک ویژگی مهم که باعث حرکت و جریان یک جهته الکترون «نزولی» در زنجیره می‌گردد. درست مثل آب که به‌طور خود به‌خودی از حالت انرژی پتانسیل بیشتر به انرژی پتانسیل کم‌تر حرکت می‌کند ـ در حالیکه بصورت صعودی نمی‌تواند جریان یابد ـ بنابراین در مورد الکترون‌ها نیز، به دلیل اختلاف پتانسیل احیایی تنها در یک جهت از یک هِم (یا گروه پروستتیک دیگری) به هِم دیگری جریان می‌یابند. همه سیتوکروم‌ها، به جز سیتوکروم C، از اجزای کمپلکس‌های چند پروتئینی غشایی موجود در غشای داخلی میتوکندریایی محسوب می‌گردند.

مجموعه‌های آهن ـ سولفور. مجموعه‌های آهن ـ سولفور، گروه‌های پروستتیک دارای آهن غیرهمی می‌باشند که در آن اتم‌های آهن به اتم‌های S معدنی و اتم‌های S موجود در سیستئین پروتئین متصل شده است (شکل b ۱۴ـ۱۲). بعضی از اتم‌های Fe موجود در مجموعه دارای بار ۲+ و بعضی دارای ۳+ می‌باشند. با وجود این، بار خالص هر اتم آهن در واقع بین ۲+ و ۳+ می‌باشد، زیرا الکترون‌های موجود در اربیتال‌های خارجی به همراه الکترون‌های اضافی رسیده از زنجیره انتقال، میان اتم‌های آهن پخش می‌شوند و سریعاً از یک اتم به اتم دیگر حرکت می‌کنند. مجموعه‌های آهن ـ سولفور الکترون‌ها را به‌طور جداگانه پذیرفته و آزاد می‌کنند.

کوآنزیم Q (CoQ). *کوآنزیم Q (CoQ)*، که **یوبی‌کینون** نیز نامیده می‌شود، تنها حامل الکترونی کوچک در زنجیره می‌باشد که یک گروه پروستتیک متصل به پروتئین نمی‌باشد (شکل ۱۵ـ۱۲). این کوآنزیم حامل هم پروتون‌ها و هم الکترون‌ها می‌باشد. شکل اکسید شده کینونی CoQ می‌تواند یک الکترون بپذیرد و سمی کینون تشکیل بدهد. سمی کینون یک رادیکال آزاد باردار است که بصورت $CoQ^{-\cdot}$ نشان داده می‌شود. افزودن یک الکترون دیگر و دو



▲ **شکل ۱۶ـ۱۲ (شکل رنگی) کمپلکس‌های چند پروتئینی و حامل‌های الکترونی متحرک زنجیره انتقال الکترون.** الکترون‌ها (فلش‌های آبی رنگ) از طریق چهار کمپلکس چند پروتئینی (I-IV) جریان می‌یابند. حرکت الکترونی در بین کمپلکس‌ها یا توسط مولکول محلول در چربی کوآنزیم Q (شکل اکسید آن CoQ و شکل احیایی آن $CoQH_2$ می‌باشد) و یا توسط پروتئین محلول در آب سیتوکروم c (Cytc) وساطت می‌گردد. کمپلکس چند پروتئینی از انرژی آزاد شده حاصل از عبور الکترون استفاده می‌کند تا پروتون‌ها را از ماتریکس به فضای داخل غشایی پمپ کند (فلش‌های قرمز). (a) مسیر NADH. الکترون‌ها از NADH به کمپلکس I، سپس III و در نهایت به IV جریان می‌یابند. به‌طور کلی ۱۰ پروتون به ازای هر جفت الکترون منتقل شده از NADH به O_2 انتقال می‌یابد. پروتون‌های آزاد شده به داخل فضای ماتریکسی در هنگام اکسیداسیون NADH توسط کمپلکس I در تشکیل آب از اکسیژن توسط کمپلکس IV مصرف می‌گردند، در نتیجه هیچ جابه‌جایی پروتونی از این واکنش‌ها حاصل نمی‌گردد. (b) مسیر سوکسینات. الکترون‌ها از سوکسینات (توسط $FADH_2$) موجود در کمپلکس II به سمت کمپلکس III و سپس IV جریان می‌یابند. الکترون‌های آزاد شده در هنگام اکسیداسیون سوکسینات به فومارات در کمپلکس II، بدون جابه‌جایی پروتون اضافی باعث احیا CoQ به $CoQH_2$ می‌شوند. مسیر باقی مانده انتقال الکترونی از $CoQH_2$ مشابه مسیر NADH نشان داده شده در (a) می‌باشد. بنابراین در انتقال هر جفت الکترون از سوکسینات به O_2، توسط کمپلکس‌های III و IV ۶ پروتون انتقال می‌یابد.

پروتون (بنابراین دو اتم هیدروژن کامل) به $CoQ^{-\circ}$ باعث تشکیل فرم کاملاً احیا آن یعنی دی‌هیدرو یوبی‌کینون ($CoQH_2$) می‌گردد. هم CoQ و هم $CoQH_2$ در فسفولیپیدها محلول هستند و آزادانه در مرکز هیدروفوبیک غشای داخلی میتوکندریایی انتشار می‌یابند. این عمل نشان می‌دهد که چگونه این کوآنزیم در زنجیره انتقال الکترون، الکترون‌ها و پروتون‌ها را بین کمپلکس‌ها حمل می‌کند.

همان‌گونه که در شکل ۶ـ۱۲ نشان داده شده است، CoQ الکترون‌های آزاد شده از NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I) یا سوکسینات ـ CoQ ردوکتاز (کمپلکس II) را گرفته و آنها را به $CoQH_2$ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III) تحویل می‌دهد. احیا و اکسیداسیون CoQ با پمپ شدن پروتون‌ها همراه شده است. CoQ الکترون‌ها را از سمت بخش ماتریکسی کمپلکس پروتئینی، که سیتوزولی نیز نامیده می‌شود، می‌پذیرد و آنها را در بخش فضای بین غشایی کمپلکس پروتئینی، که اگزوپلاسمیک نیز نامیده می‌شود، آزاد می‌کند. بنابراین انتقال هر جفت الکترون توسط CoQ به‌طور اجباری با حرکت دو پروتون از ماتریکس به مایع فضای بین غشایی جفت شده است.

NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I). الکترون‌ها توسط NADH-CoQ ردوکتاز از NADH به CoQ منتقل می‌گردند (شکل ۱۶ـ۱۲). در باکتری‌ها وزن این کمپلکس تقریباً ۵۰۰kDa (۱۴≃ زیرواحد) بوده در حالی که کمپلکس L- شکل یوکاریوتی 1MDa (۱۴ زیرواحد اصلی و حدود ۳۲ زیرواحد ضمیمه) می‌باشد. NAD^+ یک حامل دو الکترونی می‌باشد: آن یک جفت الکترون را به‌طور همزمان می‌گیرد و آزاد می‌کند. در NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I)، الکترون‌ها ابتدا از NADH به سمت FMN (فلاوین مونوکلئوتید)، کوفاکتور مربوط به FAD، جریان پیدا کرده، سپس به

مجموعه آهن ـ سولفور، و در نهایت به CoQ جریان پیدا می‌کنند. مانند FAD، FMN نیز می‌تواند دو الکترون بپذیرد، اما به‌طور همزمان نمی‌تواند هر دو الکترون را بگیرد بلکه هر الکترونی را جداگانه می‌گیرد.

هر الکترون منتقل شده متحمل کاهش پتانسیل به اندازه ۳۶۰mV ≃ می‌گردد که برابر با $\Delta G^{\circ\prime}$=-۱۶/۶ Kcal/mol برای دو الکترون منتقل شده است. بیشتر این انرژی آزاد شده صرف انتقال چهار پروتون از عرض غشای داخلی به ازای هر NADH اکسید شده توسط کمپلکس I می‌گردد. این چهار پروتون از دو پروتون منتقل شده به روی CoQ، که در واکنش شیمیایی بالا نشان داده شده است، متفاوت می‌باشد.

واکنش کلی کاتالیز شده توسط این کمپلکس عبارت است از:

$$\underset{\text{(احیا)}}{NADH} + \underset{\text{(اکسید)}}{CoQ} + 6H^{+}_{in} \rightarrow$$

$$\underset{\text{(اکسید)}}{NAD^{+}} + H^{+}_{in} + \underset{\text{(احیا)}}{CoQH_2} + 4H^{+}_{out}$$

سوکسینات ـ CoQ ردوکتاز (کمپلکس II). سوکسینات دهیدروژناز، آنزیمی است که یک مولکول سوکسینات را در چرخه اسید سیتریک (طی فرایندی که تولید کوآنزیم احیایی $FADH_2$ می‌کند) به فومارات اکسید می‌کند. این آنزیم یکی از چهار زیرواحد کمپلکس II می‌باشد. به این طریق چرخه اسید سیتریک به‌طور فیزیکی و عملکردی با زنجیره انتقال الکترون ارتباط دارد. دو الکترون آزاد شده در هنگام تبدیل سوکسینات به فومارات ابتدا به FAD موجود در سوکسینات دهیدروژناز، سپس به مجموعه‌های آهن ـ سولفور (دوباره FAD تولید می‌شود) و در نهایت به CoQ که به یک شکاف موجود در بخش ماتریکسی کمپلکس II متصل است، منتقل می‌گردد (شکل ۱۶ـ۱۲).

واکنش کلی کاتالیز شده توسط این کمپلکس به صورت زیر است:

$$\underset{\text{(احیا)}}{\text{سوکسینات}} + \underset{\text{(اکسید)}}{CoQ} \rightarrow \underset{\text{(اکسید)}}{\text{فومارات}} + \underset{\text{(احیا)}}{CoQH_2}$$

اگرچه $\Delta G^{\circ\prime}$ این واکنش منفی است، انرژی آزاد شده تنها برای احیای CoQ به $CoQH_2$ کافی است و برای پمپ کردن پروتون کافی نیست. سپس $CoQH_2$ از کمپلکس II جدا می‌گردد. بنابراین هیچ پروتونی مستقیماً به وسیله کمپلکس سوکسینات ـ CoQ ردوکتاز از عرض غشاء عبور نمی‌کند و در این بخش از زنجیره تنفسی هیچ نیروی محرکه پروتون تولید نمی‌شود. بعداً خواهیم دید که چگونه پروتون‌ها و الکترون‌های موجود در مولکول $CoQH_2$ تولید شده توسط کمپلکس I و کمپلکس II در تولید نیروی محرکه پروتونی مشارکت می‌کنند.

کمپلکس II از طریق واکنش‌های احیایی با واسطه $FAD/FADH_2$ باعث تولید $CoQH_2$ از سوکسینات می‌گردد. دسته دیگری از پروتئین‌های موجود در ماتریکس و غشای داخلی میتوکندریایی نیز واکنش‌های احیایی قابل مقایسه با واکنش‌های وساطت شده با $FAD/FADH_2$ را انجام می‌دهند تا از اسیل چرب CoA تولید $CoQH_2$ بکنند. ***اسیل چرب CoA دهیدروژناز*** که یک آنزیم محلول در آب است، مرحله اول اکسیداسیون اسیل چرب CoA را در ماتریکس میتوکندری کاتالیز می‌کند (شکل ۱۲ـ۱۲ را ملاحظه کنید). چندین آنزیم اسیل چرب CoA دهیدروژناز وجود دارد که هر کدام برای زنجیره‌های اسیل چرب با طول متفاوت ویژگی دارند. این آنزیم‌ها مرحله اول از فرایند چهار مرحله‌ای را کاتالیز می‌کنند و بواسطه اکسیداسیون کربن موجود در موقعیت β زنجیره اسیل چرب دو کربن از گروه اسیل چرب برمی‌دارند (به همین دلیل کل فرایند βـ اکسیداسیون نامیده می‌شود). در طی این واکنش‌ها استیل CoA تولید می‌گردد که به نوبه خود وارد چرخه اسید سیتریک می‌گردد. هم‌چنین در این واکنش‌ها حد واسطهای $FADH_2$ و NADH نیز تولید می‌گردد. در طی واکنش احیایی، $FADH_2$ تولید شده به صورت متصل به آنزیم مشابه مورد آنزیم موجود در کمپلکس II باقی می‌ماند. پروتئین محلول در آب به نام ***فلاوپروتئین ناقل الکترون*** (ETF) الکترون‌های پر انرژی را از $FADH_2$ موجود در اسیل CoA دهیدروژناز به فلاوپروتئین ناقل الکترون: یوبی‌کنیون اکسیدوردوکتاز (ETF:QO)، پروتئین غشایی که باعث احیا CoQ به $CoQH_2$ در غشاء داخلی می‌گردد، انتقال می‌دهد. این $CoQH_2$ با سایر مولکول‌های $CoQH_2$ تولید شده توسط کمپلکس‌های I و II در غشاء مخلوط می‌گردد.

$CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III). $CoQH_2$ تولید شده توسط کمپلکس I یا کمپلکس II (یا ETF:QO) دو الکترون به $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III) می‌دهد و مجدداً CoQ اکسید شده تولید می‌نماید. به همراه عمل فوق، آن باعث آزاد شدن دو پروتون برداشته شده در سطح ماتریکسی به فضای بین غشایی می‌گردد و بخشی از نیروی محرکه پروتونی را تولید می‌کند (شکل ۱۶ـ۱۲). در کمپلکس III، الکترون‌های آزاد شده ابتدا به یک مجموعه آهن ـ سولفور در کمپلکس III و سپس به سیتوکروم c_1 یا دو

سیتوکروم نوع b (b_L و b_H)، چرخه Q را در پایین ملاحظه کنید) منتقل می‌گردند. سرانجام دو الکترون به‌طور متوالی به دو مولکول سیتوکروم c اکسید شده، (پروتئین محیطی محلول در آب که در فضای بین غشایی انتشار می‌یابد) انتقال می‌یابند. به ازای هر جفت الکترونی که منتقل می‌گردد، واکنش کلی کاتالیز شده توسط کمپلکس $CoQH_2$ ـ سیتوکروم c ردوکتاز به صورت زیر است.

$$CoQH_2+2CytC^{3+}+2H^+_{in}\rightarrow CoQ+4H^+_{out}+2CytC^{2+}$$

(احیا) (اکسید) (اکسید) (احیا)

$\Delta G^{\circ\prime}$ این واکنش به اندازه کافی منفی است تا به ازای انتقال هر جفت الکترون، دو پروتون علاوه بر پروتون‌های $CoQH_2$ از ماتریکس میتوکندری به غشاء داخلی جابه‌جا شود؛ این کار چرخه Q محرکه پروتونی[1] را درگیر می‌کند که بعداً بحث شده است. پروتئین دارای هِم سیتوکروم C و مولکول کوچک محلول در چربی CoQ از این لحاظ که هر دو به عنوان شاتل‌های الکترونی متحرک عمل کرده و الکترون‌ها (انرژی) را بین کمپلکس‌های زنجیره انتقال الکترونی منتقل می‌کنند، نقش‌های مشابهی دارند.

سیتوکروم c اکسیداز (کمپلکس IV). سیتوکروم c بعد از احیا شدن توسط $CoQH_2$ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III)، الکترون‌ها را تک‌تک به سیتوکروم C اکسیداز (کمپلکس IV) انتقال می‌دهد و مجدداً اکسید می‌گردد (شکل ۱۶ـ۱۲). سیتوکروم C اکسیداز میتوکندریایی دارای ۱۳ زیر واحد مختلف است، اما هسته کاتالیتیکی آنزیم تنها از سه زیر واحد تشکیل شده است. عملکرد زیر واحدهای دیگر آنزیم هنوز کاملاً شناخته نشده است. سیتوکروم c اکسیداز باکتریایی تنها سه زیر واحد کاتالیتیکی دارد. چهار مولکول سیتوکروم C اکسید شده به‌طور جداگانه به اکسیداز متصل می‌گردند. الکترونی که از هِم هر سیتوکروم C انتقال می‌یابد، ابتدا به جفت یون‌های مس که Cu_a^{2+} نامیده می‌شود، سپس به هِم موجود در سیتوکروم a، و بعداً به Cu_a^{+2} و هِم موجود در سیتوکروم a_3 منتقل می‌شود که روی هم رفته به مرکز احیا الکترونی می‌رسد. الکترون‌ها سرانجام به O_2، پذیرنده نهایی الکترون می‌رسند و باعث تولید $4H_2O$ می‌گردند که به همراه CO_2 یکی از فراورده‌های نهایی مسیر اکسیداسیونی می‌باشد. حد واسطهای موجود در هنگام احیا اکسیژن شامل آنیون پراکسید (O_2^{2-}) و احتمالاً رادیکال هیدروکسید (OH°)، به علاوه کمپلکس‌های غیرمعمول اتم‌های آهن و اکسیژن می‌باشد. هرگاه این حد واسطها از مرکز واکنش جدا شوند برای سلول خطرناک هستند ولی به ندرت این عمل اتفاق می‌افتد (بحث گونه‌های فعال اکسیژن را در پایین ملاحظه کنید). در هنگام انتقال چهار الکترون از کمپلکس سیتوکروم C اکسیداز، چهار پروتون از فضای ماتریکس به فضای بین دو غشا جابه‌جا می‌گردد. با وجود این، مکانیسم انتقال این پروتون‌ها مشخص نشده است.

در انتقال چهار الکترون، واکنش کلی که توسط سیتوکروم C اکسیداز کاتالیز می‌گردد به صورت زیر است.

$$4CytC^{2+}+8H^+_{in}+O^2\rightarrow 4CytC^{3+}+2H_2O+4H^+_{out}$$

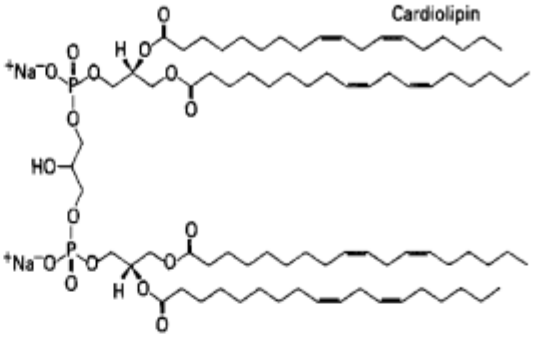
(احیا) (اکسید)

سم سیانید که به عنوان ماده شیمیایی جنگی، توسط جاسوسان برای خودکشی در هنگام دستگیری در اتاقک اعدام زندانیان، و در کشتار جمعی یهودیان توسط نازی‌ها (گاز Zyklon B) مورد استفاده قرار گرفت، به دلیل این‌که در سیتوکروم C اکسیداز (کمپلکس IV) میتوکندریایی به هم a_3 متصل شده، باعث مهار تنفس سلولی و در نتیجه مهار تولید ATP می‌گردد سمی می‌باشد. سیانید یکی از کوچک‌ترین مولکول‌های سمی است که با تولید انرژی در میتوکندری‌ها مداخله می‌کند.

سوپرکمپلکس‌های انتقال‌دهنده الکترون. بیش از ۵۰ سال پیش بریتون چانس[2] پیشنهاد کرد که کمپلکس‌های انتقال‌دهنده الکترون به صورت سوپر کمپلکس‌های بزرگ تجمع می‌یابند. وجود چنین چیزی باعث می‌شود که کمپلکس‌ها نزدیک هم قرار بگیرند و در مجاورت یکدیگر سازماندهی یابند تا سرعت و کارایی کل فرایند افزایش و بهبود یابد. با وجود این دیدگاه دیگری وجود دارد که مطرح می‌کند کمپلکس‌ها به صورت اجزا مستقل رفتار می‌کنند و به آسانی در غشای داخلی انتشار می‌یابند. در طی چند سال گذشته مطالعات ژنتیکی، بیوشیمیایی و بیوفیزیکی وجود سوپر کمپلکس‌های زنجیره انتقال الکترونی را شدیداً اثبات کرده است. در این مطالعات به منظور تعیین ساختارهای سه‌بعدی از روش‌های جدید الکتروفورز ژل به نام ژل طبیعی آبی (BN)-PAGE و طبیعی بی‌رنگ[3] (CN-PAGE)، که باعث تفکیک کمپلکس‌های پروتئینی بسیار

1- Proton motive Q cycle

2- Briton chance 3- Colorless native



بزرگ می‌شود، و آنالیز میکروسکوپ الکترونی استفاده شده است. یکی از این سوپر کمپلکس‌ها دارای یک نسخه از کمپلکس I، دیمری از کمپلکس III (III_2)، و یک یا چند نسخه از کمپلکس IV می‌باشد (شکل ۱۷ـ۱۲). به نظر می‌رسد که فسفولیپید کاردیولیپین (دی‌فسفاتیدیل گلیسرول) نقش مهمی در آرایش و عملکرد این سوپر کمپلکس‌ها بازی می‌کند.

عموماً، نه در همه غشاهای سلول‌های یوکاریوتی، مشاهده شده است که کاردیولیپین به پروتئین‌های غشایی سراسری غشای داخلی (مثل کمپلکس II) متصل می‌گردد. مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی بر روی جهش یافته‌های مخمر که در آنها سنتز کاردیولیپین مهار شده است ثابت کرده است که کاردیولیپین در تشکیل و فعالیت سوپر کمپلکس‌های میتوکندریایی نقش دارد و بنابراین به عنوان چسبی می‌باشد که زنجیره انتقال الکترون را با یکدیگر نگه می‌دارد، با وجود این هنوز مکانیسم دقیق این عمل مشخص نشده است. به علاوه، مدارکی وجود دارد که نشان می‌دهد کاردیولیپین ممکن است در اتصال و نفوذپذیری غشای داخلی به پروتون و در نتیجه نیروی محرکه پروتونی نقش داشته باشد.

پتانسیل احیایی حامل‌های الکترونی باعث جریان الکترونی از NADH به سمت O_2 می‌گردد

همان‌طور که در فصل ۲ مشاهده کردیم پتانسیل احیایی E برای یک واکنش احیایی نسبی مثل واکنش زیر

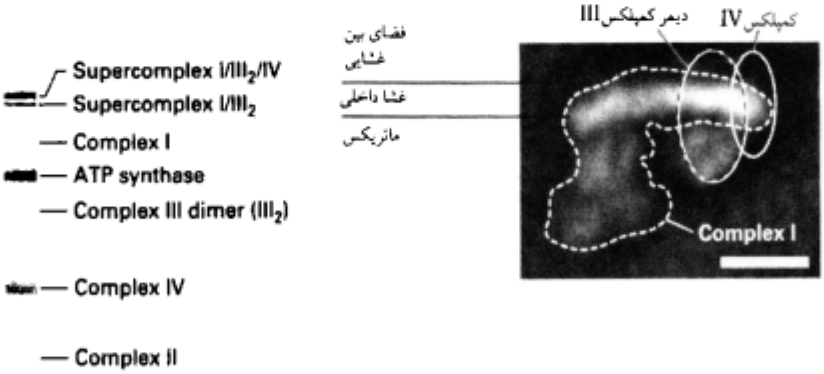
مولکول احیا شده ⇌ e^- + مولکول اکسید شده

برابر با مقدار ثابت تعادل آن واکنش می‌باشد. به استثنای سیتوکروم‌های b موجود در کمپلکس $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز، پتانسیل احیایی استاندارد $E^{\circ\prime}$ حامل‌های الکترونی در زنجیره تنفسی میتوکندریایی از $NADH_2$ به سمت O_2 به‌طور پیوسته افزایش می‌یابد. برای مثال برای واکنش نسبی

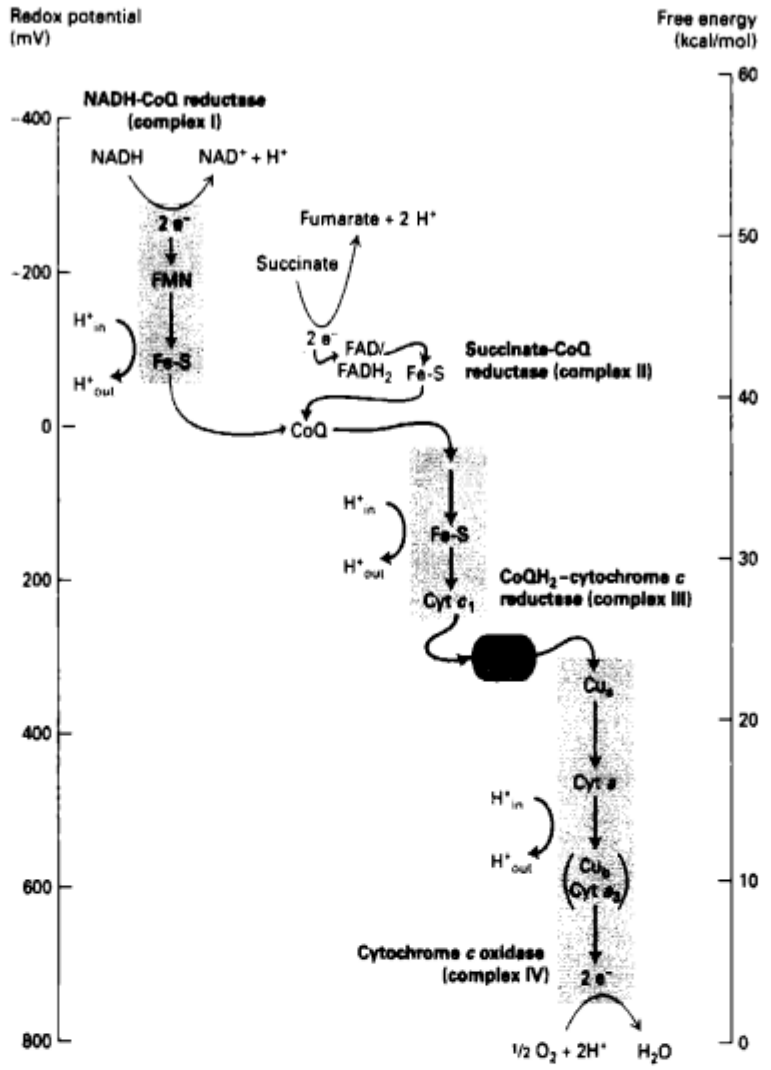
$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH$$

مقدار پتانسیل احیایی استاندارد ۳۲۰mV- است که برابر با $\Delta G^{\circ\prime}$، ۱۴/۸ kcal/mol+ در انتقال دو الکترون می‌باشد. بنابراین این واکنش نسبی تمایل دارد که به سمت چپ حرکت کند، به این معنی که به سمت اکسیداسیون NADH به NAD^+ پیش برود.

در مقابل، پتانسیل احیایی استاندارد برای واکنش نسبی:



▲ **شکل تجربی ۱۷ـ۱۲ الکتروفورز و تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی سوپر کمپلکس زنجیره انتقال الکترونی دارای کمپلکس‌های I، III و IV را مشخص می‌کند.** (a) پروتئین‌های غشایی میتوکندری‌های قلب گاو جدا شده و در یک دترجنت حل گردید. سپس کمپلکس‌ها و سوپر کمپلکس‌ها توسط روش الکتروفورز ژل طبیعی آبی (BN)-PAGE تفکیک شدند. هر باند آبی رنگ موجود در روی ژل نشان‌دهنده کمپلکس‌های مشخص شده می‌باشد با این توضیح که III_2 دیمر کمپلکس III را نشان می‌دهد. شدت رنگ آبی تقریباً متناسب با مقدار کمپلکس یا سوپر کمپلکس موجود می‌باشد. b) سوپر کمپلکس‌های $I/III_2/IV$ از ژل جدا گردید، سپس ذرات با ۱٪ یورانیل استات رنگ‌آمیزی منفی شدند و در نهایت توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مشاهده شدند. تصویر ۲۲۸ ذره با حدتفکیک ۳/۴nm≃ ترکیب شده و یک تصویر میانگین از کمپلکس ایجاد شد. مکان نسبی دیمر کمپلکس III و کمپلکس IV با بیضی پر رنگ نشان داده شده است؛ کمپلکس I نیز توسط خطوط نقطه‌چین سفید نشان داده شده است. میله مقیاس ۱۰nm است.



▲ **شکل ۱۸ـ۱۲ (شکل رنگی) تغییرات پتانسیل احیا و انرژی آزاد در انتقال مرحله‌ای الکترون‌ها در زنجیره تنفسی.** فلش‌های آبی جریان الکترونی را نشان می‌دهد؛ و فلش‌های قرمز انتقال پروتون از عرض غشای داخلی میتوکندری را نشان می‌دهد. الکترون‌ها از طریق کمپلکس‌های چند پروتئینی از پتانسیل احیایی پایین‌تر به سمت پتانسیل احیایی بالاتر (مثبت‌تر) (مقیاس چپ)، یا متناسب با آن به سمت کاهش انرژی آزاد (مقیاس راست) حرکت می‌کنند. انرژی آزاد شده ناشی از انتقال الکترون از ۳ کمپلکس، به منظور قدرت بخشیدن به پمپ شدن پروتون‌ها (یون‌های H^+) از عرض غشاء که باعث تولید نیروی محرکه پروتونی می‌کند کافی می‌باشد.

$$\text{سیتوکروم c } (Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons \text{سیتوکروم c } (Fe^{2+})$$

(اکسید) (احیا)

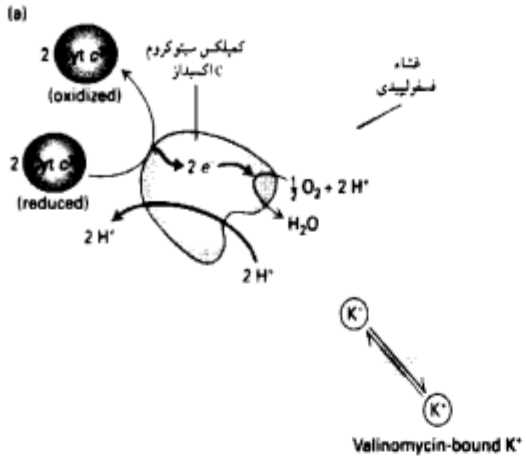
برابر ۲۲۰mV+ ($\Delta G^{\circ\prime}$ =-۵/۱ kcal/mol) به ازای انتقال یک الکترون می‌باشد. بنابراین این واکنش نسبی تمایل دارد که به سمت راست حرکت کند به این معنی که به سمت احیا سیتوکروم $(Fe^{3+})c$ به سیتوکروم $(Fe^{2+})c$ پیش می‌رود.

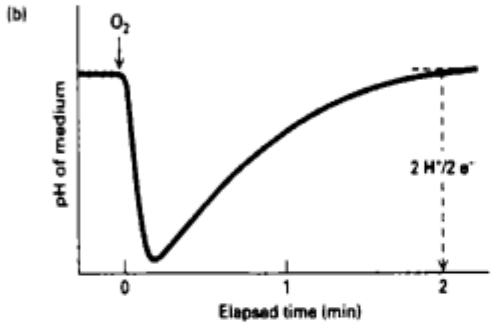
واکنش نهایی در زنجیره تنفسی احیا O_2 به H_2O می‌باشد.

$$2H^+ + 1/2\,O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O$$

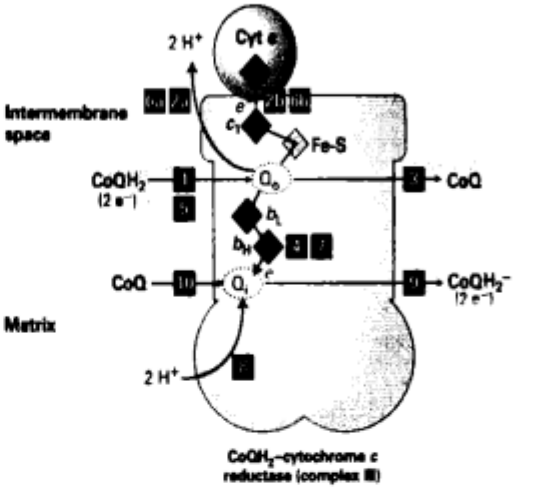
این واکنش دارای پتانسیل احیایی استاندارد ۸۱۶mV+ ($\Delta G^{\circ\prime}$ =-۳۷/۸ kcal/mol) به ازای انتقال دو الکترون) می‌باشد که مثبت‌ترین واکنش در کل مجموعه است بنابراین این واکنش تمایل به پیشروی به سمت راست دارد.

همان‌طور که در شکل ۱۸ـ۱۲ آورده شده است، افزایش پیوسته مقادیر $E^{\circ\prime}$، و متناسب با آن کاهش مقادیر $\Delta G^{\circ\prime}$ در حامل‌های زنجیره انتقال الکترونی، جریان الکترون‌ها را از NADH و $FADH_2$ (تولید شده از سوکسینات) به سمت اکسیژن تسهیل می‌کند.





▲ **شکل تجربی ۱۹-۱۲ انتقال الکترون از سیتوکروم c احیا شده به سمت O_2 از طریق سیتوکروم c اکسیداز (کمپلکس IV) با انتقال پروتون همراه شده است.** کمپلکس اکسیداز در لیپوزوم جایگزین شده است. این جایگزینی طوری است که مکان اتصال سیتوکروم C به سمت سطح بیرونی باشد. (a) وقتی که O_2 و سیتوکروم C احیا شده اضافه می‌گردد الکترون‌ها به سمت O_2 انتقال می‌یابند تا تشکیل H_2O دهند و پروتون‌ها از محیط داخل وزیکول به محیط خارج وزیکول انتقال می‌یابند. دارویی به نام والینومایسین به محیط اضافه می‌شود تا شیب ولتاژ ایجاد شده توسط انتقال H^+ را از بین ببرد، این عمل به عبارت دیگر باعث کاهش تعداد پروتون‌های عبور یافته از عرض غشاء می‌گردد. (b) pH محیط بعد از اضافه کردن O_2 نشان‌دهنده افت شدید pH می‌باشد. زمانی که سیتوکروم C احیا شده به‌طور کامل اکسید شد، پروتون‌ها به وزیکول بر می‌گردند و pH محیط به مقدار اولیه خودش بر می‌گردد. اندازه‌گیری‌ها نشان می‌دهد که به ازای هر اتم احیا شده دو پروتون منتقل می‌گردد. برای احیا هر اتم O، دو الکترون مورد نیاز است، اما سیتوکروم C تنها یک الکترون انتقال می‌دهد؛ بنابراین دو مولکول $Cytc^{2+}$ برای احیا کردن هر اتم O لازم است.



▲ **شکل ۲۰-۱۲ چرخه Q.** زمانی که مولکولی از منبع $CoQH_2$ احیا شده موجود در غشا به مکان Q_0 موجود در بخش فضای بین غشایی (بخش خارجی) پروتئین سراسری کمپلکس III متصل شد چرخه Q شروع می‌گردد (مرحله ❶). در آنجا $CoQH_2$ دو پروتون (مرحله a ❷) و دو الکترون به فضای بین غشایی آزاد می‌کند و منجر به جدا شدن CoQ می‌گردد (مرحله ❸). یکی از الکترون‌ها از طریق یک پروتئین آهن - گوگرد و سیتوکروم C_2 مستقیماً به سیتوکروم C منتقل می‌گردند (مرحله b ❷). (به خاطر بیاورید که هر سیتوکروم C یک الکترون از کمپلکس III به کمپلکس IV انتقال می‌دهد). الکترون دیگر از طریق b_L و b_H حرکت می‌کند و به‌طور جزئی مولکول CoQ متصل به مکان ثانویه Q_i موجود برای بخش ماتریکس کمپلکس را احیا کرده و تشکیل یک آنیون سمی کینون CoQ، $Q^{-\circ}$ می‌دهد (مرحله ❹). فرایند با اتصال $CoQH_2$ ثانویه به مکان Q_0 (مرحله ❺)، آزاد شدن پروتون (مرحله a ❻)، احیا سیتوکروم C دیگر (مرحله b ❻)، و اضافه شدن الکترون دیگر به $Q^{-\circ}$ متصل به مکان Q_i (مرحله ❼) تکرار می‌گردد. در آنجا، اضافه شدن دو پروتون از ماتریکس باعث به‌وجود آمدن مولکول کاملاً احیا $CoQH_2$ در مکان Q_i می‌گردد که بعداً تجزیه شده (مراحل ❽ و ❾) و Q_i را آزاد می‌کند تا به مولکول جدید CoQ متصل گردد(مرحله ❿) و چرخه Q را مجدداً آغازکند.

به کمک آزمایشات انجام شده بر روی کمپلکس‌های تخلیص شده استوکیومتری پمپ پروتونی تعیین شده است

کمپلکس‌های چند پروتئینی مسئول پمپ کردن پروتون، که با انتقال الکترون جفت شده‌اند، به‌طور انتخابی با استفاده دترجنت‌ها از غشاهای میتوکندریایی استخراج شدو هر کمپلکس به‌طور نسبتاً خالص جداسازی گردید و سپس در وزیکول‌های فسفولیپیدی مصنوعی (لیپوزوم) قرار داده شده و در نهایت مورد مطالعه قرار گرفت. وقتی که دهنده و پذیرنده الکترونی مناسبی به چنین لیپوزومی اضافه می‌شد، اگر کمپلکس قالب‌گیری شده در لیپوزوم پروتون‌ها را انتقال می‌داد، تغییراتی در pH محیط مشاهده می‌شد (شکل ۱۹ـ۱۲). چنین مطالعاتی نشان داد که NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I) به ازای هر جفت الکترون منتقل شده چهار پروتون جابه‌جا می‌کند در حالی که سیتوکروم C اکسیداز (کمپلکس IV) به ازای هر جفت الکترون منتقل شده (یا به ازای هر دو مولکول سیتوکروم c اکسید شده) دو پروتون انتقال می‌دهد.

مدارک موجود دال بر این است که به ازای هر جفت الکترون انتقال یافته از NADH به O_2، به‌طور کلی ۱۰ پروتون از فضای ماتریکسی به خارج از غشای داخلی میتوکندریایی انتقال می‌یابد (شکل ۱۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). به دلیل این‌که سوکسینات ـ CoQ ردوکتاز (کمپلکس II) پروتون انتقال نمی‌دهد و کمپلکس I در انتقال الکترون‌ها از $FADH_2$ مشتق شده از سوکسینات نقشی ندارد، به ازای هر جفت الکترون انتقال یافته از $FADH_2$ به سمت O_2 تنها ۶ پروتون از عرض غشاء عبور می‌کند.

چرخه Q تعداد پروتون‌های انتقال یافته را در هنگام جریان الکترون‌ها از کمپلکس III افزایش می‌دهد

آزمایشاتی، مثل آزمایش نشان داده شده در شکل ۱۹ـ۱۲، نشان داده‌اند که به ازای هر جفت الکترون که از $CoQH_2$ از طریق $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III) انتقال می‌یابد، چهار پروتون از عرض غشاء جابه‌جا می‌گردد. بنابراین، این کمپلکس به ازای هر الکترون انتقال داده شده دو پروتون انتقال می‌دهد در حالی که سیتوکروم C آکسیداز (کمپلکس IV) به ازای هر الکترون انتقال یافته تنها یک پروتون انتقال می‌دهد. یک مکانیسم محافظت شده طی تکامل، که **چرخه** *Q* نامیده می‌شود، علت انتقال دو پروتون به ازای یک الکترون توسط کمپلکس III می‌باشد (شکل ۲۰ـ۱۲).

سوبسترای کمپلکس III، $CoQH_2$، توسط چندین آنزیم از جمله NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I) و سوکسینات ـ CoQ ردوکتاز (کمپلکس II)، *فلاووپروتئین انتقال‌دهنده الکترون: یوبی‌کنیون ردوکتاز (ETF:QO در هنگام β ـ اکسیداسیون)* و همان‌طور که خواهیم دید توسط خود کمپلکس III تولید می‌گردد.

در یک دور چرخه Q، دو مولکول $CoQH_2$ در مکان Q_0 به CoQ اکسید می‌گردد و به‌طور کلی چهار پروتون به فضای بین غشایی آزاد می‌کند، اما یک مولکول $CoQH_2$ در مکان Q_i مجدداً از CoQ تولید می‌گردد (شکل ۲۰ـ۱۲ را ملاحظه کنید). بنابراین برآیند کلی چرخه Q این است که به ازای هر جفت الکترونی که از طریق کمپلکس $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز انتقال داده می‌شود و توسط دو مولکول سیتوکروم C گرفته می‌شود، چهار پروتون به فضای بین غشایی انتقال داده شود. پروتئین‌های انتقال داده شده تماماً از $CoQH_2$ مشتق شده‌اند. $CoQH_2$ پروتون‌های خود را از ماتریکس در اثر احیا CoQ توسط NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I) یا توسط $CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III) کسب کرده است (شکل ۱۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). اگرچه به نظر غیرممکن می‌رسد، اما چرخه Q تعداد پروتون‌های پمپ شده به ازای هر جفت الکترون عبوری از کمپلکس III را بهینه (تنظیم) می‌کند. چرخه Q در تمامی گیاهان، جانوران و نیز در باکتری‌ها یافت می‌شود. تشکیل آن در مراحل اولیه تکامل سلولی برای تشکیل تمام اشکال حیات ضروری به نظر می‌نمود زیرا آن روشی برای تبدیل انرژی پتانسیل موجود در کوآنزیم Q احیا شده به نیروی محرکه پروتونی در عرض غشاء بود.

چگونه دو الکترونی که از $CoQH_2$ در مکان Q_0 آزاد می‌شود به سمت پذیرنده‌های مختلف جهت‌دهی می‌شود بطوریکه خواه این پذیرنده‌ها Fe-S، سیتوکروم C_1 و سپس سیتوکروم C (بخش بالایی شکل ۲۰ـ۱۲) و خواه سیتوکروم b_L، سیتوکروم b_H و سپس CoQ در مکان Q_i باشد (بخش پائینی شکل ۲۰ـ۱۲). پاسخ این سؤال ساده است و به ناحیه انعطاف‌پذیر زیر واحد پروتئینی دارای Fe-S کمپلکس III بستگی دارد. مجموعه Fe-S به حدکافی به مکان Q_0 نزدیک است و می‌تواند یک الکترون از $CoQH_2$ متصل به آنجا بردارد. زمانی که این عمل اتفاق می‌افتد، قطعه‌ای از پروتئین که دارای این مجموعه Fe-S می‌باشد مجموعه را از مکان Q_0 به موقعیتی نزدیک هم سیتوکروم C می‌چرخاند تا انتقال الکترونی رخ‌دهد. با داشتن زیر واحد Fe-S در این کنفورماسیون متناوب، الکترون ثانویه آزاد شده از $CoQH_2$ متصل به مکان Q_0، نمی‌تواند به سمت مجموعه Fe-S حرکت کند زیرا آن خیلی دور است. بنابراین از یک مسیر جایگزینی کمک می‌گیرد که این مسیر به سمت

سیتوکروم b_L می‌باشد ولی از نظر ترمودینامیکی کمتر مطلوب است.

نیروی محرکه پروتونی در میتوکندری‌ها بیشتر به دلیل وجود شیب ولتاژ در عرض غشاء داخلی می‌باشد

یکی از نتایج زنجیره انتقال الکترون تولید نیروی محرکه پروتونی (pmf) می‌باشد که محصول شیب غلظت پروتونی عرض غشاء (pH) و شیب پتانسیل الکتریکی، یا ولتاژ، می‌باشد. می‌توان به‌طور تجربی مشارکت نسبی هر یک از دو جزء فوق را در pmf کلی تعیین کرد. مشارکت نسبی بیشتر به نفوذپذیری غشاء به یون‌هایی غیر از H^+ بستگی دارد. شیب ولتاژ قابل ملاحظه تنها وقتی قابل حصول است که غشاء به‌طور ضعیفی به سایر کاتیون‌ها و آنیون‌ها نفوذپذیر باشد. به عبارت دیگر، در غیر این صورت آنیون‌ها در کنار پروتون‌ها از ماتریکس به فضای بین غشایی نشت خواهند کرد و از تشکیل شیب ولتاژ ممانعت خواهند کرد. به‌طور مشابه، کاتیون‌هایی که از فضای بین غشایی به ماتریکس نشت می‌کنند باعث تشکیل کوتاه مدت شیب ولتاژ می‌شوند. ولی در واقعیت، غشاء داخلی میتوکندریایی به‌طور ضعیفی به سایر یون‌ها نفوذپذیر است. بنابراین پمپ کردن پروتون باعث تولید شیب ولتاژی می‌گردد که باعث می‌شود از نظر انرژیتیکی، به دلیل وجود دافعه الکتریکی، پروتون‌های دیگری نتوانند از غشاء حرکت کنند. در نتیجه، پمپ کردن پروتون توسط زنجیره انتقال الکترون باعث به وجود آمدن شیب قوی ولتاژ نسبت به شیب کوچک pH می‌گردد.

به دلیل این‌که میتوکندری‌ها خیلی کوچک هستند نمی‌توان الکترودی را وارد آنها کرد بنابراین پتانسیل الکتریکی و شیب pH موجود در عرض غشاء داخلی آن را نمی‌توان به‌طور مستقیم اندازه‌گیری کرد. علی‌رغم این، می‌توان به‌طور غیرمستقیم به وسیله روش‌هایی این مقادیر مهم را تعیین کرد. پتانسیل الکتریکی را می‌توان با اضافه کردن یون‌های رادیواکتیو $^{42}K^+$ و مقدار کم‌تری والینومایسین به سوسپانسیون میتوکندری‌های در حال تنفس اندازه‌گیری کرد. اگرچه، غشاء داخلی به‌طور طبیعی به K^+ غیرقابل نفوذ است، ولی والینومایسین، که یک یونوفور می‌باشد، مولکول کوچک محلول در چربی است که به‌طور انتخابی به یک یون ویژه (در این مورد، K^+) متصل می‌شود و آن را به سمت دیگر غشاهای نفوذناپذیر انتقال می‌دهد. در حضور والینومایسین، تعادل $^{42}K^+$ در عرض غشای داخلی میتوکندری متناسب با پتانسیل الکتریکی برقرار می‌شود: هر چقدر بخش ماتریکسی منفی‌تر باشد میزان $^{42}K^+$ بیشتری جذب می‌شود و در ماتریکس تجمع می‌یابد.

در هنگام تعادل، غلظت یون‌های رادیواکتیو K^+ موجود در ماتریکس، $[K_{in}]$، تقریباً ۵۰۰ برابر بیشتر از K^+ محیط بیرونی $[K_{out}]$ می‌باشد. با قرار دادن این مقدار در معادله نرنست (فصل ۱۱) می‌توان فهمید که پتانسیل الکتریکی E (در حد mV) در عرض غشاء داخلی میتوکندری‌های در حال تنفس ۱۶۰mV- است و ماتریکس (داخل) منفی می‌باشد.

$$E=-59 \log \frac{[K_{in}]}{[K_{out}]}=-59 \log 500=-160mV$$

محققان می‌توانند pH ماتریکس (داخل) را با به دام انداختن رنگ‌های فلورسنت حساس به pH در درون وزیکول‌هایی که از غشای داخلی میتوکندری ساخته شده‌اند، اندازه‌گیری کنند در این وزیکول‌ها بخش ماتریکسی در سمت داخل قرار می‌گیرد. آنها هم‌چنین می‌توانند pH خارج وزیکول (معادل فضای بین غشایی) را اندازه‌گیری کنند و بنابراین شیب pH (ΔpH) را تعیین کنند که به اندازه ۱ واحد pH می‌باشد. اگر چه ۱ واحد اختلاف در pH نشانگر ۱۰ برابر اختلاف در غلظت H^+ می‌باشد، مطابق با معادله نرنست شیب pH به اندازه یک واحد در غشاء معادل با پتانسیل الکتریکی برابر ۵۹mV در دمای $20^\circ C$ می‌باشد. بنابراین با داشتن ولتاژ و شیب pH، ما می‌توانیم نیروی محرکه پروتون، pmf، را به صورت زیر محاسبه کنیم:

$$pmf= \Psi[\frac{RT}{F} \times \Delta pH]=\Psi - 59\ \Delta pH$$

R ثابت گاز (۱/۹۸۷ cal/(degree.mol)، T دما (در مقیاس کلوین)، F ثابت فارادی [۲۳/۰۶۲cal/(V.mol)]، و ψ پتانسیل الکتریکی عرض غشاء می‌باشد؛ ψ و pmf به صورت میلی ولت اندازه‌گیری می‌شوند. پتانسیل الکتریکی ψ در عرض غشاء داخلی ۱۶۰mV- (ماتریکس منفی) و ΔpH برابر ۶۰mV≈ می‌باشد. بنابراین pmf کلی ۲۲۰mV- است و پتانسیل الکتریکی عرض غشاء مسئول تقریباً ۷۳٪ آن می‌باشد.

فراورده‌های سمی انتقال الکترون می‌تواند سلول‌ها را تخریب کند

تقریباً ۲-۱ درصد اکسیژن متابولیزه شده توسط موجودات زنده هوازی، به جای تبدیل شدن به آب، به رادیکال آنیونی سوپراکسید (O_2^-) احیا می‌شوند. سوپراکسید در مایعات زیستی

ناپایدار است و به‌طور ویژه به پراکسید هیدروژن سمی (H_2O_2) و سپس رادیکال‌های هیدروکسیل تبدیل می‌گردد. H_2O_2، و سایر ***گونه‌های فعال اکسیژن*** (ROS)، که در فرایندی به نام ***استرس اکسیداتیو سلولی*** نقش دارند، به دلیل این‌که آنها از نظر شیمیایی، پروتئین‌ها، DNA و گروه‌های اسیل چرب غیراشباع لیپیدهای غشایی را تغییر داده و بنابراین عملکرد طبیعی آنها را مختل کنند، می‌توانند بسیار سمی باشند. در واقع ROS به‌طور هدفدار در سلول‌های دفاعی بدن (مثل ماکروفاژها) تولید می‌گردد تا پاتوژن‌ها را از بین ببرد. در انسان، تولید مازاد و نامناسب ROS در بسیاری از بیماری‌های مختلف مثل قلبی، بیماری‌های نورودژنراتیو، بیماری کبدی ناشی از الکل، دیابت و پیری دخالت می‌کند.

اگرچه ROS توسط بسیاری از مسیرهای متابولیکی تولید می‌گردد، ولی به نظر می‌رسد که منبع اصلی تولید ROS زنجیره انتقال الکترون، مخصوصاً مکانیسم‌هایی که با کمپلکس‌های I و III جفت شده است، می‌باشد. شکل سمی کینونی یوبی‌کینون، $CoQ^{-\bullet}$ (شکل ۱۵ـ۱۲ را ملاحظه کنید)، حد واسط CoQ در چرخه Q، نقش مهمی در تولید سوپراکسید بازی می‌کند.

به منظور محافظت از اثرات سمی ROS، میتوکندری‌ها چندین مکانیسم دفاعی را به کار می‌برند مثل استفاده از آنزیم‌هایی که سوپراکسید را ابتدا به H_2O_2 (سوپراکسید دیسموتاز دارای Mn) و سپس آن را به H_2O (گلوتاتیون پراکسیداز که فراورده‌های هیدروپراکسید تشکیل شده از واکنش ROS با گروههای اسیل اسیدهای چرب غیراشباع را نیز سم‌زدایی می‌کند) تبدیل می‌کند. میتوکندری‌های قلبی هم‌چنین دارای کاتالاز (که به‌طور طبیعی در پراکسیزوم‌ها یافت می‌شوند) می‌باشند که به شکست و تجزیه H_2O_2 کمک می‌کند. این عمل شگفت‌آور نمی‌باشد زیرا اندامی که در پستانداران بیشتر از بقیه اکسیژن مصرف می‌کند قلب می‌باشد. به علاوه مولکول کوچک آنتی‌اکسیدانت αـ لیپوئیک اسید و ویتامین E نیز به میتوکندری‌ها در برابر ROS کمک می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۲

انتقال الکترون و تولید نیروی محرکه پروتونی

■ در انتهای چرخه اسید سیتریک (مرحله ۲)، بیشتر انرژی موجود در پیوندهای کووالان گلوکز و اسیدهای چرب به الکترونهای پرانرژی به شکل کوآنزیم‌های احیایی NADH و $FADH_2$ تبدیل می‌شود. انرژی این الکترونها در تولید نیروی محرکه پروتونی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

■ در میتوکندری، نیروی محرکه پروتونی طی جفت‌شدن جریان الکترون (از NADH و $FADH_2$ به O_2) با انتقال پروتون‌ها از ماتریکس به فضای بین غشایی تولید می‌گردد. این فرایند به همراه سنتز ADP و Pi که ناشی از نیروی محرکه پروتونی است روی همرفته فسفریلاسیون اکسیداتیو گفته می‌شود.

■ جریان الکترونی از $FADH_2$ و NADH به سمت O_2 از طریق کمپلکس‌های چند پروتئینی صورت می‌گیرد. چهار کمپلکس عبارتند از NADH-CoQ ردوکتاز (کمپلکس I)، سوکسینات - CoQ ردوکتاز (کمپلکس II)، $CoQH_2$ - سیتوکروم C ردوکتاز (کمپلکس III)، و سیتوکروم C اکسیداز (کمپلکس IV).

■ هر کمپلکس دارای یک یا چند گروه پروستتیک حامل الکترون می‌باشد: مجموعه آهن - سولفور، فلاوین‌ها، گروه‌های هم و یونهای مس (جدول ۲-۱۲ را ملاحظه کنید)، سیتوکروم C که دارای هم می‌باشد، و کوآنزیم Q (CoQ)، مولکول کوچک محلول در چربی، حامل‌های متحرکی هستند که الکترونها را بین کمپلکس‌ها جابجا می‌کنند.

■ کمپلکس‌های I، III و IV باعث پمپ‌شدن پروتون‌ها از ماتریکس به فضای بین غشایی می‌شوند. کمپلکس‌های I و II باعث احیا CoQ به CoQH می‌شوند. CoQH پروتون‌ها و الکترونهای پرانرژی را به کمپلکس III انتقال می‌دهند. پروتئین هم دارسیتوکروم C الکترونها را از کمپلکس III به کمپلکس IV انتقال می‌دهد. کمپلکس IV به کمک آن‌ها (الکترونها) پروتون‌ها را پمپ کرده و اکسیژن مولکولی را به آب احیا می‌کند.

■ الکترونهای پرانرژی NADH از طریق کمپلکس I وارد زنجیره انتقال الکترون می‌شوند، در حالیکه الکترونهای پرانرژی $FADH_2$ (مشتق از سوکسینات در چرخه اسید سیتریک) از طریق کمپلکس II وارد زنجیره انتقال الکترون می‌شوند. سایر الکترونهای مشتق از $FADH_2$ حاصل از مرحله اول β-اکسیداسیون اسیل چرب CoA مقدار $CoQH_2$ را افزایش می‌دهند.

■ در غشای داخلی کمپلکس‌های انتقال الکترون که بصورت سوپر کمپلکس آرایش می‌یابند توسط کاردیولیپین، (فسفولیپید ویژه) به یکدیگر متصل می‌شوند. تشکیل سوپر کمپلکس ممکن است سرعت و کارایی تولید نیروی محرکه پروتونی را افزایش دهد.

■ هر حامل الکترون، الکترون یا جفت الکترونها را از حامل دارای پتانسیل احیایی کمتر مثبت می‌پذیرد و الکترون را به حامل دارای پتانسیل احیایی بیشتر مثبت انتقال می‌دهد. بنابراین پتانسیل احیایی حامل‌ها باعث جریان یک طرفه الکترون از NADH و

$FADH_2$ به O_2 می‌شود (شکل ۱۸-۱۲ را ملاحظه کنید).

■ چرخه Q باعث می‌شود به ازای هر جفت الکترون که از کمپلکس III انتقال می‌یابد چهار پروتون (بجای دو پروتون) جابجا شود (شکل ۲۰-۱۲ را ملاحظه کنید).

■ بطور کلی به ازای هر جفت الکترونی که از NADH به سمت O_2 حرکت می‌کند ۱۰ یون H^+ از ماتریکس به فضای بین غشایی منتقل می‌شود (شکل ۱۶-۱۲ را ملاحظه کنید) در حالیکه به ازای هر جفت الکترون $FADH_2$، ۶ یون H^+ منتقل می‌شود.

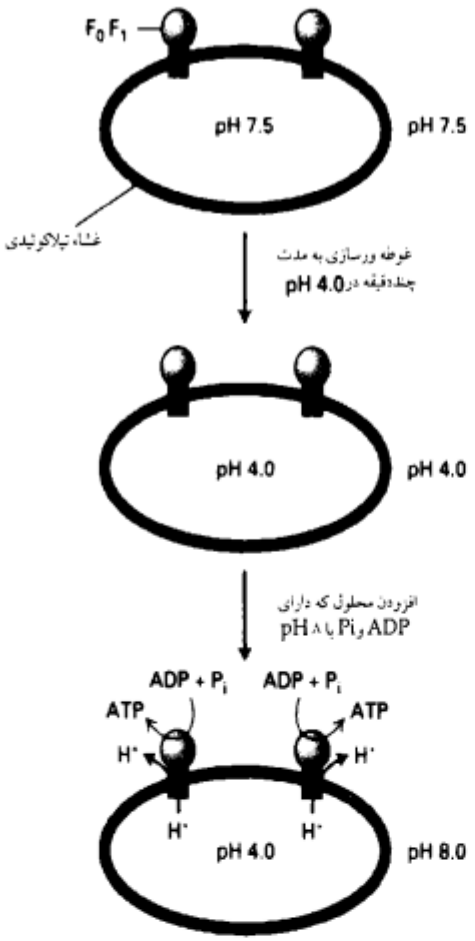
■ نیروی محرکه پروتونی به دلیل شیب ولتاژ ایجادشده طی پمپ شدن پروتون می‌باشد؛ شیب pH از نظر کمّی نقش کمتری دارد.

■ گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) فراورده‌های جانبی و سمی زنجیره انتقال الکترون می‌باشد که باعث آسیب و تخریب پروتئین‌ها، DNA و چربیها می‌شود. آنزیم‌های خاصی (مثل گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز) و مولکول‌های کوچک آنتی اکسیدانت (مثل ویتامین E) سلول را در برابر آسیب ناشی از ROS محافظت می‌کنند.

۱۲.۳ استفاده از نیروی محرکه پروتونی در فرایندهای انرژی‌خواه

در سال ۱۹۶۱ پیتر میشل این نظریه را مطرح کرد که نیروی محرکه پروتونی عرض غشاء داخلی میتوکندریایی منبع فوری انرژی برای سنتز ATP می‌باشد. در واقع تمامی محققانی که فسفریلاسیون اکسیداتیو و فتوسنتز را مطالعه می‌کردند ابتدا **فرضیه شیمیو اسموتیک**[1] ایشان را رد کردند. آنها مکانیسمی را پیشنهاد کردند که مشابه فسفریلاسیون در سطح سوبسترای موجود در گلیکولیز، که در آن تبدیل شیمیایی یک مولکول سوبسترا (مثل فسفوانول پیروات) مستقیماً با سنتز ATP جفت شده است، می‌باشد. علی‌رغم تلاش‌های وسیعی که توسط محققان زیادی صورت می‌گیرد هنوز مدارک قوی برای چنین مکانیسم مستقیمی ارائه نشده است.

مدارک مشخصی که از فرضیه میشل حمایت کند به ابداع تکنیک‌های جداسازی و بازسازی غشاهای اندامکی و پروتئین‌های غشایی بستگی داشت. آزمایش بر روی وزیکول‌های ساخته شده از غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاستی دارای **ATP سنتاز** (در زیر توضیح داده شده است، (شکل ۲۱-۱۲) یکی از آزمایشاتی بود که اثبات می‌کرد این پروتئین یک آنزیم تولیدکننده ATP است که تولید ATP در آن به حرکت پروتونی در جهت شیب الکتروشیمیایی بستگی دارد. مشخص شده است که پروتون‌ها هنگام عبور از غشاء از ATP سنتاز



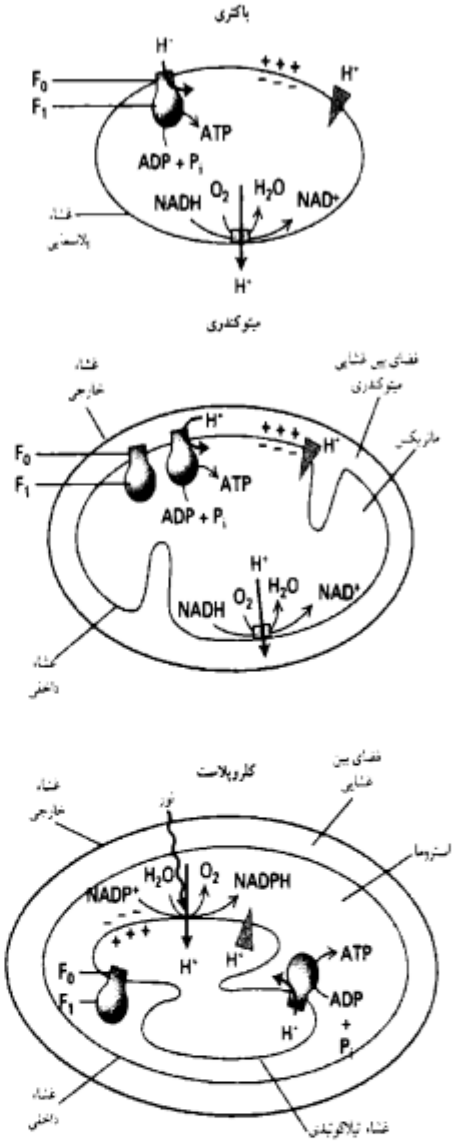
▲ **شکل تجربی ۲۱-۱۲ سنتز ATP توسط F_0F_1 بستگی به شیب pH عرض غشاء دارد.** وزیکول‌های تیلاکوئیدی کلروپلاست که دارای ذرات F_0F_1 هستند استخراج شدند و در تاریکی با محلول بافری با pH ۴ متعادل شدند. وقتی که pH داخل لومن تیلاکوئید ۴ می‌شود وزیکول‌ها سریعاً با محلول pH ۸ دارای ADP و Pi مخلوط شدند. سنتز شدید ATP با حرکت پروتونی ناشی از شیب غلظت ۱۰/۰۰۰ برابر (10^{-4} M در برابر 10^{-8}M) همراه شده است. در آزمایشات مشابهی که با استفاده از وزیکول‌های غشای میتوکندریایی معکوس[2] انجام گردید، پتانسیل الکتریکی غشایی که به صورت مصنوعی ایجاد شده بود نیز منجر به سنتز ATP گردید.

عبور می‌کنند.

همان‌طور که خواهیم دید، ATP سنتاز یک کمپلکس چندپروتئینی می‌باشد که دو زیر کمپلکس F_0 (دارای بخش غشایی کمپلکس) و F_1 (دارای بخش کروی کمپلکس که در روی غشاء قرار

1- Chemiosmotic hypothesis

2- Inside-out



▲ **شکل ۱۲ـ۲۲ شیمیواسمزیس در باکتری‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها.** سطح غشایی که به سمت ناحیه سایه‌دار است سطح سیتوزولی می‌باشد؛ سطحی که به سمت ناحیه غیرسایه‌دار است، ناحیه سفید، سطح اگزوپلاسمیک می‌باشد. توجه داشته باشید که سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی باکتری‌ها، سطح ماتریکس غشای داخلی میتوکندریایی، و سطح استرمایی غشای تیلاکوئیدی همگی معادل هم هستند. در هنگام انتقال الکترونی، غلظت پروتونی (سطح اگزوپلاسمیک > سطح سیتوزولی) و یک پتانسیل الکتریکی (سطح سیتوزولی منفی و سطح اگزوپلاسمیک مثبت) برقرار می‌گردد. در سنتز ATP، پروتون‌ها در مسیر عکس (یعنی در جهت شیب الکتروشیمیایی) از میان ATP سنتاز (کمپلکس F_0F_1) که به صورت برآمدگی در سطح سیتوزولی تمام موارد فوق یافت می‌شود، حرکت می‌کنند.

دارد و به سمت فضای ماتریکس میتوکندریایی کشیده شده است) تقسیم می‌شود. بنابراین ATP سنتاز اغلب کمپلکس F_0F_1 نامیده می‌شود و ما این واژه و ATP سنتاز را به جای یکدیگر نیز استفاده خواهیم کرد.

مکانیسم سنتز ATP در باکتری‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها مشترک می‌باشد

اگرچه باکتری‌ها فاقد هر گونه غشای داخلی هستند، با وجود این باکتری‌های هوازی طی فرایندهای مشابهی که در میتوکندری‌های یوکاریوت‌ها اتفاق می‌افتد فسفریلاسیون اکسیداتیو انجام می‌دهند. آنزیم‌هایی که واکنش‌های مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک را کاتالیز می‌کنند در سیتوزول باکتری‌ها یافت می‌شوند و آنزیم‌هایی که NADH را به NAD^+ اکسید می‌کنند و الکترون‌ها را به پذیرنده نهایی O_2 انتقال می‌دهند در غشاء پلاسمایی باکتری یافت می‌شوند.

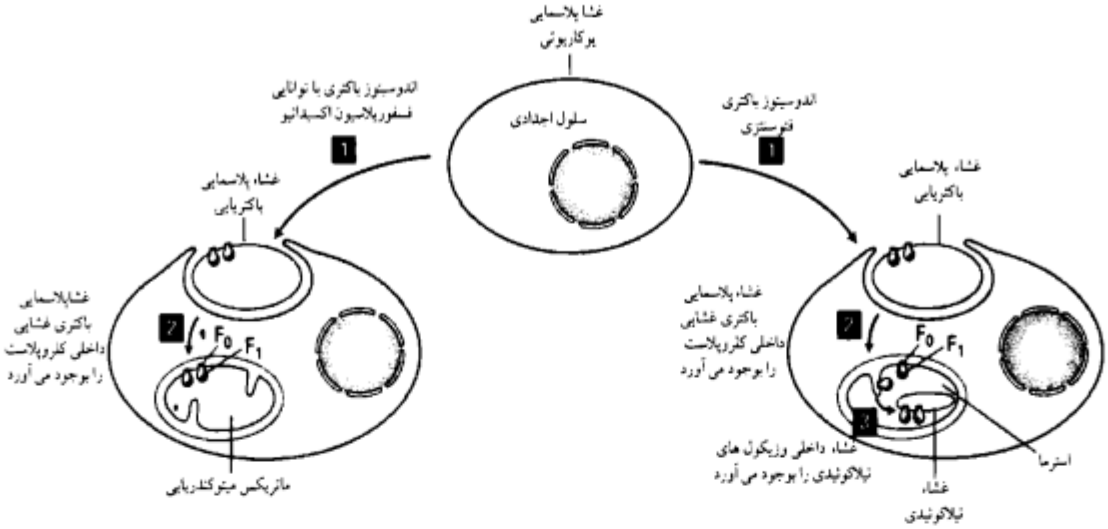
حرکت الکترون‌ها از طریق این حامل‌های غشایی با پمپ کردن پروتون‌ها به خارج از سلول همراه شده است. برگشت پروتون‌ها به داخل سلول، در جهت کاهش شیب غلظت آنها، با سنتز ATP همراه شده است. این فرایند کلی در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها (در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها) مشابه است (شکل ۲۲ـ۱۲). ATPسنتاز (کمپلکس F_0F_1) باکتریایی اساساً از نظر ساختاری و عملکردی مشابه ATP سنتاز میتوکندریایی و کلروپلاستی می‌باشد تنها تفاوت آنها در سادگی استخراج و مطالعه ATP سنتاز باکتری می‌باشد.

باکتری‌های هوازی اولیه احتمالاً پیش‌زاد[1] میتوکندری‌ها در سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد (شکل ۲۳ـ۱۲). مطابق **فرضیه همزیستی درونی**[2]، غشای داخلی میتوکندری از غشاء پلاسمایی باکتری مشتق می‌گردد و سطح سیتوزولی غشاء باکتری تبدیل به سمت فضای ماتریکس میتوکندری می‌شود. به‌طور مشابه، در گیاهان غشای پلاسمایی پیش‌زاد (پروژنیتور) به غشای تیلاکوئیدی کلروپلاستی تبدیل می‌گردد و سطح سیتوزولی آن، به سطح استرومایی کلروپلاست تبدیل می‌گردد (با جزئیات در زیر آورده شده است).

در تمامی موارد، سنتز ATP با دُمین کروی F_1 انجام می‌گردد که در سطح سیتوزولی غشاء قرار گرفته است، بنابراین ATP همیشه در سطح سیتوزولی غشاء تشکیل می‌گردد (شکل ۲۲ـ۱۲ را ملاحظه کنید). پروتون‌ها همیشه از طریق ATP سنتاز از سطح اگزوپلاسمیک به سطح سیتوزولی غشاء حرکت می‌کنند بطوری که در

1- Progenitor

2- Endosymbiont hypothesis



▲ **شکل ۲۳ـ۱۲ فرضیه همزیستی درونی برای منشاء تکاملی میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها.** اندوسیتوز یک باکتری توسط یک سلول اجدادی یوکاریوتی (مرحله ❶) باعث تولید اندامکی با دو غشاء می‌گردد، غشای خارجی از غشای پلاسمایی یوکاریوتی و غشای داخلی از غشای باکتریایی مشتق می‌شود (مرحله ❷). زیر واحد ATP F_1 سنتاز، که در سطح سیتوزولی غشای باکتریایی قرار گرفته است، در سطح ماتریکس میتوکندریایی (چپ) یا کلروپلاستی (راست) قرار می‌گیرد. جوانه‌زنی وزیکول‌ها از غشای داخلی کلروپلاست‌ها مثل آنچه که در هنگام تکامل کلروپلاست گیاهان امروزی رخ می‌دهد، باعث تولید غشاهای تیلاکوئیدی می‌گردد به طوری که زیر واحد F_1 در سطح سیتوزولی به سمت استرمای کلروپلاستی قرار می‌گیرد (مرحله ❸). سطوح غشایی که در سمت فضای سایه‌دار قرار گرفته‌اند سطوح سیتوزولی می‌باشند؛ و سطوحی که به سمت نواحی غیرسایه‌دار است سطوح اگزوپلاسمیک می‌باشد.

میتوکندری این حرکت از فضای بین غشایی به سمت فضای ماتریکسی می‌باشد. حرکت پروتونی ناشی از نیروی محرکه پروتونی می‌باشد. به‌طور تغییرناپذیری، سطح سیتوزولی نسبت به سطح اگزوپلاسمیک پتانسیل الکتریکی منفی دارد.

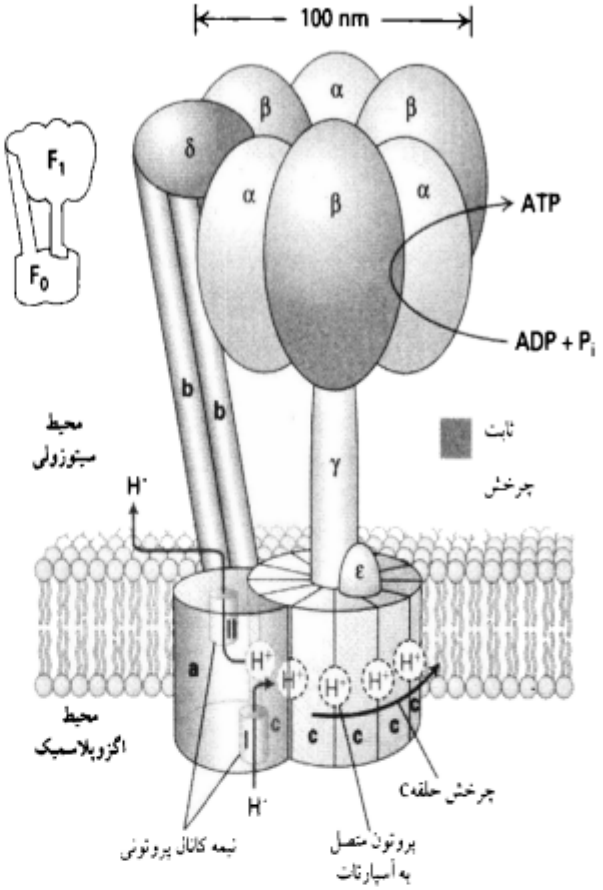
علاوه بر سنتز ATP، نیروی محرکه پروتونی موجود در عرض غشای پلاسمایی باکتری در انجام فرایندهای دیگری شامل جذب مواد غذایی مثل قندها (به کمک هم انتقال‌دهنده پروتون / قند) و چرخش تاژک باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین جفت شدن شیمیواسموتیک یک اصل مهم است که در مبحث انتقال فعال در فصل ۱۱ معرفی و توضیح داده شده است: ***پتانسیل غشایی شیب غلظتی پروتون‌ها (و سایر یون‌ها) در عرض غشاء، و پیوندهای فسفواندریدی موجود در ATP معادل یکدیگر هستند و اشکال قابل تبدیل انرژی پتانسیل شیمیایی می‌باشند.*** در واقع سنتز ATP از طریق ATP سنتاز را می‌توان به صورت انتقال فعال معکوس در نظر گرفت.

ATP سنتاز از دو کمپلکس چند پروتئینی به نام F_0 و F_1 تشکیل شده است

با پذیرفتن عمومی مکانیسم شیمیواسموتیک میشل، محققان توجه خودشان را به ساختار و کار کمپلکس F_0F_1 معطوف کردند. کمپلکس F_0F_1 یا A I P سنتاز، دارای دو بخش اصلی می‌باشد، F_0 و F_1، که هر کدام از پروتئین‌های چند گانه ساخته شده‌اند (شکل ۲۴ـ۱۲). بخش F_0 دارای سه نوع پروتئین سراسری می‌باشد که با a، b و c نشان داده می‌شود. در باکتری‌ها و میتوکندری‌های مخمر ترکیب زیر واحدی F_0 به صورت $a_1b_2c_{10}$ می‌باشد در حالی که در میتوکندری جانوری ۱۲ زیر واحد c و در کلروپلاست‌ها ۱۴ زیر واحد c یافت می‌شود. در تمامی موارد فوق زیر واحد c یک حلقه کیک مانند در صفحه غشایی تشکیل می‌دهد. زیر واحدهای a و b به‌طور محکم به یکدیگر متصل شده‌اند در حالی که به زیر واحد c به‌طور محکم نچسبیده‌اند، زیر واحد c را در ادامه بحث خواهیم کرد.

بخش F_1 یک کمپلکس محلول در آب می‌باشد که از ۵ پلی‌پپتید مشخص تشکیل شده است و ترکیب آن $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ می‌باشد که به‌طور طبیعی به‌طور محکم به زیرکمپلکس F_0[1] در سطح غشاء متصل شده است. انتهای پائینی زیر واحد میله‌ای شکل γ زیرکمپلکس F_1 به صورت فنر فنری شده است که بصورت محکم به زیر واحد c چسبیده است. بنابراین وقتی که زیر واحد c می‌چرخد، زیر واحد

1- subcomplex



شکل ۲۴-۱۲ (شکل رنگی) ساختار و عملکرد ATP سنتاز (کمپلکس F۰F۱) غشاء پلاسمایی باکتریایی. بخش F_0 محصور در غشاء ATP از سه پروتئین غشایی سراسری a ساخته شده است: یک کپی از a، دو کپی از b و به‌طور متوسط ۱۰ کپی از c به صورت حلقه‌ای در صفحه غشاء آرایش یافته‌اند. دو نیمه کانال پروتونی در فاصله بین زیر واحد a و حلقه c قرار گرفته است. نیمه کانال I به پروتون اجازه می‌دهد که از محیط اگزوپلاسمی حرکت کرده و به آسپارتات ـ ۶۱ (موجود در مرکز زیر واحد) به c نزدیک میانه غشاء متصل گردد. نیمه کانال II (بعد از چرخش حلقه c) پروتون‌ها امکان می‌دهد که از آسپارتات کنده شوند و به محیط سیتوزولی حرکت کنند. بخش F_1 دارای سه کپی از هر یک از زیر واحدهای α و β می‌باشد که هگزامر تشکیل می‌دهند و در بالای زیر واحد γ میله‌ای شکل که به حلقه F_0 متصل است، قرار می‌گیرند. زیر واحد ε به‌طور محکم به زیر واحد γ و چند زیر واحد c متصل شده است. زیر واحد δ به‌طور دائمی یکی از زیر واحدهای αکمپلکس F_1 و زیر واحد b کمپلکس F_0 به یکدیگر مرتبط می‌سازد. بنابراین زیر واحدهای a و b و F_0 و زیر واحدهای F_1 δ و هگزامر $(\alpha\beta)_3$ یک ساختار محکمی را می‌سازند که در غشاء لنگر می‌اندازد (نارنجی). در هنگام حرکت پروتونی، حلقه c و زیر واحدهای ε و γ متصل شده به هم بصورت واحد (سبز) چرخش کرده و باعث تغییرات کنفورماسیونی در زیر واحدهای F_1 β می‌گردند که موجب سنتز ATP می‌گردد.

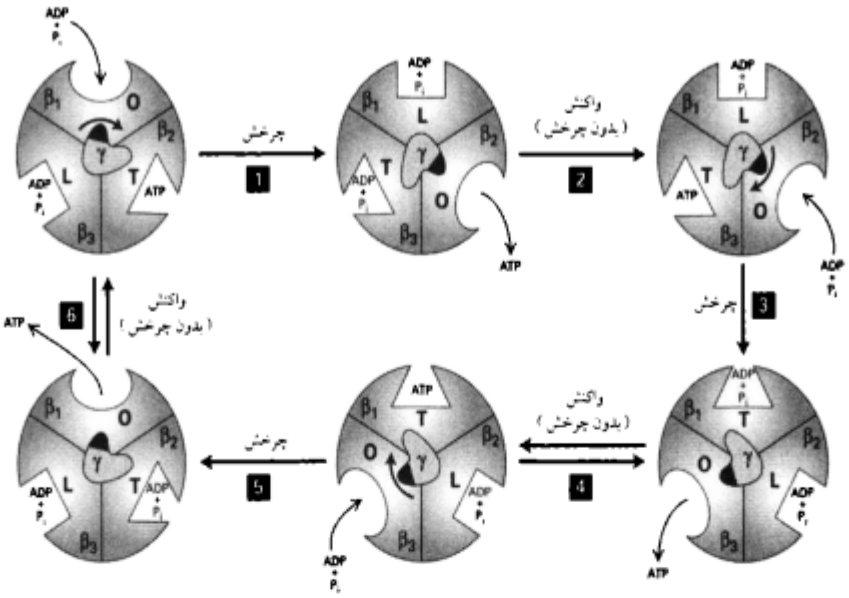
میله‌ای شکل γ با آن حرکت می‌کند. زیرواحد ε در F_1 بطور محکم به زیر واحد γ و نیز به چند زیر واحد c در F_0 متصل شده است. زیر واحدهای α و β مسئول شکل کروی زیرکمپلکس F_1 می‌باشد و به صورتی آرایش می‌یابد که هگزامر $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ یا $(\alpha\beta)_3$ تشکیل می‌دهد و در بالای زیر واحد γ قرار می‌گیرد. زیر واحد F_1 δ به‌طور دائمی به یکی از زیر واحدهای F_1 α و نیز به زیر واحد F_0 b متصل می‌شود. بنابراین زیر واحدهای a و F_0 b و زیر واحد γ و هگزامر $(\alpha\beta)_3$ کمپلکس F_1 یک ساختار محکم تشکیل می‌دهند که در غشاء لنگر انداخته است. زیر واحد میله‌ای شکل b تشکیل یک «استاتور»[1] می‌کند که از حرکت هگزامر $(\alpha\beta)_3$ در زمان استراحت بر روی زیر واحد γ ممانعت می‌کند. چرخش این هگزامر به همراه زیر واحدهای c F_0 نقش اساسی در مکانیسم سنتز ATP که در زیر بحث شده است، بازی می‌کند.

وقتی که ATP سنتاز در غشاء قرار می‌گیرد بخش F_1 بصورت برآمدگی از بخش سیتوزولی (معادل آن در میتوکندری، ماتریکس است) بیرون می‌زند. به دلیل این‌که F_1 جدا شده از غشاها توانایی کاتالیز هیدرولیز ATP (تبدیل ATP به ADP و P_i) را در عدم حضور بخش F_0 دارد، آن F_1 ATPase خوانده می‌شود؛ با وجود این، عملکرد آن در سلول‌ها عکس هیدرولیز ATP و بنابراین سنتز ATP می‌باشد. هیدرولیز ATP یک فرایند خودبه‌خودی ($\Delta G<0$) است بنابراین برای سنتز و تولید ATP توسط ATPase انرژی نیاز است.

با چرخش زیر واحد F_1 γ، که ناشی از حرکت پروتونی از طریق F_0 است، ATP سنتز می‌گردد

هر یک از سه زیر واحد β موجود در بخش F_1 کمپلکس کامل F_0F_1 می‌توانند به ADP و P_i متصل شوند و زمانی که با جریان پروتونی از محیط اگزوپلاسمیک (فضای بین غشایی در میتوکندری) به محیط سیتوزولی (ماتریکس) جفت شوند، سنتز ATP را کاتالیز کنند. با وجود این، جفت شدن جریان پروتونی و سنتز ATP بایستی غیرمستقیم باشد، زیرا محل اتصال نوکلئوتید بر روی زیر واحدهای β F_1، جایی که سنتز ATP رخ می‌دهد، ۹-۱۰nm از سطح غشاء

1- Stator



▲ **شکل ۲۵ـ۱۲ مکانیسم تغییر ناشی از اتصال سنتز ATP از ADP و P_i.** در این نما F_1 از سطح غشایی مشاهده می‌گردد (شکل ۲۴ـ۱۲ را ملاحظه کنید). وقتی که زیر واحد γ به اندازه °۱۲۰ چرخش می‌کند هر کدام از زیر واحدهای $F_1\beta$ بین سه کنفورماسیون (O، باز که به صورت بیضی نشان داده شده است، L، شل که به صورت مستطیل نشان داده شده است، T، محکم که به صورت مثلث نشان داده شده است) به‌طور متناوب تغییر می‌کنند، این سه کنفورماسیون دارای تمایل متفاوتی به ATP، ADP و P_i می‌باشند. چرخه (بالا سمت چپ) با اتصال شل ADP و P_i به یکی از سه زیر واحد β (در این‌جا با β_1 نمایش داده شده است) که محل اتصال نوکلئوتید در کنفورماسیون O (باز) است، آغاز می‌گردد. جریان پروتون از بخش F_0 پروتئین باعث چرخش °۱۲۰ زیر واحد γ (نسبت به زیر واحد ثابت β می‌گردد (مرحله ❶). این کار باعث می‌شود چرخش زیر واحد γ نامتقارن، زیر واحدهای β را هل داده و منجر به تغییر کنفورماسیونی و افزایش تمایل اتصال زیر واحد β_1 به ADP و P_i (از O به L)، افزایش تمایل اتصال زیر واحد β_3 به ADP و P_i که قبلاً متصل شده است (از L به T) و کاهش تمایل اتصال زیر واحد β_2 به ATP از قبل متصل شده (از T به O)، که باعث آزاد شدن ATP متصل شده می‌شود، گردد. مرحله ❷: بدون چرخش اضافی، ADP و P_i موجود در محل T (در این‌جا زیر واحد β_3 نشان داده شده) ATP تشکیل می‌دهند، این واکنش به دلیل محیط ویژه مکان فعال حالت T نیاز به ورود انرژی مازاد ندارد. در همان زمان ADP و P_i جدید به‌طور شل به محل O اشغال نشده روی β_2 متصل می‌شود. مرحله ❸: جریان پروتونی باعث یک چرخش °۱۲۰ دیگری در زیر واحد γ، متقابلاً تغییرات کنفورماسیونی در محل‌های اتصال (L→T, O→L, T→O)، و آزاد شدن ATP از β_3 می‌گردد. مرحله ❹: بدون چرخش اضافی، ADP و P_i موجود در محل β_1 ATP تشکیل می‌دهد، و ADP و P_i دیگری به محل اشغال نشده در β_3 متصل می‌گردد. فرایند با چرخش (مرحله ❺) و تشکیل ATP (مرحله ❻) تا زمان تکمیل چرخه ادامه پیدا می‌کند. در هر چرخش °۳۶۰ زیر واحد γ، سه ATP تولید می‌گردد.

میتوکندریایی فاصله دارد. مدل پذیرفته شده عمومی برای سنتز ATP توسط کمپلکس F_0F_1 ـ ***مکانیسم تغییر ناشی از اتصال***[1] ـ تنها مدل توجیه‌کننده جفت شدن غیرمستقیم می‌باشد (شکل ۲۵ـ۱۲).

طبق این مکانیسم انرژی آزاد شده از حرکت «رو به پایین»[2] پروتون‌ها از طریق F_0، به‌طور مستقیم باعث چرخش حلقه زیر واحد c و زیر واحدهای γ و ε متصل به آن می‌شود (شکل ۲۴ـ۱۲ را ملاحظه کنید). زیر واحد γ به عنوان یک محور چرخاننده نامتقارن عمل می‌کند که چرخش آن در مرکز هگزامر ثابت $(\alpha\beta)_3$ F_1 باعث می‌شود که به‌طور پی در پی زیر واحدهای β بچرخند و بنابراین باعث بوجود آمدن تغییرات چرخشی در کنفورماسیون‌های آنها در سه حالت مختلف می‌گردد. همانگونه که به‌طور شماتیکی در بخش زیرین ساختار کروی هگزامر $(\alpha\beta)_3$، در شکل ۲۵ـ۱۲ نشان داده شده است، چرخش زیر واحد γ نسبت به هگزامر ثابت $(\alpha\beta)_3$ باعث می‌شود که محل اتصال نوکلئوتید هر زیر واحد β در سه کنفورماسیون زیر چرخش کند:

۱ـ حالت O (باز) که به ATP به‌طور بسیار کمتر و به ADP و Pi بطور ضعیف متصل می‌شود.

۲ـ حالت L (شل) که به ADP و P_i به‌طور قوی می‌چسبد اما به ATP نمی‌تواند بچسبد.

۳ـ حالت T (سفت) که به ADP و P_i به‌طور خیلی

1- Binding-change mechanism

2- Downhill

محکم‌می‌چسبد به‌طوری که آنها به‌طور خود به‌خودی واکنش داده و ATP به وجود می‌آورند.

در حالت T، ATP تولید شده به‌طور محکم متصل شده است به‌طوری که نمی‌تواند به سادگی از آن مکان جدا شود. ATP تا زمانی که یک چرخش دیگر در زیر واحد γ، آن زیر واحد βرا به حالت O بر گرداند در آنجا به دام افتاده است، بنابراین بعد از چرخش زیر واحد γ ATP آزاد می‌گردد و چرخه مجدداً آغاز می‌گردد. ATP یا ADP هم‌چنین به مکان تنظیمی یا آلوستریک موجود بر روی سه زیر واحد α نیز متصل می‌شود؛ این اتصال میزان و سرعت سنتز ATP را مطابق با سطح ATP و ADP موجود در ماتریکس تغییر می‌دهد، اما به‌طور مستقیم در سنتز ATP از ADP و P_i دخالت نمی‌کند.

مدارک زیادی مکانیسم تغییر ناشی از اتصال را تأیید می‌کنند. ابتدا، مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که یکی از سه زیر واحد βموجود در ذرات جدا شده F_1 می‌تواند به‌طور محکم به ADP و P_i متصل گردد و سپس ATP تشکیل دهد که به‌طور محکم و متصل به آن باقی می‌ماند. ΔG اندازه‌گیری شده برای این واکنش نزدیک به صفر است و نشان می‌دهد که وقتی ADP و P_i به حالت T زیر واحد β متصل شدند آنها به‌طور خود به‌خودی ATP تشکیل می‌دهند. چیزی که اهمیت دارد این است که جدا شدن ATP از زیر واحد β ذرات F_1 تخلیص شده خیلی آهسته رخ می‌دهد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که جدا شدن ATP بایستی توسط تغییر کنفورماسیون زیر واحد β اتفاق بیفتد که به نوبه خود این تغییر کنفورماسیون ناشی از حرکت پروتونی می‌باشد.

آنالیز کریستالوگرافی اشعه x هگزامر $(\alpha\beta)_3$ یک نتیجه مهم در برداشت: اگرچه سه زیر واحد β از نظر توالی و ساختار کلی مشابه هستند، محل‌های اتصال ATP/ADP در هر زیر واحد کنفورماسیون‌های مختلفی دارند. استنتاج منطقی این است که سه زیر واحد βطی واکنش وابسته به انرژی در سه کنفورماسیون مختلف (O,L,T) می‌چرخند بطوری که در آنها مکان اتصال نوکلئوتید اساساً ساختارهای مختلفی دارند.

در مطالعات دیگر، کمپلکس‌های F_0F_1 سالم با مواد شیمیایی برقرار کننده اتصال عرضی[1] که به‌طور کوالان زیر واحدهای γ و ε و حلقه زیر واحد c را به یکدیگر متصل می‌کند، تیمار شدند. این مشاهدات که در این کمپلکس‌های تیمار شده ATP سنتز می‌شود یا با استفاده از ATP پمپ پروتون فعال می‌شود حاکی از آن است پروتئین‌های متصل شده به‌طور طبیعی با یکدیگر می‌چرخند.

سرانجام همان‌طور که در مکانیسم تغییر ناشی از اتصال بیان شد چرخش زیر واحد γ نسبت به هگزامر ثابت $(\alpha\beta)_3$، به‌طور مستقیم در آزمایش موجود در شکل ۲۶ـ۱۲ مشاهده گردید. در یک آزمایش دیگر که در آن ذرات کوچک طلا به جای فیلامنت اکتین به زیر واحد γ متصل گردید، در هر ثانیه ۱۳۴ چرخش مشاهده گردید. در واکنش معکوس همان آنزیم، به نظر می‌رسد که هیدرولیز ۳ATP باعث یک چرخش می‌گردد؛ این نتیجه مشابه نتیجه حاصل از آزمایشی است که در آن میزان هیدرولیز ATP توسط کمپلکس‌های F_0F_1 را تعیین شد: تقریباً ۴۰۰ ATP در هر ثانیه. در یک آزمایش دیگر مشاهده گردید که زیر واحد γکه به زیر واحد ε و حلقه c متصل شده است نسبت به هگزامر ثابت $(\alpha\beta)_3$ می‌چرخد. چرخش زیر واحد γ در این آزمایشات توسط هیدرولیز ATP صورت می‌گیرد. این عمل عکس فرایند طبیعی است که در آن حرکت پروتونی بواسطه کمپلکس F_0 منجربه چرخش زیر واحد ε می‌شود. این مشاهدات نشان داد که زیر واحد γ به همراه حلقه c و زیر واحد ε می‌چرخند و بنابراین باعث‌تغییرات کنفورماسیونی در زیر واحد β می‌گردند که برای اتصال ADP و P_i و متعاقباً سنتز ATP و آزاد شدن آن ضروری است.

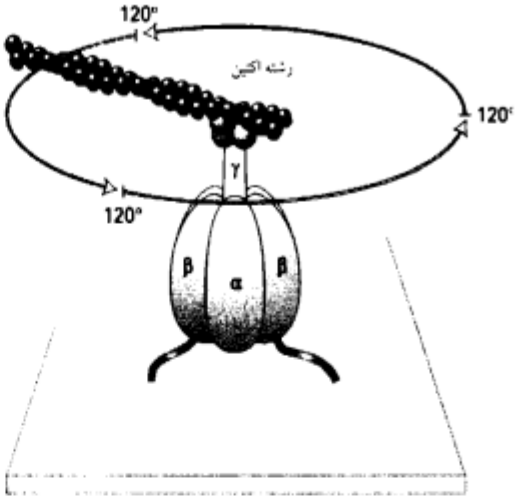
برای سنتز ATP تعدادی از پروتون‌های جابه‌جا شده لازم است

یک محاسبه ساده نشان می‌دهد که برای سنتز یک مولکول ATP از ADP و P_i عبور بیشتر از یک پروتون نیاز می‌باشد. اگرچه ΔG این واکنش تحت شرایط استاندارد ۷/۳+ kcal/mol می‌باشد، در غلظت‌های مواد موجود در میتوکندری، ΔG ممکن است بیشتر باشد (۱۰+ kcal/mol تا ۱۲+). ما می‌توانیم از طریق معادله نرنست بافرض n=۱ و اندازه‌گیری ΔE در واحد ولت، میزان انرژی آزاد شده از عبور ۱ مول پروتون در جهت شیب الکتروشیمیایی ۲۲۰mV (۰/۲۲V) را محاسبه کنیم:

$$\Delta G(cal/mol) = -nF\Delta E =$$
$$-(23{,}062\,cal.V^{-1}.mol^{-1})\,\Delta E$$
$$=(23{,}062\,cal.V^{-1}.mol^{-1})(0.22V)$$
$$=5074cal/mol \text{ یا } -5.1kcal/mol$$

از آنجایی که حرکت ۱ مول پروتون تنها ۵kcal انرژی آزاد می‌کند، بنابراین برای سنتز هر مولکول ATP از ADP و P_i عبور دو پروتون ضروری می‌باشد.

1- Cross - linking agents



▲ **شکل تجربی ۲۶ـ۱۲ زیر واحد γ کمپلکس F_1 نسبت به مگزامر $(\alpha\beta)_3$ چرخش می‌کند.** کمپلکس F_1 طوری مهندسی شد تا در زیرواحدهای β توالی ۶ تا His داشته باشد. این توالی باعث می‌گردد آنها به لیت شیشه‌ای پوشیده شده با مواد فلزی که به پلی‌هیستیدین متصل می‌گردد، بچسبند. زیر واحد γ کمپلکس‌های F_1 مهندسی شده به‌طور کوالان به فیلامنت اکتین نشان‌دار با ماده فلورسانس متصل گردید. با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده گردید که فیلامنت اکتین در حضور ATP در اثر هیدرولیز ATP توسط زیر واحدهای β به صورت پادساعتگرد با گام‌های مشخص °۱۲۰ می‌چرخد.

حرکت پروتون از طریق F_0 و چرخش حلقه c. هر نسخه از زیر واحد c دارای دو α هلیکس فرو رونده در غشاء می‌باشد که ساختار شبه سنجاق سری تشکیل می‌دهد. به نظر می‌رسد که ریشه‌آسپارتات (Asp 61) موجود در مرکز یکی از این هلیکس‌ها در حرکت پروتون نقش داشته باشد. تغییر شیمیایی این آسپارتات توسط سم دی‌سیکلو هگزیل کربودی‌ایمید یا جهش آن به آلانین به‌طور ویژه حرکت پروتونی را از طریق F_0 مهار می‌کند. بر طبق یک مدل، دو نیمه کانال پروتونی، I و II، در میان زیر واحد α و حلقه c قرار گرفته است (شکل ۲۴ـ۱۲ را ملاحظه کنید). عقیده بر این است که پروتون‌ها به‌طور جداگانه از طریق نیمه کانال I از محیط اگزوپلاسمیک حرکت می‌کنند و به زنجیره جانبی کربوکسیلات Asp61 زیر واحد c متصل می‌گردند. اتصال پروتون به این آسپارتات منجر به تغییر کنفورماسیون در زیر واحد c می‌گردد و باعث می‌گردد آن نسبت به زیر واحد ثابت a حرکت کند یا به‌طور مساوی در صفحه غشایی چرخش کند. این چرخش، زیر واحد c مجاور را به همراه زنجیره جانبی آسپارتیل یونیزه شده آن، به کانال I می‌آورد، و بنابراین به آن اجازه می‌دهد که پروتون بعدی را گرفته و متعاقباً نسبت به زیر واحد α تغییر کند. چرخش مداوم حلقه c، به دلیل اتصال پروتون‌ها به زیر واحدهای دیگر c، سرانجام باعث می‌شود که اولین زیر واحد c دارای Asp 61 پروتونه با نیمه کانال II که به سیتوزول وصل است، هم‌راستا شود. پیشنهاد شده است که زنجیره جانبی با بار مثبت Arg 210 زیر واحد a با بار منفی Asp 61 میانکنش می‌دهد و حرکت زیر واحدهای c و جابه‌جایی پروتونی را تسهیل می‌کند. وقتی این عمل رخ دهد، پروتون موجود بر روی ریشه آسپارتیل جدا شده (تشکیل آسپارتات یونیزه) و به محیط سیتوزولی حرکت می‌کند.

به دلیل اینکه زیر واحد $F_1\gamma$ به‌طور محکم به حلقه F_0c متصل شده است، چرخش حلقه c، که با حرکت پروتونی همراه است، باعث چرخش زیر واحد γ می‌گردد. طبق مکانیسم تغییر ناشی از اتصال، چرخش °۱۲۰ γ باعث سنتز یک ATP می‌گردد (شکل ۲۵ـ۱۲ را ملاحظه کنید). بنابراین چرخش کامل حلقه c به اندازه °۳۶۰ منجر به تولید ۳ ATP خواهد شد. در *E.coli* که ترکیب F_0 آن $a_1b_2c_{10}$ است حرکت ۱۰ پروتون باعث یک چرخش کامل می‌گردد و بنابراین سه ATP تولید می‌گردد. این مقدار با داده‌های آزمایشگاهی موجود از جریان پروتونی در هنگام سنتز ATP مطابقت می‌کند و به‌طور غیرمستقیم مدل جفت شدن حرکت پروتونی با چرخش حلقه c نشان داده شده در شکل ۲۴ـ۱۲ را تأیید می‌کند. F_0 کلروپلاست‌ها دارای ۴ زیر واحد c در هر حلقه می‌باشد و حرکت ۱۴ پروتون برای سنتز ۳ATP ضروری است. دلیل این‌که چرا این کمپلکس‌های F_0F_1 مشابه، نسبت H^+:ATP متفاوت دارند، هنوز آشکار نشده است.

تبادل ATP-ADP از عرض غشاء داخلی میتوکندری توسط نیروی محرکه پروتونی صورت می‌گیرد

علاوه بر سنتز ATP، نیروی محرکه پروتونی عرض غشای‌داخلی میتوکندری باعث قدرت بخشیدن به تبادل ATP حاصله از فسفریلاسیون اکسیداتیو داخل میتوکندری با ADP و P_i موجود در سیتوزول می‌گردد. این تبادل، که برای تأمین سوبسترای ADP و P_i فسفریلاسیون اکسیداتیو ضروری است، توسط دو پروتئین موجود در غشاء داخلی وساطت می‌گردد: یک *انتقال دهنده*[1] (آنتی‌پورتر HPO^{2-}_4/OH^-) که باعث ورود یک HPO^{2-}_4 و خروج یک H می‌گردد و یک *آنتی‌پورتر* ATP/ADP (شکل ۲۷ـ۱۲ را ملاحظه کنید).

آنتی‌پورتر ATP/ADP وقتی که یک مولکول ATP به‌طور خود به‌خودی خارج شود به یک مولکول ADP اجازه ورود می‌دهد. آنتی‌پورتر ATP/ADP، مولکول دایمر دارای دو زیر واحد ۳۰/۰۰۰Da می‌باشد که ۱۵ـ۱۰ درصد از پروتئین‌های غشای داخلی

1- Transporter

را تشکیل می‌دهد. بنابراین آن یکی از پروتئین‌های غالب میتوکندریایی می‌باشد. فعالیت دو آنتی‌پورتر با یکدیگر باعث ورود یک ADP^{3-} و یک P_i^{2-} و خروج یک مولکول ATP^{4-} و OH^- می‌گردد. هر OH^- که به خارج انتقال داده می‌شود با یک پروتون، (پروتونی که در هنگام انتقال الکترون به فضای بین غشایی انتقال یافته است) ترکیب شده و H_2O تشکیل می‌دهد. این عمل باعث پیشرفت انجام واکنش در جهت خروج ATP و ورود ADP و P_i می‌شود.

به دلیل این‌که تعدادی از پروتون‌های انتقال یافته به خارج از میتوکندری در انتقال الکترونی، باعث انجام مبادله ATP-ADP (با OH^- خارج شده ترکیب می‌شود) می‌گردد، برای سنتز ATP پروتون‌های کم‌تری باقی می‌ماند. تخمین زده می‌شود که به ازای هر چهار پروتونی که به خارج انتقال داده می‌شود، سه پروتون در سنتز یک مولکول ATP و یک پروتون برای انتقال ATP، در معاوضه باADP و P_i، مورد استفاده قرار می‌گیرد. مصرف انرژی ذخیره شده در شیب غلظت پروتونی به منظور خارج ساختن ATP از میتوکندری باعث تضمین نسبت بالای ATP به ADP در سیتوزول می‌شود، که هیدرولیز پیوند فسفوانیدریدی پر انرژی موجود در آن (ATP) به منظور انجام بسیاری از واکنش‌های انرژی‌خواه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برای اولین بار مطالعه دربارهٔ وجود فعالیت آنتی‌پورتر ATP/ADP به ۲۰۰۰ سال قبل می‌گردد. زمانی که دیوسکورید[1] وجود گیاه سمی *Atractylis gummifera* را که عمدتاً در نواحی مدیترانه‌ای یافت می‌شود، گزارش کرد. ماده مشابهی در داروی گیاهی سنتی چند منظوره (*Callilepis laureola*) *impila* در ناتالی جنوب افریقا[2] (Zulu) یافت می‌گردد. در Zulu، *impila* به معنی «سلامت» است اگرچه مسمومیت ناشی از این گیاه نیز مشاهده شده است. در سال ۱۹۶۲ ثابت شد که ماده فعال موجود در این گیاه، آتراکتیلوزید که آنتی‌پورتر ATP/ADP را مهار می‌کند، فسفریلاسیون اکسیداتیو ADP خارج میتوکندریایی را مهار می‌کند ولی ADP داخل میتوکندریایی را مهار نمی‌کند. این عمل اهمیت آنتی‌پورتر ATP/ADP را اثبات کرد و یک ابزار قدرتمندی در مطالعه مکانیسم عملکرد این ناقل گردید.

دیوسکورید (۹۰ـ۴۰ AD~) در Tarsus در عهد رم در جنوب غرب آسیا که امروزه ترکیه نامیده می‌شود زندگی می‌کرد. کتاب ۵ جلد ایشان De Materia Medica (مواد دارویی) دربارهٔ آماده‌سازی خواص و آزمایشات داروها می‌باشد و خواص دارویی تقریباً ۱۰۰۰ فراورده طبیعی و ۴۷۴۰ استفاده پزشکی آنها را مورد بحث قرار داده است. تقریباً ۱۶۰۰ سال این کتاب مرجع اصلی پزشکی از اروپای شمالی تا اقیانوس هند بود که قابل مقایسه با مرجع امروزی *Physicians' Desk Reference* که به عنوان راهنمای استفاده از داروها استفاده می‌گردد، می‌باشد.

سرعت اکسیداسیون میتوکندریایی به‌طور طبیعی به سطح ADP بستگی دارد

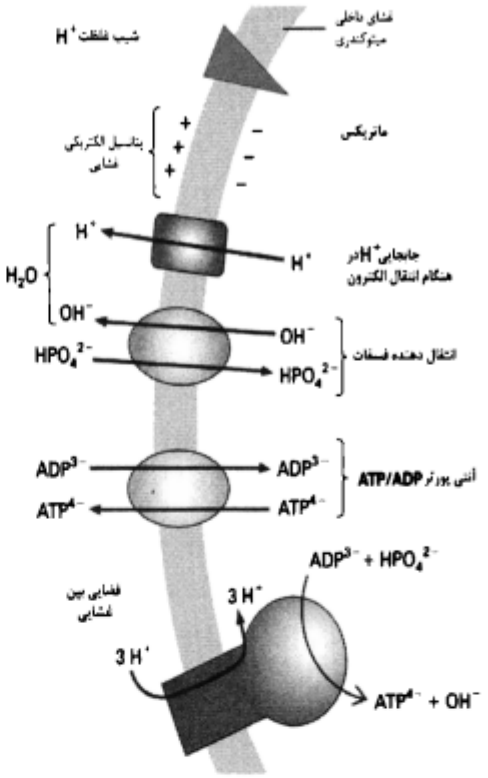
هر گاه میتوکندری‌های جدا شده سالم در حضور NADH (یا منبع $FADH_2$ مثل سوکسینات) به علاوه O_2 و P_i قرار داده شوند، اکسیداسیون NADH و احیا O_2 سریعاً متوقف می‌شود، به دلیل این‌که میزان ADP درون آن با تشکیل ATP تمام می‌شود. هر گاه ADP اضافه گردد اکسیداسیون NADH سریعاً شروع می‌گردد. بنابراین میتوکندری‌ها می‌توانند $FADH_2$ و NADH را تنها در حضور منبع ADP و P_i اکسید کرده و ATP تولید کنند. این پدیده، **کنترل تنفسی**[3] نامیده می‌شود و به دلیل این‌که اکسیداسیون NADH و سوکسینات ($FADH_2$) شدیداً با انتقال پروتون از عرض غشای داخلی میتوکندریایی جفت شده است، اتفاق می‌افتد. هر گاه نیروی محرکه پروتونی در هنگام سنتز ATP تضعیف نشود، هم شیب غلظت پروتونی عرض غشایی و هم پتانسیل الکتریکی غشاء به میزان زیادی افزایش خواهد یافت. در این لحظه برای پمپ کردن پروتون‌های دیگر از عرض غشای داخلی نیاز به انرژی بیشتری است به‌طوری که سرانجام پمپ شدن متوقف می‌گردد و اکسیداسیون NADH و سایر سوبستراها مهار می‌گردد.

میتوکندری‌های چربی قهوه‌ای از نیروی محرکه پروتونی به منظور تولید گرما استفاده می‌کنند

بافت چربی قهوه‌ای، که رنگ آن به خاطر حضور میتوکندری‌های فراوان می‌باشد، برای تولید گرما تخصص یافته است. بر خلاف آن، **بافت چربی سفید** به منظور ذخیره چربی تخصص یافته است و نسبتاً میتوکندری کم‌تری دارد.

غشاء داخلی میتوکندری‌های چربی قهوه‌ای دارای **ترموژنین** می‌باشد. این پروتئین به عنوان غیر جفت‌کننده[4] فسفریلاسیون اکسیداتیو و تولید نیروی محرکه پروتونی عمل می‌کند. ترموژنین، یا UCP_1 یکی از چندین پروتئین غیرجفت‌کننده (UCPs)

1- Dioscorides
2- Zulu
3- Respiratory control
4- Uncoupler



▲ **شکل ۲۷-۱۲ (شکل رنگی) سیستم انتقال فسفات و ATP/ADP در غشاء داخلی میتوکندریایی.** عمل هماهنگ دو آنتی‌پورتر (ارغوانی و سبز) منجر به جذب یک ADP^{3-} و یک HPO_4^{2-} در معاوضه با یک ATP^{4-} و یک هیدروکسیل می‌گردد. این عمل توسط خروج یک پروتون (توسط پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون، آبی) در هنگام انتقال الکترون، پیش برده می‌شود. غشاء خارجی به دلیل این‌که به مولکول‌های کوچک‌تر از ۵۰۰۰Da نفوذپذیر است در این‌جا نشان داده نشده است.

می‌باشد که در بسیاری از یوکاریوت‌ها (به جز مخمرهای تخمیرکننده) یافت می‌شود. ترموژنین با نفوذپذیر کردن غشای داخلی میتوکندریایی به پروتون، نیروی محرکه پروتونی را از بین می‌برد. در نتیجه انرژی آزاد شده از اکسیداسیون NADH در زنجیره انتقال الکترون به گرماتبدیل می‌گردد. ترموژنین کانال پروتونی نمی‌باشد بلکه یک انتقال دهنده پروتونی است و پروتون‌ها را از عرض غشاء به میزان یک میلیون برابر کم‌تر از کانال‌های یونی عبور می‌دهد (شکل ۳-۱۱ را ملاحظه کنید). ترموژنین از نظر توالی، مثل بیشتر پروتئین‌های انتقال دهنده میتوکندریایی که خانواده انتقال دهنده ATP/ADP راتشکیل می‌دهند، به انتقال دهنده ATP/ADP میتوکندریایی شباهت دارد. سموم خاص با وزن مولکولی کوچک نیز با نفوذپذیر کردن غشای داخلی میتوکندریایی به پروتون‌ها به عنوان غیرجفت‌کننده عمل می‌کنند. یک مثال از این موارد ماده شیمیایی محلول در چربی ۲ و ۴- دی نیتروفنول (DNP) می‌باشد که به‌طور برگشت‌پذیری به غشاء چسبیده و پروتون‌ها را از فضای بین غشایی به داخل ماتریکس هدایت می‌کند.

شرایط محیطی مقدار ترموژنین را در میتوکندری‌های چربی قهوه‌ای تنظیم می‌کند. برای مثال، وقتی رت‌ها به سرما سازش پیدا می‌کنند توانایی بافت‌های آنها برای تولید ATP با القا سنتز ترموژنین افزایش پیدا می‌کند. در جانورانی که به سرما سازش یافته‌اند ممکن است که ترموژنین تا ۱۵ درصد از کل پروتئین‌های غشاء داخلی میتوکندری را تشکیل دهد.

انسان بالغ چربی قهوه‌ای کم‌تری دارد، اما در نوزاد انسانی میزان آن بیشتر است. در نوزادان و نیز در پستاندارانی که به خواب زمستانی می‌روند تولید ترموژنین توسط میتوکندری‌های چربی قهوه‌ای برای بقا آن‌ها ضروری و حیاتی است. در خوک‌های آبی و سایر جانورانی که به‌طور طبیعی به سرما سازش یافته‌اند، میتوکندری‌های سلول عضلانی دارای ترموژنین می‌باشد در نتیجه مقدار بیشتر نیروی محرکه پروتونی برای تولید گرما استفاده می‌شود و دمای بدن حفظ می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۲

استفاده از نیروی محرکه پروتونی در فرآیندهای انرژی خواه

- پیتر میشل فرضیه شیمیواسموتیک را پیشنهاد کرد که طی آن نیروی محرکه پروتونی موجود در عرض غشای داخلی منبع مستقیم انرژی در سنتز ATP می‌باشد.
- باکتری‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها مکانیسم شیمیواسموتیک و ATP سنتاز مشابهی دارند.
- وقتی که پروتون‌ها از غشای داخلی میتوکندری در جهت شیب پروتونی الکتروشیمیایی حرکت می‌کنند آنزیم ATP سنتاز (کمپلکس F_0F_1) باعث سنتز ATP می‌شود.
- F_0 دارای یک حلقه C است که از ۱۴-۱۰ زیرواحد تشکیل شده است و به طور محکم به زیرواحد γ میله‌ای شکل و زیرواحد ϵ بخش F_1 متصل شده است. تمامی آنها در هنگام سنتز ATP چرخش می‌کنند. زیرا واحد γ به عنوان دسته هگزامر $[(\alpha\beta)_3]$ بخش F_1 عمل می‌کند و به سمت ماتریکس میتوکندری (سیتوزول در باکتری‌ها) برآمده است.

سه زیرواحد β مکان سنتز ATP می‌باشند (شکل ۲۴-۱۲ را ملاحظه کنید).

■ حرکت پروتون‌ها از میان دو نیمه کانال موجود در سطح تماس زیرواحد F_0 و حلقه c باعث چرخش حلقه c و زیرواحدهای ε و F_1 γ متصل به آن می‌گردد.

■ چرخش زیرواحد F_1 γ که به مرکز هگزامر $(\alpha\beta)_3$ فرورفته است و شبیه به میله چرخ دنده عمل می‌کند، باعث تغییرات کنفورماسیون مکان‌های تغییر اتصال در سه زیرواحد β می‌شود توسط مکانیسم تغییر اتصال زیر واحدهای β به ADP و P_i متصل شده و از آنها ATP تولید می‌کند و سپس آن را آزاد می‌کنند. در هر دور چرخش زیرواحدهای C، γ، و ε سه ATP ساخته می‌شود.

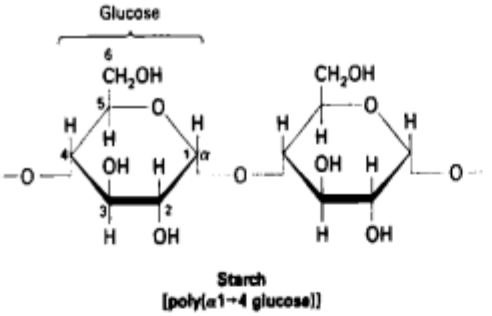
■ نیروی محرکه پروتونی همچنین به ازای خروج ATP و OH^- میتوکندریایی باعث جذب Pi و ADP از سیتوزول می‌شود و بنابراین مقداری از انرژی خود را برای سنتز ATP از دست می‌دهد. آنتی پورتر ATP/ADP که باعث مبادله این ترکیبات می‌شود یکی از پروتئین‌های فراوان غشای داخلی میتوکندری می‌باشد.

■ ادامه اکسیداسیون میتوکندریایی NADH و احیا O_2 بستگی به ADP موجود در ماتریکس دارد. این پدیده که به کنترل تنفسی معروف است مکانیسم مهمی در هماهنگی اکسیداسیون و سنتز ATP در میتوکندری‌ها می‌باشد.

■ در چربی قهوه‌ای، غشای داخلی میتوکندری دارای پروتئین غیرجفت کننده ترموژنین است. این پروتئین یک حامل پروتونی است که نیروی محرکه پروتونی را در تولید گرما از بین می‌برد. بعضی از مواد شیمیایی مانند DNP نیز به عنوان غیرجفت‌کننده عمل می‌کنند و باعث جفت نشدن فسفریلاسیون اکسیداتیو با انتقال الکترون می‌گردد.

۱۲.۴ فتوسنتز و رنگیره‌های جذب‌کننده نور

حال به فتوسنتز که یک فرایند اصلی ثانویه در سنتز ATP می‌باشد، می‌پردازیم. در گیاهان فتوسنتز در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد. کلروپلاست‌ها اندامک‌های بزرگی می‌باشند که به‌طور غالب در سلول‌های برگ گیاهان یافت می‌شوند. فراورده نهایی اصلی که از دی‌اکسیدکربن و آب تولید می‌گردد، دو کربوهیدرات می‌باشد که پلیمر قندهای هگزوز (۶ ـ کربنه) می‌باشند: ساکارز، دی‌ساکارید گلوکز ـ فروکتوز (شکل ۱۹ـ۲ را ملاحظه کنید) و **نشاسته** برگی که، پلیمر بزرگ گلوکز بوده و اصلی‌ترین ذخیره قندی در گیاهان عالی می‌باشد (شکل ۲۸ـ۱۲ را ملاحظه کنید).



▲ **شکل ۲۸ـ۱۲ ساختار نشاسته.** این پلیمر بزرگ گلوکز و دی‌ساکارید ساکارز (شکل ۱۹ـ۲)، فراورده اصلی و نهایی فتوسنتز می‌باشد. هر دو آنها از قندهای ۶ کربنه (هگزوزها) ساخته شده‌اند.

نشاسته برگی در کلروپلاست سنتز و ذخیره می‌گردد. ساکارز در سیتوزول برگ از پیش‌سازهای سه کربنی تولید شده در کلروپلاست سنتز می‌گردد؛ ساکارز به بافت‌های غیرفتوسنتزی (غیرسبز) مثل ریشه‌ها و دانه‌ها منتقل می‌گردد و منبع انرژی مسیرهایی که در بخش‌های قبل توضیح داده شد، می‌باشد. طی فتوسنتز در گیاهان و همچنین در جلبک‌های تک سلولی یوکاریوتی و باکتری‌های فتوسنتزی (مثل سیانوباکترها و پروکلروفیت‌ها) نیز اکسیژن تولید می‌گردد. واکنش کلی فتوسنتز که اکسیژن تولید می‌کند به صورت زیر است:

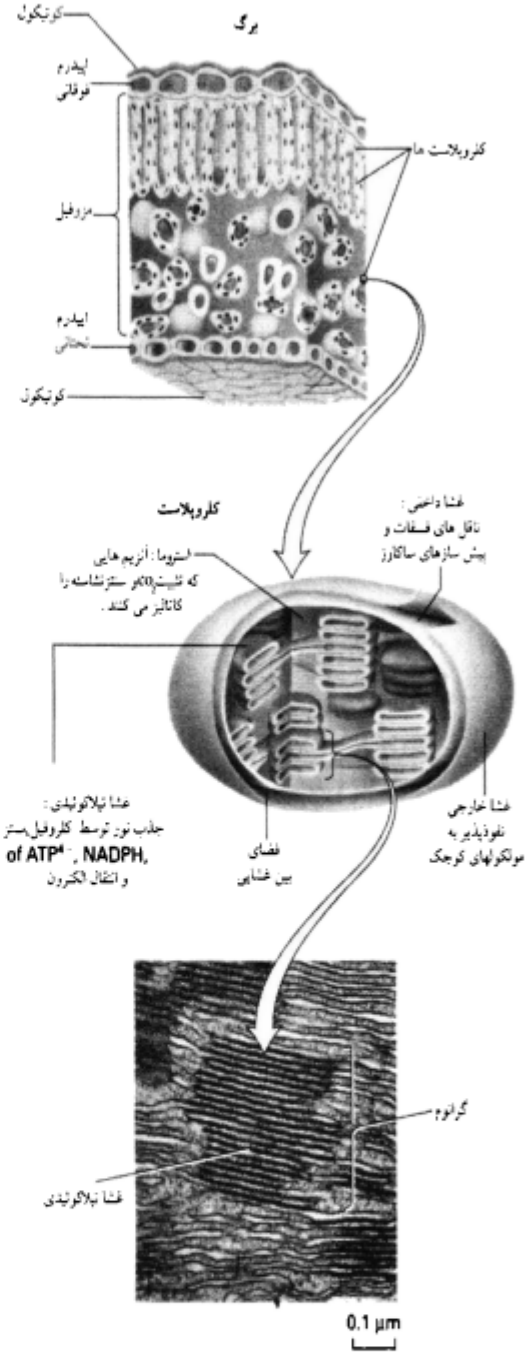
$$6CO_2+6H_2O \rightarrow 6O_2+C_6H_{12}O_6$$

این واکنش عکس واکنش کلی اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها به CO_2 و H_2O می‌باشد. در واقع در فتوسنتز قندهای پر انرژی تولید می‌شود که توسط میتوکندری‌ها در فرایند تنفس سلولی شکسته شده و انرژی آنها مورد مصرف قرار می‌گیرد.

اگرچه باکتری‌های سبز و ارغوانی نیز فتوسنتز انجام می‌دهند، ولی آنها از یک فرایندی استفاده می‌کنند که اکسیژن تولید نمی‌کند. همان‌طور که در بخش ۵ـ۱۲ بحث شده است، آنالیز جزئیات سیستم فتوسنتزی در این باکتری‌ها، مراحل اولیه فرایند فتوسنتز تولیدکننده اکسیژن را نشان می‌دهد. در این بخش ما مروری کلی بر مراحل فتوسنتز تولیدکننده اکسیژن خواهیم داشت و اجزای اصلی مثل کلروفیل‌ها که مهم‌ترین و اصلی‌ترین رنگیزه‌های جذب‌کننده نور هستند را معرفی می‌کنیم.

غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست‌ها مکان فتوسنتز در گیاهان می‌باشند

کلروپلاست‌ها به صورت عدسی شکل با قطر تقریبی ۵ μm و



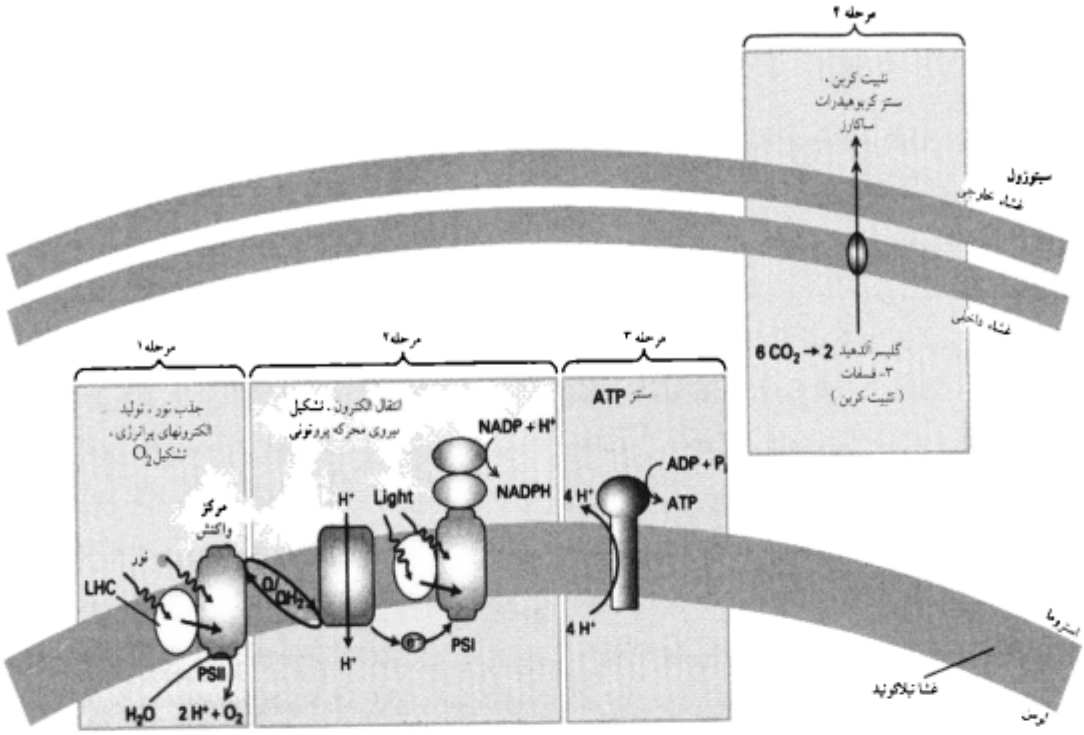
▲ **شکل ۲۹ـ۱۲ ساختار سلولی برگ و کلروپلاست.** مانند میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌های گیاهی نیز توسط یک غشای دو لایه‌ای که دارای فضای بین غشایی است، احاطه شده است. فتوسنتز در یک غشای سوم، غشای تیلاکوئیدی، که توسط غشای داخلی احاطه شده است و یک سری وزیکول‌های پهن (تیلاکوئیدها) که فضای داخلی مرتبط به هم به نام فضای لومینال دارند، اتفاق می‌افتد. رنگ سبز گیاهان به دلیل رنگ سبز کلروفیل است که تمامی آن در غشای تیلاکوئیدی قرار گرفته است. به روی هم قرار گرفتن سکه مانند تیلاکوئیدها گرانوم گفته می‌شود. استروما فضایی است که توسط غشای داخلی احاطه شده است و تیلاکوئیدها را در برمی‌گیرد.

عرض ۲/۵μm بوده و توسط دو غشاء که فاقد کلروفیل هستند و مستقیماً در فتوسنتز مشارکتی ندارند، احاطه شده‌اند (شکل ۲۹ـ۱۲).مثل میتوکندری‌ها، غشای خارجی کلروپلاست‌ها دارای پورین می‌باشد و بنابراین به متابولیت‌هایی با وزن مولکولی کوچک نفوذپذیر می‌باشد. غشای داخلی یک مانع نفوذپذیر می‌باشد و دارای پروتئین‌های ناقل می‌باشد که ورود و خروج مواد به اندامک را تنظیم می‌کند.

بر خلاف میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها دارای یک غشای سومی نیز می‌باشند ـ **غشای تیلاکوئیدی** ـ که فتوسنتز در آنجا اتفاق می‌افتد. عقیده بر این است که غشای تیلاکوئیدی کلروپلاست یک صفحه واحدی را تشکیل می‌دهد که ساختارهای کوچک و پهن مرتبط به هم، **تیلاکوئیدها**، را تشکیل می‌دهد. تیلاکوئیدها به صورت سکه‌هایی بر روی هم آرایش یافته‌اند و *گرانا* نامیده می‌شود (شکل ۲۹ـ۱۲). فضای موجود بین تمامی تیلاکوئیدها یک بخش ممتدی است که **لومن تیلاکوئیدی** نامیده می‌شود. غشای تیلاکوئیدی دارای تعداد زیادی پروتئین سراسری غشایی می‌باشد که دارای گروه‌های پروستتیک مهم و رنگیزه‌های جذب‌کننده نور، عمدتاً کلروفیل، می‌باشند. سنتز کربوهیدرات در *استروما*، فاز محلول بین غشای تیلاکوئیدی و غشای داخلی، اتفاق می‌افتد. در باکتری‌های فتوسنتزکننده فرورفتگی‌های وسیع غشای پلاسمایی باعث به وجود آمدن یک سری غشاهای داخلی می‌گردد که غشای تیلاکوئیدی نامیده می‌شود و محل انجام فتوسنتز می‌باشد.

سه مرحله از چهار مرحله فتوسنتز تنها در روشنایی رخ می‌دهد

فرایند فتوسنتز در گیاهان را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد (شکل ۳۰ـ۱۲) که هر مرحله در فضای مشخصی از کلروپلاست انجام می‌شود: (۱) جذب نور، تولید الکترون پر انرژی و تشکیل O_2 از H_2O؛ (۲) انتقال الکترون که منجر به احیا $NADP^+$ به NADPH می‌گردد و تولید نیروی محرکه پروتونی؛ (۳) سنتز ATP؛ و (۴) تبدیل CO_2 به کربوهیدرات که به **تثبیت کربنی** معروف است. تمامی چهار مرحله فتوسنتز شدیداً با یکدیگر در ارتباطند و شدیداً کنترل می‌شوند تا مقدار کربوهیدرات مورد نیاز برای گیاه را تولید کنند. همه واکنش‌های مراحل ۳ـ۱ توسط کمپلکس‌های چند پروتئینی موجود در غشای تیلاکوئیدی کاتالیز می‌گردد. تولید pmf و استفاده از pmf به منظور سنتز ATP مشابه مراحل III و IV فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی می‌باشد. آنزیم‌هایی که CO_2 را وارد حد واسطهای شیمیایی می‌کنند و سپس آنها را به



▲ **شکل ۳۰-۱۲ مرور کلی بر چهار مرحله فتوسنتز. در مرحله ۱**، نور توسط کمپلکس‌های جمع‌کننده (LHC) و مرکز واکنش فتوسنتز II (PSII) جذب می‌گردد. LHCها انرژی جذب شده را به مرکز واکنش انتقال میدهند، تا در آنجا استفاده شود، یا انرژی جذب شده از فوتون را به منظور اکسید کردن آب به اکسیژن مولکولی و تولید الکترون‌های پر انرژی انتقال می‌دهند. **در مرحله ۲**، این الکترون‌ها به سمت پایین زنجیره انتقال الکترونی حرکت می‌کنند. در این مرحله، از حامل‌های الکترونی محلول در چربی (Q/QH_2) یا محلول در آب (پلاستوسیانین، PC) به منظور انتقال الکترون‌ها بین کمپلکس‌های پروتئینی مختلف استفاده می‌شود. وقتی که الکترون‌ها به سمت پایین زنجیره حرکت می‌کنند آنها انرژی خود را آزاد می‌کنند و کمپلکس‌ها از این انرژی در تولید نیروی محرکه پروتونی استفاده می‌کنند، بعد از این‌که انرژی بیشتری توسط جذب نور به فتوسیستم I (PSI) وارد شد در سنتز حامل الکترونی پر انرژی NADPH، استفاده می‌شود. **در مرحله ۳**، حرکت پروتونی ناشی از نیروی محرکه پروتونی باعث سنتز ATP توسط ATP F_0F_1 سنتاز می‌گردد. **مراحل ۳-۱** در غشای تیلاکوئیدی کلروپلاست‌ها اتفاق می‌افتد. در مرحله ۴، در استرمای کلروپلاست، انرژی ذخیره شده در NADPH و ATP طی فرایندی به نام تثبیت کربن در تبدیل CO_2 به مولکول‌های سه کربنه (گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات) مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مولکول‌ها سپس به سیتوزول سلول انتقال داده می‌شود تا به قندهای هگزوز به فرم ساکارز تبدیل شوند. گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات در ساخته شدن نشاسته در کلروپلاست نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نشاسته تبدیل می‌کند از اجزای محلول استرومای کلروپلاست می‌باشد؛ آنزیم‌هایی که ساکارز را از حد واسط‌های سه کربنه می‌سازند در سیتوزول قرار دارند.

مرحله ۱: جذب نور. مرحله اول در فتوسنتز جذب نور توسط کلروفیل‌هایی است که به پروتئین‌هایی موجود در غشاهای تیلاکوئیدی متصل هستند. مانند اجزاء همی سیتوکروم‌ها، کلروفیل‌ها از حلقه پورفیرینی که دارای زنجیره جانبی طویل هیدروکربنی می‌باشد ساخته شده‌اند (شکل ۳۱-۱۲). بر خلاف هم (شکل ۱۴-۱۲ را ملاحظه کنید)، کلروفیل‌ها دارای یک یون Mg^{2+} مرکزی (به جای Fe) هستند و یک حلقه ۵ ضلعی اضافی دارند. انرژی نور جذب شده سرانجام در برداشتن الکترون‌ها از یک دهنده (در گیاهان سبز آب) مورد استفاده قرار می‌گیرد و اکسیژن تشکیل می‌شود:

$$2H_2O \xrightarrow{\text{نور}} O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

الکترون‌ها به *پذیرنده اولیه الکترون*، کینون که با Q نشان داده می‌شود و مشابه CoQ در میتوکندری‌ها می‌باشد، منتقل می‌گردد. در گیاهان، اکسیداسیون آب در یک کمپلکس چند پروتئینی به نام فتوسیستم II (PSII) اتفاق می‌افتد.

مرحله ۲: انتقال الکترون و تولید نیروی محرکه پروتونی

الکترون‌ها از طریق یک سری حامل‌های الکترون از پذیرنده اولیه الکترون کینون به پذیرنده نهایی الکترون، معمولاً فرم اکسید شده نیکوتینامیدآدنین دی‌نوکلئوتید فسفات ($NADP^+$) حرکت می‌کنند و آن را به NADPH احیا می‌کنند. $NADP^+$ مشابه NAD^+ می‌باشد با این تفاوت که در ساختار آن یک گروه فسفات اضافی وجود دارد. هر دو آنها الکترون‌ها را به‌طور مشابه دریافت و از دست می‌دهند (شکل ۳۳ـ۲ را ملاحظه کنید). در گیاهان احیا $NADP^+$ در کمپلکسی به نام **فتوسیستم I** (PSI) رخ می‌دهد. انتقال الکترون‌ها در غشای تیلاکوئیدی با حرکت پروتون‌ها از استروما به لومن تیلاکوئیدها همراه شده است و باعث تشکیل شیب pH در عرض غشاء می‌گردد (لومن pH < استروما pH). این فرایند مشابه ایجاد نیروی محرکه پروتونی در عرض غشای داخلی میتوکندری و غشای پلاسمایی باکتریایی در هنگام انتقال الکترون می‌باشد (شکل ۲۲ـ۱۲ را ملاحظه کنید).

بنابراین واکنش کلی مراحل ۱ و ۲ را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

$$2H_2O + 2NADP^+ \rightarrow 2H^+ + 2NADPH + O_2$$

مرحله ۳: سنتز ATP. پروتون‌ها در جهت شیب غلظتی خودشان از لومن تیلاکوئید به واسطه کمپلکس F_0F_1 (ATP سنتاز) به استروما حرکت می‌کنند، این کمپلکس در اثر حرکت پروتون باعث سنتز ATP می‌شوند. ATP سنتاز کلروپلاستی مشابه سنتاز میتوکندری‌ها و باکتری‌ها عمل می‌کند (شکل ۲۵ـ۱۲ را ملاحظه کنید).

مرحله ۴: تثبیت کربن. ATP و NADPH تولید شده در مراحل دوم و سوم فتوسنتز انرژی و الکترون‌های لازم برای سنتز پلیمرهای قندهای شش کربنه را از CO_2 و H_2O فراهم می‌نماید. معادله شیمیایی کلی به صورت زیر است:

$$6CO_2 + 18ATP^{4-} + 12NADPH + 12H_2O \rightarrow$$
$$C_6H_{12}O_6 + 18ADP^{3-} + 18P_i^{2-} + 12NADP^+ + 6H^+$$

واکنش‌هایی که در آنها ATP و NADPH لازم برای تثبیت کربن تولید می‌گردد، مستقیماً به انرژی نورانی وابسته هستند؛ بنابراین مراحل ۳ـ۱ ***واکنش‌های نورانی*** فتوسنتز نامیده می‌شوند. واکنش‌های مرحله ۴ به‌طور غیرمستقیم به انرژی نورانی وابسته است؛ آنها معمولاً ***واکنش‌های تاریکی*** فتوسنتز نامیده می‌شوند زیرا در تاریکی می‌توانند انجام شوند، و از انرژی ATP و NADPH تولید شده توسط انرژی نورانی استفاده می‌کنند. علی‌رغم این، واکنش‌های مرحله ۴ به تاریکی محدود نشده‌اند و در واقع در روز نیز رخ می‌دهند.

هر فوتون نور دارای مقدار مشخصی انرژی می‌باشد

مکانیک کوانتوم ثابت کرده است که نور، شکلی از تابش الکترومغناطیسی، هم خاصیت موجی و هم خاصیت ذره‌ای دارد. وقتی که نور با ماده برخورد می‌کند به صورت بسته‌های مجزای انرژی (کوانتا) بنام فوتون رفتار می‌کند. انرژی هر فوتون به فرکانس امواج نوری وابسته است: $\epsilon = h\gamma$، h ثابت پلانک ($۶/۶۳\times۱۰^{-۳۴}$ j.s یا $۱/۵۸\times۱۰^{-۳۴}$ cal.s) و γ فرکانس امواج نوری می‌باشد. در زیست‌شناسی رایج است که به جای فرکانس γ از طول موج λ نور استفاده شود. ارتباط دو مورد فوق با معادله ساده $\gamma = c/\lambda$ بیان می‌شود که در آن c سرعت نور (۳×۱۰^{۱۰} cm/s در خلاء) می‌باشد. توجه داشته باشید که فوتون‌هایی با طول موج کوتاه‌تر انرژی بالاتری دارند. هم‌چنین انرژی یک مول فوتون را می‌توان با $E = N\epsilon$ نشان داد که در آن N عدد آووگادرو می‌باشد ($۶/۰۲\times۱۰^{۲۳}$ مولکول یا فوتون در مول). بنابراین:

$$E = Nh\gamma = \frac{Nhc}{\lambda}$$

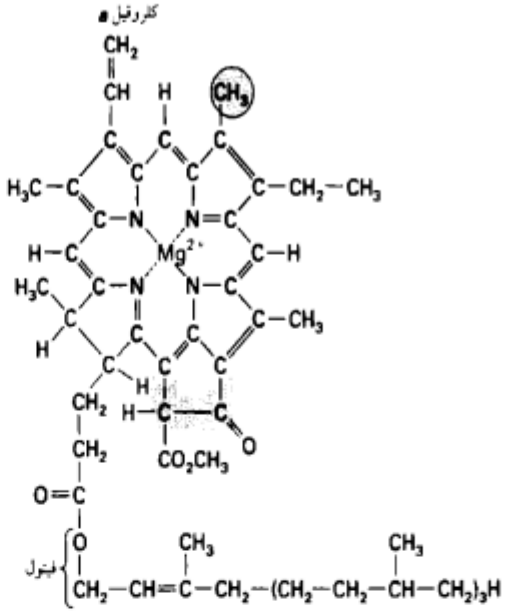
انرژی نورانی قابل ملاحظه است و ما می‌توانیم انرژی نوری با طول موج ۵۵۰nm (۵۵۰×۱۰^{-۷} cm)، نور خورشید، را بصورت زیر محاسبه می‌کنیم:

$$E = \frac{(۶/۰۲\times۱۰^{۲۳}\ \text{مول/فوتون})(۱/۵۸\times۱۰^{-۳۴}\ \text{cal.s})(۳\times۱۰^{۱۰}\ \text{cm/s})}{۵۵۰\times۱۰^{-۷}\ \text{cm}}$$
$$= ۵۱/۸۸۱\ \text{cal/mol}$$

یا تقریباً ۵۲ kcal/mol است. این انرژی هر گاه به منظور سنتز ATP استفاده شود برای سنتز چندین مول ATP از ADP و P_i کافی است.

فتوسیستم‌ها شامل یک مرکز واکنش و کمپلکس‌های جمع‌کننده نور وابسته می‌باشند

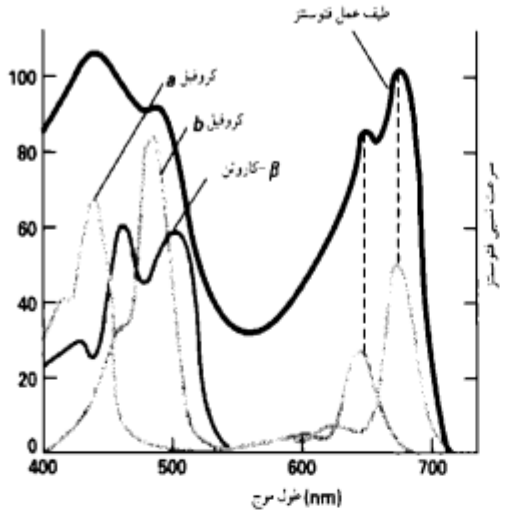
جذب انرژی نورانی و تبدیل آن به انرژی شیمیایی در کمپلکس‌های چند پروتئینی به نام **فتوسیستم‌ها** اتفاق می‌افتد. فتوسیستم‌ها که در همه موجودات فتوسنتز کننده، هم یوکاریوتی و هم پروکاریوتی، یافت می‌شوند از دو جز بسیار نزدیک به هم تشکیل شده است: یک ***مرکز واکنش*** که در آنجا مراحل اولیه فتوسنتز رخ می‌دهد، و یک کمپلکس آنتنی که از کمپلکس‌های پروتئینی زیادی



▲ **شکل ۱۲ـ۳۱ ساختار کلروفیل a، رنگیزه اصلی که انرژی نورانی را به دام می‌اندازد.** الکترون‌ها بین سه حلقه از چهار حلقه مرکزی کلروفیل (زرد) و اتم‌هایی که آنها را به یکدیگر وصل می‌کند جابه‌جا می‌شود. در کلروفیل، یک یون Mg^{2+}، به جای یون Fe^{3+} موجود در هم، در مرکز حلقه پورفیرین قرار می‌گیرد و یک حلقه پنج ضلعی اضافه (آبی) نیز وجود دارد؛ به عبارت دیگر ساختار کلروفیل مشابه هم موجود در مولکول‌هایی مثل هموگلوبین و سیتوکروم‌ها می‌باشد (شکل a ۱۴ـ۱۲ را ملاحظه کنید). «دم» هیدروکربنی فیتول باعث تسهیل اتصال کلروفیل به نواحی هیدروفوبیک پروتئین‌های اتصالی به کلروفیل می‌گردد. گروه CH_3 (سبز) در کلروفیل b با گروه فرمالدهید (CHO) جایگزین شده است.

تشکیل شده است و شامل آنتن درونی در داخل فتوسیستم‌ها و آنتن خارجی که از پروتئین‌های تخصص یافته به نام ***کمپلکس‌های جمع‌کننده نور*** (LHCs)[1] می‌باشند. کمپلکس‌های جمع‌کننده، انرژی نورانی را جذب کرده و آن را به مرکز واکنش انتقال می‌دهند (شکل ۱۲ـ۳۰ را ملاحظه کنید).

مراکز واکنش و آنتن‌ها دارای مولکول‌های رنگیزه جذب‌کننده نور می‌باشند که به‌طور محکم به آنها متصل شده‌اند. کلروفیل a رنگیزه اصلی درگیر در فتوسنتز می‌باشد که هم در مراکز واکنش و هم در آنتن‌ها وجود دارد. آنتن‌ها علاوه بر کلروفیل a، دارای رنگیزه‌های جذب‌کننده نور دیگری نیز می‌باشند: ***کلروفیل b*** در گیاهان آوندار و ***کاروتنوئیدها*** هم در گیاهان و هم در باکتری‌های فتوسنتزی. کاروتنوئیدها از زنجیره هیدروکربنی طویل شاخه‌دار تشکیل شده است که در آن پیوندهای یگانه و دوگانه به‌طور متناوب قرار گرفته‌اند؛



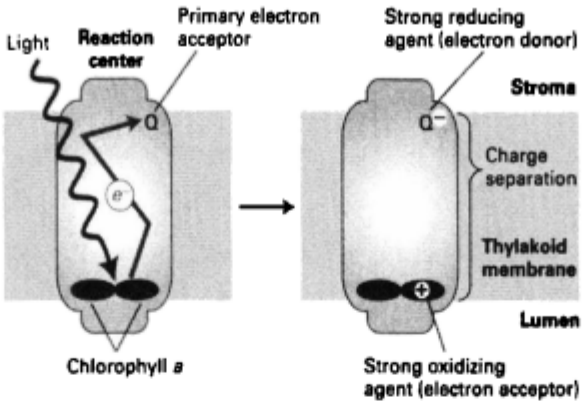
▲ **شکل تجربی ۱۲ـ۳۲(شکل رنگی) سرعت فتوسنتز در طول موج‌های نور جذب شده توسط سه رنگیزه حداکثر است.** طیف عمل فتوسنتز در گیاهان (توانایی نور طول موج‌های مختلف در تأمین فتوسنتز) به صورت سیاه نشان داده شده است. انرژی نور تنها زمانی به ATP تبدیل می‌گردد که توسط رنگیزه‌های موجود در کلروپلاست جذب گردد. طیف‌های جذبی (نشان‌دهنده نور جذب شده طول موج‌های مختلف) برای سه رنگیزه فتوسنتزی موجود در آنتن‌های فتوسیستم‌های گیاهی بصورت رنگی نشان داده شده است. مقایسه طیف عمل با طیف‌های جذبی جداگانه نشان می‌دهد که فتوسنتز در ۶۸۰nm اساساً به دلیل نور جذب شده توسط کلروفیل a، در ۶۵۰nm به دلیل نور جذب شده توسط کلروفیل b، و در طول موج‌های پایین‌تر به دلیل نور جذب شده توسط کلروفیل‌های a و b و توسط رنگیزه‌های کاروتنوئیدی مثل β ـ کاروتن می‌باشد.

آنها از نظر ساختاری به رنگیزه بینایی (رتینال که جذب‌کننده نور در چشم می‌باشد) شباهت دارد. حضور رنگیزه‌های متنوع آنتنی، که نور دارای طول موج‌های مختلف را جذب می‌کنند، باعث می‌شود که محدوده وسیعی از نور جذب گردد و در فتوسنتز مورد استفاده قرار گیرد.

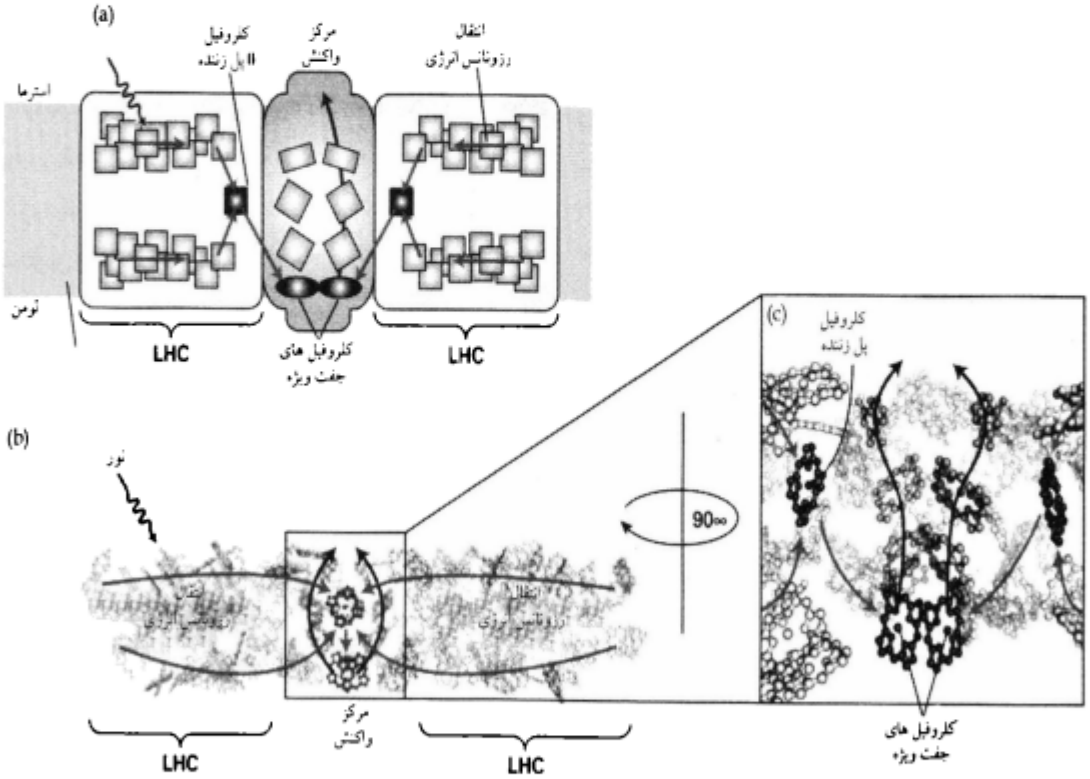
یکی از مدارک قوی برای دخالت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در فتوسنتز این است که طیف جذبی این رنگیزه‌ها مشابه طیف عمل فتوسنتز می‌باشد (شکل ۱۲ـ۳۲). طیف عمل، میزان توانایی نسبی نور طول موج‌های مختلف در تأمین فتوسنتز می‌باشد.

وقتی که کلروفیل a (یا هر مولکول دیگری) نور مرئی را جذب کند، انرژی نور جذب شده باعث تهییج الکترون‌ها در کلروفیل a به حالت پر انرژی (تهییج شده) می‌گردد. این حالت اساساً از نظر توزیع

1 -Light-harvesting complexes



▲ **شکل ۱۲-۳۳ (شکل رنگی) انتقال فوتوالکترون، اولین اتفاق در فتوسنتز.** بعد از جذب فوتون نور، یکی از جفت‌های ویژه تهییج شده کلروفیل a در مرکز واکنش (چپ) از طریق چندین حد واسط یک الکترون به مولکول پذیرنده‌ای که به صورت سست، کینون Q، به سطح استرمایی غشای تیلاکوئیدی متصل شده است، می‌دهد و باعث ایجاد تفکیک بار برگشت‌ناپذیر از عرض غشاء می‌گردد (راست). الکترون نمی‌تواند به سادگی به مرکز واکنش برگردد و کلروفیل a دارای بار مثبت را خنثی کند. در گیاهان اکسیداسیون آب به اکسیژن مولکولی در کمپلکس چند پروتئینی به نام فتوسیستم II اتفاق می‌افتد. کمپلکس فتوسیستم I از یک مسیر انتقال فوتوالکترونی مشابهی استفاده می‌کند اما به جای اکسید کردن آب، حامل الکترونی $NADP^+$ را احیا می‌کند.



▲ **شکل ۱۲-۳۴ (شکل رنگی) کمپلکس‌های جمع‌کننده نور و فتوسیستم‌های موجود در سیانوباکترها و گیاهان.** (a) دیاگرام غشاء یک سیانوباکتر که در آن کمپلکس چند پروتئینی جمع‌کننده نور (LHC) دارای ۹۰ مولکول کلروفیل (سبز) و ۳۱ مولکول کوچک دیگر می‌باشد. تمامی این مولکول‌ها در یک آرایش فضایی ویژه قرار می‌گیرند تا حداکثر جذب نور و انتقال انرژی را داشته باشند. از ۶ مولکول کلروفیل موجود در مرکز واکنش، دوتا، یک جفت کلروفیل ویژه (بیضی‌های سبز تیره) هستند که می‌توانند در زمان تهییج (فلش آبی) انتقال فوتوالکترونی را آغاز کنند. انتقال رزونانسی انرژی (فلش‌های قرمز) سریعاً انرژی را از نور جذب شده به یکی از دو کلروفیل «پل زننده» (مربعات سبز تیره) و سپس به کلروفیل‌های موجود در مرکز واکنش انتقال می‌دهد. (b) سازمان‌یابی سه‌بعدی فتوسیستم I (PSI) و LHCهای آن در *Pisum sativum* (نخودفرنگی) که با کریستالوگرافی اشعه ـ x تعیین شده است. تنها کلروفیل‌ها و حامل‌های الکترونی مرکز واکنش نشان داده شده است. c) نمای بزرگ شده از مرکز واکنش (b) که به اندازه °۹۰ در محور عمودی چرخش یافته است.

الکترون‌ها در اطراف اتم‌های C و N حلقه پورفیرین از حالت پایه (تهییج نشده) متفاوت می‌باشد. حالت‌های تهییج شده ناپایدار می‌باشند و الکترون‌ها طی فرایندهای مختلفی به حالت پایه بر می‌گردند. در کلروفیل a که در محلول‌های آبی مثل اتانول حل می‌گردد، واکنش‌های اصلی که انرژی حالت تهییج شده را از بین می‌برند به صورت نشر نور (فلورسانس و فسفرسانس) و نشر حرارت (گرما) می‌باشد. وقتی که همان کلروفیل a به محیط پروتئینی ویژه‌ای در مرکز واکنش متصل است، از بین رفتن انرژی حالت تهییج شده توسط فرایندی کاملاً متفاوت اتفاق می‌افتد این فرآیند کلید فتوسنتز می‌باشد.

انتقال فوتوالکترونی از کلروفیل a پر انرژی موجود در مرکز واکنش باعث تفکیک بار می‌شود

جذب فوتون نوری با طول موج ۶۸۰nm ≃ توسط یکی از یک جفت کلروفیل a ویژه[1] موجود در مرکز واکنش انرژی آن را ۴۲ kcal/mol (اولین حالت تهییج شده) افزایش می‌دهد. چنین کلروفیل a پرانرژی در مرکز واکنش سریعاً یک الکترون به یک پذیرنده حد واسط می‌دهد و الکترون سریعاً به پذیرنده اولیه الکترونی، کینون Q، نزدیک سطح استرومایی غشای تیلاکوئیدی وارد می‌شود (شکل ۳۳ـ۱۲). این انتقال الکترونی با واسطه نور، که **انتقال فوتوالکترونی**[2] نامیده می‌شود، به محیط ویژه هم کلروفیل‌ها و پذیرنده موجود در مرکز واکنش بستگی دارد. انتقال فوتوالکترونی، که تقریباً هر لحظه که فوتونی جذب می‌گردد اتفاق می‌افتد، باعث باردار کردن (بار مثبت) کلروفیل a نزدیک سطح لومینال غشای تیلاکوئید (سمت مخالف استرما) می‌گردد و در نزدیک سطح استرمایی باعث تولید پذیرنده احیایی با بار منفی (Q^-) می‌گردد.

Q^- تولید شده در اثر انتقال فوتوالکترونی یک فاکتور احیایی قوی می‌باشد که تمایل قوی به انتقال الکترون به مولکول دیگر و در نهایت $NADP^+$ دارد. کلروفیل a دارای بار مثبت، یک مولکول شدیداً اکسید شده، یک الکترون از دهنده الکترونی موجود در سطح لومینال جذب می‌کند و مجدداً کلروفیل a اولیه تولید می‌کند. در گیاهان، قدرت اکسیدکنندگی چهار مولکول کلروفیل a^+ به کمک حد واسطها، به منظور برداشتن چهار الکترون از دو مولکول H_2O متصل به مکانی در سطح لومینال و تولید O_2 مورد استفاده قرار می‌گیرد:

$$2H_2O + 4a^+_{\text{کلروفیل}} \rightarrow 4H^+ + O_2 + 4a_{\text{کلروفیل}}$$

این اکسنده‌ها و احیاکننده‌های زیستی کل انرژی مورد نیاز برای پیش بردن تمامی واکنش‌های فتوسنتز را فراهم می‌کنند: انتقال الکترونی (مرحله ۲)، سنتز ATP (مرحله ۳)، و تثبیت CO_2 (مرحله ۴).

کلروفیل a همچنین نور را در طول موج‌های کوتاه‌تر از ۶۸۰nm جذب می‌کند (شکل ۳۲ـ۱۲ را ملاحظه کنید). چنین جذبی باعث می‌شود مولکول به یکی از چند سطح تهییج شده، که انرژی آنها بیشتر از حالت تهییج شده اولیه گفته شده در بالا می‌باشد، برسد. این حالت با از دست دادن انرژی در 10^{-12} ثانیه (یک پیکو ثانیه، ps) که بیشتر آن به صورت گرما می‌باشد، به حالت اولیه کم انرژی می‌رسد. به دلیل این‌که انتقال فوتوالکترونی و تفکیک بار حاصل از آن تنها از حالت تهییج شده اولیه کلروفیل a مرکز واکنش رخ می‌دهد، بازده کوانتومی (میزان فتوسنتز به فوتون جذب شده) برای تمامی طول موج‌های نور مرئی کوتاه‌تر (انرژی بیشتر) از ۶۸۰nm یکسان می‌باشد. این‌که چقدر طول موج نور با طیف‌های جذبی رنگیزه‌ها متناسب است تعیین‌کننده احتمال جذب فوتون می‌باشد. زمانی که فوتونی جذب شد، صرف‌نظر از این‌که طول موج دقیق آن چقدر است، انرژی لازم برای رساندن کلروفیل به حالت تهییج شده اولیه را دارا می‌باشد.

آنتن داخلی و کمپلکس‌های جمع‌کننده نور کارایی فتوسنتز را افزایش می‌دهند

اگرچه مولکول‌های کلروفیل a موجود در یک مرکز واکنش که به‌طور مستقیم در تفکیک بار و انتقال الکترون درگیر هستند و توانایی جذب مستقیم نور و آغاز فتوسنتز را دارند، اما آنها عموماً به‌طور غیرمستقیم از طریق رنگیزه‌های دیگر جذب‌کننده نور و انتقال‌دهنده انرژی، انرژی کسب می‌کنند. این رنگیزه‌های دیگر، که شامل بسیاری از مولکول‌های دیگر کلروفیل می‌باشند، در جذب فوتون‌ها و انتقال انرژی به مولکول‌های کلروفیل a مرکز واکنش نقش دارند. بعضی از این رنگیزه‌ها به زیر واحدهای پروتئینی که از اجزای داخلی فتوسیستم می‌باشند و بنابراین آنتن‌های داخلی نامیده می‌شوند متصل می‌شوند؛ بعضی دیگر از این رنگیزه‌ها به کمپلکس‌های پروتئینی، که خودشان به پروتئین‌های مرکزی فتوسیستم متصل هستند ولی متفاوت از آنها هستند، و کمپلکس‌های جمع‌کننده نور (LHC) نامیده می‌شوند متصل می‌شوند. حتی در حداکثر شدت نور

1 - Special-pair
2- Photoectron transport

(آفتاب ظهری گرمسیری) در موجودات فتوسنتزکننده هر مولکول کلروفیل a مرکز واکنش تنها در هر ثانیه یک فوتون جذب می‌کند که نیاز فتوسنتزی گیاه را تأمین نمی‌کند. دخالت آنتن داخلی و LHCها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کارایی فتوسنتز را، مخصوصاً در شدت‌های نوری معمولی، با افزایش جذب نور ۶۸۰nm و افزایش محدوده طول موج‌های نور که توسط رنگیزه‌های دیگر آنتن می‌تواند جذب شود، افزایش می‌دهند.

فوتون‌ها توسط مولکول‌های رنگیزه موجود در آنتن‌ها یا توسط LHC جذب می‌شوند. سپس انرژی جذب شده سریعاً (در $<10^{-9}$ ثانیه) به یکی از یک جفت کلروفیل a ویژه موجود در مرکز واکنش انتقال یافته تا در آنجا تفکیک بار فتوسنتزی اولیه را شروع کند (شکل ۱۲-۳۳). پروتئین‌های مرکزی فتوسیستم و پروتئین‌های LHC، مولکول‌های رنگیزه را در آرایش و موقعیت دقیق و بهینه حفظ می‌کنند تا حداکثر جذب و انتقال انرژی را داشته باشند، بنابراین ***انتقال رزوناس***[1] بسیار سریع و کارامد انرژی را از رنگیزه‌های آنتن به کلروفیل‌های مرکز واکنش افزایش می‌دهند. انتقال انرژی رزونانس نقشی در انتقال الکترونی ندارد. مطالعات انجام شده بر روی یکی از دو فتوسیستم موجود در سیانوباکترها، که مشابه فتوسیستم‌های موجود در گیاهان عالی می‌باشد، نشان می‌دهد که انرژی حاصل از نور جذب شده ابتدا به کلروفیل «پل زننده»[2] موجوددر هر LHC و سپس به یک جفت ویژه کلروفیل مرکز واکنش وارد می‌شود (شکل a ۱۲-۳۴). به‌طور شگفت‌انگیزی، علی‌رغم این‌که ساختارهای مولکولی LHCهای گیاهان و سیانو باکترها کاملاً از LHCهای باکتری سبز و ارغوانی متفاوت هست، هر دو دارای کاروتنوئیدها و کلروفیل‌هایی می‌باشد که به صورت مجموعه‌ای در غشاء آرایش یافته‌اند. شکل b ۱۲-۳۴ توزیع رنگیزه‌های کلروفیل و آنتن‌های LHCI اطراف آن را در فتوسیستم I گیاه *Pisum sativum* (نخودفرنگی) نشان می‌دهد. تعداد زیادی از کلروفیل‌های آنتن داخلی و LHC مرکز واکنش را احاطه کرده‌اند تا انتقال انرژی نور جذب شده به کلروفیل‌های ویژه در مرکز واکنش کارامد باشد.

اگرچه کلروفیل‌های آنتن LHC می‌توانند انرژی نورانی جذب شده از یک فوتون را انتقال دهد اما نمی‌تواند الکترونی آزاد کند. همان‌طور که قبلاً مشاهده کردیم، این نقش را دو کلروفیل مرکز واکنش بر عهده دارد. به منظور درک توانایی آزاد سازی الکترون، ما ساختار و عملکرد مرکز واکنش در فتوسیستم‌های باکتریایی و گیاهی را در بخش بعدی مورد بررسی قرار می‌دهیم.

نکات کلیدی بخش ۱۲-۴

مراحل فتوسنتز و رنگیزه‌های جذب‌کننده نور

■ فراورده نهایی فتوسنتز در گیاهان اکسیژن مولکولی و پلیمر قند شش -کربنه (نشاسته و ساکارز) می‌باشد.

■ واکنش‌های جذب‌کننده نور و تولید کننده ATP در فتوسنتز در غشای تیلاکوئیدی موجود در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد. غشاء نفوذپذیر خارجی و غشاء داخلی کلروپلاست مستقیماً در فتوسنتز مشارکت نمی‌کنند (شکل ۱۲-۲۹ را ملاحظه کنید).

■ در فتوسنتز چهار مرحله وجود دارد: (۱)جذب نور، تولید الکترون پرانرژی و تشکیل O_2 از آب؛ (۲) انتقال الکترونی که منجر به احیا $NADP^+$ به NADPH و تولید نیروی محرکه پروتونی؛ (۳) سنتز ATP؛ و (۴) تبدیل CO_2 به کربوهیدرات‌ها (تثبیت کربن)

■ در مرحله ۱ فتوسنتز، انرژی نورانی توسط مولکول یک جفت کلروفیل a ویژه که به پروتئین‌های مرکز واکنش غشای تیلاکوئیدی چسبیده‌اند، جذب می‌گردد. کلروفیل‌های پرانرژی از طریق یک حدواسط یک الکترون به کینون موجود بر روی سمت مقابل غشاء می‌دهد و باعث ایجاد تفکیک بار می‌گردد (شکل ۱۲-۳۳ را ملاحظه کنید). در گیاهان سبز، سپس کلروفیل‌های با بار مثبت الکترون‌ها را از آب برداشته و موجب تشکیل اکسیژن مولکولی (O_2) می‌شوند.

■ در مرحله ۲، الکترونها از طریق حامل‌های الکترونی موجود در غشای تیلاکوئید از کینون احیا به یک پذیرنده نهایی الکترون جابجا می‌شود این پذیرنده نهایی معمولاً $NADP^+$ است و با رسیدن الکترون به NADPH تبدیل می‌گردد. طی انتقال الکترونی پروتون‌ها از استرما به لومن تیلاکوئید حرکت می‌کنند و باعث ایجاد شیب(نیروی محرکه پروتونی) در عرض غشای تیلاکوئیدی می‌گردند.

■ در مرحله ۳، حرکت پروتونی، از طریق کمپلکس‌های F_0F_1 (ATP سنتاز) در جهت شیب الکتروشیمیایی موجب سنتز ATP از ADP و Pi می‌گردد.

■ در مرحله ۴، NADPH و ATP تولیدشده در مرحله ۲ و ۳ انرژی و الکترونهای لازم برای تثبیت CO_2 را که حاصل آن سنتز کربوهیدرات‌ها می‌باشد، فراهم می‌کند. این واکنش‌ها در استرمای تیلاکوئیدی و سیتوزول رخ می‌دهد.

■ به هر مرکز واکنش چندین آنتن درونی و کمپلکس‌های

1 Resonance transfer 2- Bridging

■ به هر مرکز واکنش چندین آنتن درونی و کمپلکس‌های جمع‌کننده نور (LHC) متصل شده است که دارای کلروفیل‌های a، b، کاروتنوئیدها، و سایر رنگدانه‌هایی هستند که نور را در طول موج‌های مختلف جذب می‌کنند. انرژی، نه الکترون، طی انتقال رزونانسی از آنتن درونی و مولکول‌های کلروفیل LHC به کلروفیل‌های مرکز واکنش انتقال می‌یابد (شکل ۳۴-۱۲) را ملاحظه کنید).

۱۲.۵ آنالیز مولکولی فتوسیستم‌ها

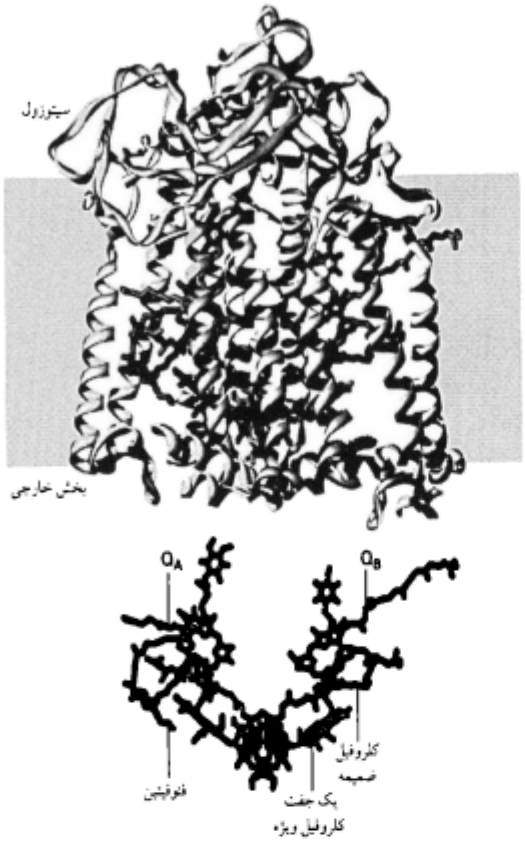
همان‌گونه که در بخش قبل گفته شد، در فتوسنتز باکتری‌های سبز و ارغوانی، اکسیژن تولید نمی‌شود در حالی که در فتوسنتز سیانوباکترها، جلبک‌ها، و گیاهان عالی، اکسیژن تولید می‌شود. این تفاوت ناشی از وجود دو نوع فتوسیستم (PS) در موجودات اخیر می‌باشد: PSI $NADP^+$ را به NADPH احیا می‌کند، و PSII باعث تشکیل O_2 از H_2O می‌شود. باکتری‌های سبز و ارغوانی تنها دارای یک نوع فتوسیستم هستند بنابراین نمی‌توانند O_2 تولید کنند. ما در ابتدا فتوسیستم ساده باکتری‌های ارغوانی را بحث می‌کنیم و سپس ماشین بسیار پیچیده فتوسنتزی را در کلروپلاست مورد توجه قرار می‌دهیم.

تنها فتوسیستم موجود در باکتری‌های ارغوانی نیروی محرکه پروتونی تولید می‌کند ولی O_2 تولید نمی‌کند

ساختار سه‌بعدی مراکز واکنش فتوسنتزی تعیین شده است و به محققان اجازه می‌دهد که جزئیات مسیرهای الکترون‌ها را در هنگام و بعد از جذب نور دنبال کنند. پروتئین‌ها و رنگیزه‌های یکسانی فتوسیستم‌های I و II گیاهان و باکتری‌های فتوسنتزکننده را تشکیل می‌دهند.

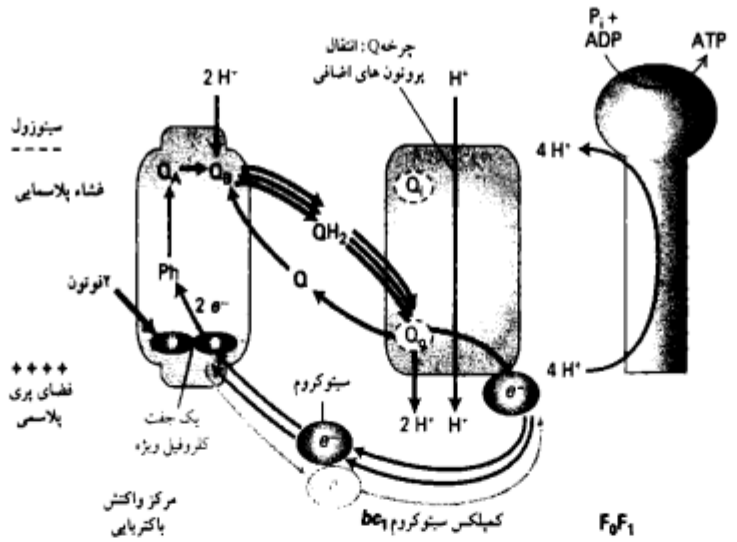
مرکز واکنش باکتری‌های ارغوانی دارای سه زیر واحد پروتئینی (L، M و H) می‌باشد که در غشای پلاسمایی قرار دارد (شکل ۳۵-۱۲). به این پروتئین‌ها گروه‌های پروستتیک متصل شده است که نور را جذب کرده و الکترون‌ها را در هنگام فتوسنتز انتقال می‌دهند. گروه‌های پروستتیک شامل یک «جفت ویژه» مولکول باکتریو کلروفیل a که معادل مولکول‌های کلروفیل a مرکز واکنش گیاهان است، به علاوه چندین رنگیزه دیگر و دو کینون، به نام‌های Q_A و Q_B، که از نظر ساختاری به یوبی‌کینون میتوکندری شباهت دارد، می‌باشد.

تفکیک اولیه بار مکانیسم تفکیک بار در فتوسیستم



▲ **شکل ۳۵-۱۲ (شکل رنگی) ساختار سه‌بعدی مرکز واکنش فتوسنتزی در باکتری ارغوانی ردوباکتر اسفروئیدز.** (بالا) زیر واحد L (زرد) و زیر واحد M (خاکستری) هر کدام پنج α هلیکس تشکیل می‌دهند و روی هم رفته از نظر ساختاری مشابه هستند؛ زیر واحد H (آبی روشن) توسط یک α هلیکس غشایی در غشاء لنگر انداخته است. زیر واحد چهارم (نشان داده نشده است) یک پروتئین محیطی است که به بخش اگزوپلاسمی سایر زیر واحدها متصل می‌شود. (پایین) در هر مرکز واکنش یک جفت ویژه مولکول باکتریوکلروفیل a (سبز) که توانایی آغاز انتقال الکترونی را دارد؛ دو کلروفیل ضمیمه (ارغوانی)؛ دو فئوفیتین (آبی تاریک) و دو کینون، Q_A و Q_B نشان داده شده‌اند. Q_B پذیرنده اولیه الکترون در هنگام فتوسنتز است.

باکتری‌های ارغوانی متفاوت از تفکیک بار در گیاهان، که قبلاً به‌طور خلاصه گفته شد، می‌باشد به این معنی که انرژی حاصل از جذب نور به منظور کندن یک الکترون از مولکول باکتریو کلروفیل a مرکزواکنش و انتقال آن، از طریق چندین رنگیزه مختلف، به پذیرنده اولیه الکترون Q_B مورد استفاده قرار می‌گیرد. پذیرنده اولیه الکترون Q_B به صورت سست به محلی بر روی سطح سیتوزولی غشاء متصل شده است. بنابراین کلروفیل، بار مثبت و Q_B بار منفی کسب می‌کند. به منظور تعیین مسیر طی شده توسط الکترون‌ها در مرکز واکنش باکتریایی، محققان دریافتند که هر رنگیزه‌ای نور را تنها در طول موج مشخصی جذب می‌کند و وقتی که آن یک الکترون اضافی داشته



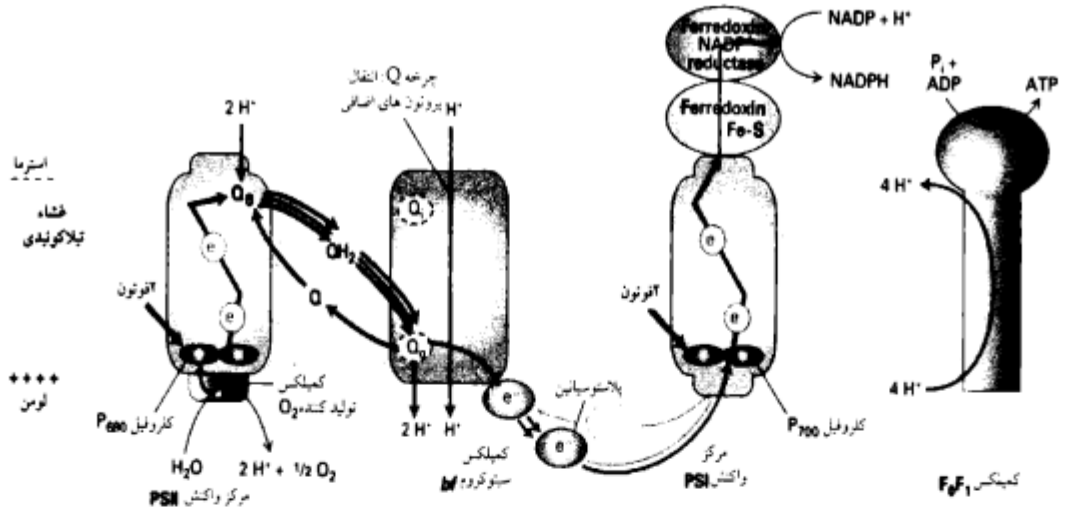
▲ **شکل ۳۶ـ۱۲ جریان چرخه‌ای الکترون در تنها فتوسیستم باکتری‌های ارغوانی.** جریان چرخه‌ای الکترون نیروی محرکه پروتونی تولید می‌کند اما O_2 تولید نمی‌کند. فلش‌های آبی جریان الکترون‌ها را نشان می‌دهد. فلش‌های قرمز حرکت پروتون را نشان می‌دهد. (چپ) انرژی جذب شده از نور یا انرژی حاصله از یک LHC (این‌جا نشان داده نشده) یکی از جفت کلروفیل‌های ویژه را در مرکز واکنش پر انرژی می‌کند. انتقال فوتوالکترونی از کلروفیل پر انرژی، از طریق کلروفیل ضمیمه، فئوفیتین (ph)، و کینون A (Q_A)، به کینون B (Q_B) انتقال می‌یابد و تشکیل سمی کینون Q می‌کند و باعث می‌شود کلروفیل دارای بار مثبت شود. در ادامه جذب فوتون دوم و انتقال دومین الکترون به سمی کینون باعث می‌شود که کینون سریعاً دو پروتون از سیتوزول برداشته و تشکیل QH_2 دهد. (مرکز) بعد از این‌که QH_2 در غشاء انتشار یافت و به مکان Q_o موجود در بخش اگزوپلاسمیک کمپلکس سیتوکروم bc_1 متصل شد، دو الکترون از دست می‌دهد و به‌طور خود به‌خودی دو پروتون به محیط خارجی در فضای پری‌پلاسمیک می‌دهد و ایجاد یک شیب الکتروشیمیایی پروتون (نیروی محرکه پروتونی) می‌کند. الکترون‌ها از طریق یک سیتوکروم، که در فضای پری‌پلاسمایی انتشار می‌یابد، به کلروفیل مرکز واکنش بر می‌گردد. به مسیر چرخه‌ای (آبی) الکترون‌ها توجه گردد. همانند میتوکندری‌ها، فعالیت چرخه Q در کمپلکس bc_1 پروتون‌های مازاد دیگری را به فضای خارج غشایی پمپ می‌کند.

باشند طیف جذبی آن تغییر می‌کند. به دلیل این‌که حرکت الکترونی در کم‌تر از ۱ میلی ثانیه (ms) تمام می‌شود، یک تکنیک ویژه به نام **اسپکتروسکوپی جذبی پیکوثانیه**[1] نیاز می‌باشد تا تغییرات طیف‌های جذبی رنگیزه‌های مختلف را به صورت تابعی از زمان در مدت زمان کوتاهی بعد از جذب فوتون نوری نمایش دهد.

وقتی که محلول آماده در وزیکول‌های غشای باکتری در معرض یک موج قوی از نور لیزر به مدت کم‌تر از ۱ps قرار گرفت هر مرکز واکنش تنها یک فوتون جذب می‌کند (شکل ۳۶ـ۱۲). نور جذب شده توسط مولکول کلروفیل a موجود در هر مرکز واکنش، آنها را به حالت تهییج شده در می‌آورد و فرایندهای انتقال الکترونی متعاقب آن در تمامی مراکز واکنش موجود در نمونه آزمایش همسان می‌شود. در ۴×۱۰^{-۱۲} ثانیه (۴ps) یک الکترون، توسط حد واسط کلروفیل ضمیمه باکتریایی، به مولکول فئوفیتین (ph) جابه‌جا می‌شود، و باعث می‌شود کلروفیل a بار مثبت کسب کند. ۲۰۰ps طول می‌کشد تا الکترون به Q_A برسد و سپس در یک مرحله آهسته‌تر ۲۰۰μs طول می‌کشد تا آن به Q_B برسد. مسیر حرکت الکترونی در سمت چپ شکل ۳۶ـ۱۲ نشان داده شده است.

جریان الکترونی و حرکت پروتونی جفت شده با آن. بعد از این‌که پذیرنده اولیه الکترونی، Q_B، در مرکز واکنش باکتریایی یک الکترون دریافت کرد، Q^-_B تشکیل می‌دهند. سپس آن دومین الکترون را از همان کلروفیل مرکز واکنش، بعد از تهییج مجدد آن (مثلاً با جذب دومین فوتون یا انتقال انرژی از مولکول‌های آنتن) دریافت می‌کند. سپس کینون به پروتون حاصل از سیتوزول متصل شده و کینون احیایی (QH_2) تشکیل می‌دهد که از مرکز واکنش آزاد می‌شود (شکل ۳۶ـ۱۲). QH_2 در غشای باکتریایی به سمت مکان Q_o موجود در بخش اگزوپلاسمیک کمپلکس انتقال الکترونی سیتوکروم bc_1 انتشار می‌یابد. این کمپلکس از نظر ساختاری به کمپلکس III میتوکندریایی شباهت دارد. در آنجا آن دو پروتون خودش را به فضای پری‌پلاسمیک (فضای بین غشای پلاسمایی و

1- Picosecond absorption spectroscopy



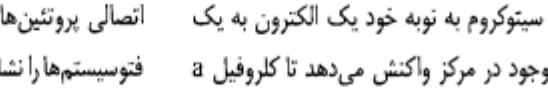
▲ **شکل ۳۷ـ۱۲ (شکل رنگی) جریان خطی الکترون در گیاهان که نیاز به هر دو فتوسیستم PSI و PSII کلروپلاستی دارد.** فلش‌های آبی رنگ جریان الکترون‌ها؛ فلش‌های قرمز حرکت پروتونی را نشان می‌دهد. LHCها نشان داده نشده است. (چپ) در مرکز واکنش PSII تهییج کلروفیل‌های P_{680} توسط نور منجر به احیا پذیرنده اولیه الکترون Q_B به QH_2 می‌شود. در بخش لومینال PSII، الکترون‌های برداشته از H_2O در لومن تیلاکوئیدی به P_{680}^+ منتقل می‌شود و باعث برگشت کلروفیل‌های مرکز واکنش به حالت پایه و تولید O_2 می‌گردد. (مرکز) سپس کمپلکس سیتوکروم *bf* الکترون‌ها را از QH_2 می‌پذیرد و باعث آزاد شدن دو پروتون به لومن می‌شود. فعالیت چرخه Q در کمپلکس سیتوکروم *bf* باعث انتقال بیشتر پروتون به لومن تیلاکوئیدی می‌گردد که آن هم به نوبه خود باعث افزایش نیروی محرکه پروتونی می‌گردد. (راست) در مرکز واکنش PSI، هر الکترونی که از کلروفیل‌های P_{700} تهییج شده آزاد می‌گردد به واسطه یک سری حامل به سطح استرومایی، محلی که فرودوکسین محلول (پروتئین Fe-S) الکترون را به فرودوکسین $NADP^+$ ـ ردوکتاز (FNR) انتقال می‌دهد، حرکت می‌کند. این آنزیم از یک گروه پروستتیکی فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) و یک پروتون استفاده می‌کند و $NADP^+$ را احیا کرده و تولید NADPH می‌کند. P_{700}^+ با افزودن یک الکترون که در PSII به کمک کمپلکس سیتوکروم *bf* و پلاستوسیانین، حامل الکترونی محلول، حمل می‌شود به حالت پایه خودش بر می‌گردد.

دیواره سلولی باکتری) آزاد می‌کند. این فرایند باعث حرکت پروتون‌ها از سیتوزول به خارج از سلول می‌گردد و در عرض غشای پلاسمایی نیروی محرکه پروتونی تولید می‌کند. QH_2 به‌طور خود به‌خودی دو الکترون خود را آزاد می‌کند و این الکترون‌ها از طریق کمپلکس سیتوکروم bc_1، دقیقاً مانند آنچه که در کمپلکس III میتوکندریایی ($CoQH_2$ ـ سیتوکروم C ردوکتاز) در شکل ۲۰ـ۱۲ ترسیم شده است، حرکت می‌کنند. چرخه Q در مرکز واکنش باکتری، مانند چرخه Q میتوکندری‌ها، پروتون‌های دیگری را از سیتوزول به فضای بین غشایی پمپ می‌کند و باعث افزایش نیروی محرکه پروتونی می‌شود.

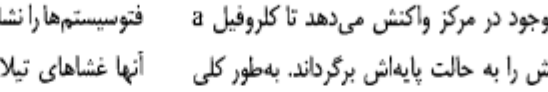
پذیرنده الکترون‌های انتقال داده شده از طریق کمپلکس سیتوکروم bc_1 یک سیتوکروم محلول، حامل الکترونی، موجود در فضای پری‌پلاسمی می‌باشد که از حالت Fe^{3+} به Fe^{2+} احیا می‌شود. سپس سیتوکروم احیا شده (آنالوگ سیتوکروم c در میتوکندری‌ها) به مرکز واکنش، جایی که آن الکترون‌های خودش را به کلروفیل a^+ با بار مثبت می‌دهد و کلروفیل را به حالت پایه بی‌بار و سیتوکروم را به حالت Fe^{3+} بر می‌گرداند، انتشار می‌یابد. این جریان الکترونی **چرخه‌ای** هیچ گونه اکسیژن و کوآنزیم احیا شده‌ای تولید نمی‌کند اما نیروی محرکه پروتونی ایجاد می‌کند.

الکترون‌ها هم‌چنین از طریق تنها فتوسیستم باکتری‌های ارغوانی طی یک مسیر **خطی** (غیرچرخه‌ای) حرکت می‌کنند. در این مورد، به جای الکترون برداشته شده از کلروفیل‌های مرکز واکنش که به سمت کمپلکس سیتوکروم bc_1 حرکت می‌کنند و سپس طی مسیر چرخه‌ای از طریق سیتوکروم محلول در آب به مرکز واکنش بر می‌گردند، الکترون برداشته شده از کلروفیل مرکز واکنش سرانجام به NAD^+ (به جای $NADP^+$ در گیاهان) منتقل می‌شود و NADH تشکیل می‌دهد. در نتیجه هر گاه قرار است انرژی نورانی بیشتری توسط انتقال فوتوالکترونی جمع‌آوری شود بایستی یک الکترون از یک منبع مختلف به یک جفت کلروفیل ویژه برگردند. در باکتری‌هایی که از مسیر خطی استفاده می‌کنند، الکترون‌هایی که این کار را انجام می‌دهند از اکسیداسیون سولفید هیدروژن (H_2S)، که

باعث تشکیل گوگرد می‌شوند و یا از گاز هیدروژن (H_2) ناشی می‌شوند:



$$H_2S \rightarrow S + 2H^+ + 2e^-$$



$$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$$

این الکترون‌ها به منظور احیا یک سیتوکروم مورد استفاده قرار می‌گیرد بطوریکه این سیتوکروم به نوبه خود یک الکترون به یک جفت کلروفیل ویژه موجود در مرکز واکنش می‌دهد تا کلروفیل a اکسید شده مرکز واکنش را به حالت پایه‌اش برگرداند. به‌طور کلی حاصل مسیر خطی، اکسیداسیون H_2S یا (H_2) و احیا NAD_+ به NADH می‌باشد. از آنجایی که H_2O یک دهنده الکترونی نیست O_2 تشکیل نمی‌شود.

هر دو مسیر چرخه‌ای و خطی جریان الکترونی در فتوسیستم باکتریایی باعث به وجود آمدن نیروی محرکه پروتونی می‌شود. همانند سیستم‌های دیگر، این نیروی محرکه پروتونی توسط کمپلکس F_0F_1 موجود در غشای پلاسمایی باکتری به منظور تولید ATP و نیز انتقال مولکول‌ها در جهت خلاف شیب غلظتی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کلروپلاست‌ها دارای دو فتوسیستم هستند که از نظر عملکردی و فضایی متفاوت می‌باشند

در دهه ۱۹۴۰، بیوفیزیکدانی به نام امرسون کشف کرد که سرعت فتوسنتز گیاهی در نوری با طول موج ۷۰۰nm را می‌توان با افزودن نوری با طول موج کوتاه‌تر (انرژی بیشتر) افزایش داد. ایشان دریافتند که با ترکیب نور در طول موج‌های ۶۰۰ و ۷۰۰nm سرعت فتوسنتز بیشتر از مجموع سرعت دو طول موج مجزا می‌باشد. این **اثر امرسون**[1] به محققان اجازه داد تا دریابند که در فتوسنتز میانکنش دو فتوسیستم مجزا به نام‌ها PSI و PSII نقش دارند. PSI در نوری با طول موج ۷۰۰nm یا کم‌تر و PSII تنها در نوری با طول موج کوتاه‌تر (< ۶۸۰nm) عمل می‌کند.

در کلروپلاست‌ها، یک جفت ویژه کلروفیل مرکز واکنش که انتقال فوتوالکترونی را در PSI و PSII شروع می‌کند به دلیل اختلاف در محیط پروتئینی آنها، از نظر حداکثر جذب نوری متفاوت است. به همین دلیل این کلروفیل‌ها اغلب با (PSII) P680 و (PSI) P700 نشان داده می‌شوند. مانند مرکز واکنش باکتریایی، هر مرکز واکنش کلروپلاستی به چند آنتن داخلی و کمپلکس‌های جمع‌کننده نور (LHCs) متصل شده است، LHCهایی که به PSII و PSI متصل شده‌اند دارای پروتئین‌های متفاوتی می‌باشند.

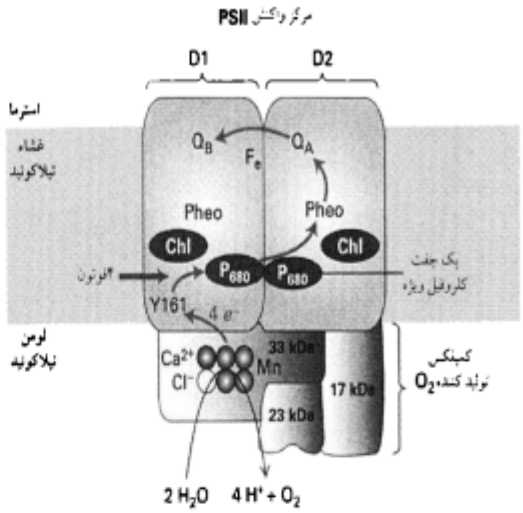
هم‌چنین دو فتوسیستم به‌طور متفاوتی در غشاهای تیلاکوئیدی توزیع شده‌اند: PSII به‌طور عمده در نواحی که غشای تیلاکوئیدها روی هم چیده شده‌اند (گرانا، شکل ۲۹ـ۱۲ را ملاحظه کنید) و PSI در نواحی که غشای تیلاکوئیدها روی هم چیده نشده‌اند توزیع شده‌اند. روی هم قرارگیری غشاهای تیلاکوئیدی ممکن است به دلیل خواص اتصالی پروتئین‌های موجود در PSII باشد. مدارکی که توزیع فتوسیستم‌ها را نشان می‌دهد طی مطالعاتی به دست آمده است که در آنها غشاهای تیلاکوئیدی را توسط اولتراسوند[2] به‌طور ملایم به صورت وزیکول در آوردند. وزیکول‌های تیلاکوئیدی انباشته شده[3] و انباشته نشده سپس توسط سانتریفوژ با شیب چگالی جدا شدند. اجزاء انباشته شده به‌طور عمده دارای PSII بوده و اجزاء انباشته نشده دارای PSI بود.

سرانجام این‌که دو فتوسیستم کلروپلاستی به‌طور قابل ملاحظه‌ای از نظر عملکردشان متفاوت هستند (شکل ۳۷ـ۱۲): تنها PSII آب را به اکسیژن تجزیه می‌کند در حالیکه PSI الکترون‌ها را به پذیرنده نهایی الکترون، $NADP^+$ انتقال می‌دهد. در فتوسنتز کلروپلاستی نیز مانند باکتری‌های سبز و ارغوانی مسیر چرخه‌ای یا خطی وجود دارد. مسیر خطی، که ما ابتدا بحث کردیم، باعث تثبیت کربن و سنتز ATP می‌گردد. در مقابل، مسیر چرخه‌ای تنها سنتز ATP را تأمین می‌کند و هیچ NADPH احیا شده‌ای به منظور مصرف در تثبیت کربنی تولید نمی‌کند. جلبک‌ها و سیانوباکترهای فتوسنتزکننده دارای دو فتوسیستم می‌باشد که آنالوگ فتوسیستم‌های کلروپلاستی می‌باشد.

در جریان خطی الکترون بواسطه دو فتوسیستم گیاهی، PSII و PSI، نیروی محرکه پروتونی، O_2، و NADPH تولید می‌شود

در جریان خطی الکترونی در کلروپلاست‌ها، PSII و PSI به صورت یک مجموعه‌ای پشت سر هم قرار می‌گیرند بطوریکه در آن الکترون‌ها از H_2O به $NADP^+$ منتقل می‌شود فرایند با جذب فوتون توسط PSII آغاز شده و باعث می‌شود الکترونی از کلروفیل a P_{680} به یک پلاستوکینون (Q_B) سطح استرمایی حرکت کند (شکل ۳۷ـ۱۲). $P680^+$ اکسید شده یک الکترون از دهنده نسبتاً بی‌تمایل H_2O برداشت می‌کند، و باعث تشکیل یک حد واسط در هنگام تشکیل O_2 و یک پروتون می‌شود که در لومن تیلاکوئیدی

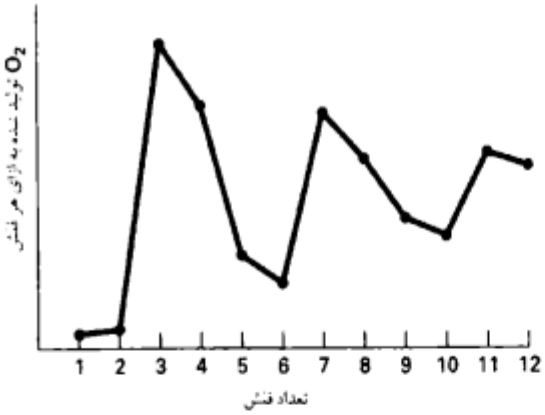
1- Emerson effect
2- Ultrasound
3 - Stacked



▲ **شکل ۱۲ـ۳۸ (شکل رنگی) جریان الکترونی و تولید O۲ در PSII کلروپلاست.** مرکز واکنش PSII، که از دو پروتئین سراسری D^1 و D^2، یک جفت کلروفیل ویژه (P_{680})، و دیگر حاملین الکترونی تشکیل شده است، در سطح لومینال دارای یک کمپلکس تولیدکننده اکسیژن می‌باشد. چهار یون منگنز (Mn، قرمز)، یک یون Ca^{2+} (آبی) و یک یون Cl^- (زرد) به سه پروتئین خارجی (۳۳، ۲۳ و ۱۷ kDs) کمپلکس تولیدکننده اکسیژن متصل شده است. این یون‌های متصل در تجزیه H_2O نقش دارند و محیط را آماده می‌کنند تا سرعت تولید O_2 بیشتر شود. تیروزین ـ ۱۶۱ (Y۱۶۱) پلی‌پپتید D^1، الکترون‌ها را از یون‌های Mn به کلروفیل اکسید شده مرکز واکنش (P_{680}^+) انتقال می‌دهد و آن را به حالت پایه P_{680} احیا می‌کند.

می‌ماند و در نیروی محرکه پروتونی مشارکت می‌کند. بعد از آن که P_{680} دومین الکترون را جذب کرد سمی کینون $Q^{-\bullet}$ دومین الکترون را می‌گیرد و دو پروتون از فضای استرمایی برداشت می‌کند و QH_2 تولید می‌کند. QH_2 در غشاء انتشار می‌یابد و سپس به مکان Q_o کمپلکس سیتوکروم (آنالوگ کمپلکس سیتوکروم bc_1 باکتریایی و کمپلکس III میتوکندریایی) متصل می‌شود. وقتی در این سیستم‌ها چرخه Q کار می‌کند نیروی محرکه پروتونی توسط انتقال الکترونی افزایش می‌یابد. بعد از این‌که کمپلکس سیتوکروم *bf* الکترون‌ها را از QH_2 پذیرفت الکترونها را بصورت تک‌تک به حامل الکترونی محلول پلاستوسیانین، فرم Cu^{2+} آن، (آنالوگ سیتوکروم c باکتریایی) انتقال می‌دهد و باعث احیا آن به فرم Cu^+ می‌شود. سپس پلاستوسیانین احیا شده در لومن تیلاکوئیدی انتشار یافته و الکترون را به PSI حمل می‌کند.

جذب یک فوتون توسط PSI باعث برداشت یک الکترون از



▲ **شکل تجربی ۱۲ـ۳۹ یک PSII واحد فوتونی را جذب می‌کند و یک الکترون را چهار بار انتقال می‌دهد تا یک مولکول O_2 تولید کند.** کلروپلاست‌های سازش یافته به تاریکی تحت مجاورت پالس‌های کوتاه (5μs)، که تمامی PSIها را در محلول آماده شده فعال می‌کنند، قرار گرفتند. پیک‌های تولید O_2 بعد از پالس چهارم مشاهده گردید که نشان می‌دهد به منظور تولید هر مولکول O_2 به جذب چهار فوتون توسط PSII نیاز است. به دلیل این‌که کلروپلاست‌های سازش یافته به تاریکی ابتدا در حالت نسبتاً احیا شده بودند، پیک‌های تولید O_2 بعد از فلش‌های ۳، ۷ و ۱۱ مشاهده گردید.

کلروفیل a مرکز واکنش، P_{700} می‌شود (شکل ۱۲ـ۳۷). P_{700}^+ اکسید شده توسط الکترونی که از مرکز واکنش PSII به واسطه کمپلکس سیتوکروم *bf* و پلاستوکینون عبور می‌کند، احیا می‌شود. این عمل مشابه عمل میتوکندری‌ها است که در آن سیتوکروم c به عنوان تنها شاتل الکترونی از کمپلکس III به کمپلکس IV عمل می‌کرد (شکل ۱۲ـ۱۶ را ملاحظه کنید). الکترونی که در سطح لومینال به وسیله P_{700} پر انرژی جذب شد، در PSI از طریق چندین حامل به سمت سطح استرمایی غشای تیلاکوئیدی، جایی که به فرودوکسین، پروتئین آهن ـ سولفور (Fe-S) می‌رسد، حرکت می‌کند. الکترون‌های تهییج شده در PSI توسط آنزیم فرودوکسین ـ $NADP^+$ ردوکتاز (FNR) می‌تواند از فرودوکسین جابه‌جا شود. این آنزیم به کمک یک گروه پروستتیک FAD، به عنوان حامل الکترونی، و یک پروتون استرمایی باعث احیا $NADP^+$ و تولید مولکول NADPH می‌گردد.

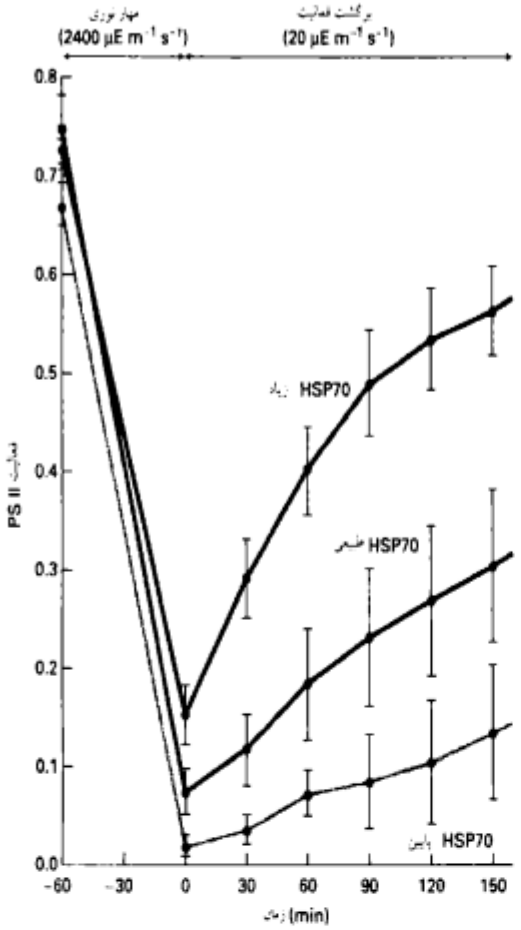
کمپلکس F_0F_1 موجود در غشای تیلاکوئیدی به کمک نیروی محرکه پروتونی ناشی از جریان خطی الکترونی، در بخش استرمایی غشاء باعث سنتز ATP می‌گردد. بنابراین طی این مسیر به کمک انرژی حاصله از فوتون‌های جذب شده توسط هر دو PSI و PSII و آنتن‌های آنها در استرمای کلروپلاست، ATP و NADPH تولید می‌شود و از آنها در تثبیت CO_2 استفاده می‌گردد.

یک کمپلکس تولیدکننده اکسیژن[1] بر روی سطح لومینال مرکز واکنش PSII قرار گرفته است

به‌طور تقریباً شگفت‌آوری، ساختار مرکز واکنش PSII، که الکترون‌ها را از H_2O برداشته تا تولید O_2 کند، به همتای خود در مرکز واکنش باکتری‌های ارغوانی فتوسنتزکننده، که تولید O_2 نمی‌کند، شباهت دارد. مانند مرکز واکنش باکتریایی، مرکز واکنش PSII دارای دو مولکول کلروفیل a (P_{680})، به علاوه دو کلروفیل ضمیمه، دو فئوفیتین، دو کینون (Q_A و Q_B)، و یک اتم آهن غیرهِمی می‌باشد. این مولکول‌های کوچک به دو پروتئین موجود در PSII به نام D_1 و D_2 متصل هستند. این پروتئین‌ها از نظر توالی به‌طور قابل ملاحظه‌ای به زیر واحدهای L و M مرکز واکنش باکتریایی شباهت دارند که نشان می‌دهد آنها دارای منشأ تکاملی مشترک می‌باشد. (شکل ۱۲ـ۳۵ را ملاحظه کنید). وقتی که PSII فوتونی با طول موج <۶۸۰nm جذب کرد شروع به از دست دادن یک الکترون از یک مولکول P_{680} کرده و P_{680}^+ تولید می‌کند. همانند باکتری‌ها ارغوانی فتوسنتزکننده، الکترون سریعاً از طریق کلروفیل ضمیمه به فئوفیتین و سپس به کینون (Q_A) و سپس به پذیرنده اولیه الکترون، Q_B، موجود در سطح خارجی (استرمایی) غشای تیلاکوئیدی منتقل می‌شود (شکل ۱۲ـ۳۷ و ۱۲ـ۳۸).

کلروفیل اکسید شده مرکز واکنش PSII، P_{680}، قوی‌ترین اکسیدکننده زیستی شناخته شده می‌باشد. پتانسیل احیایی P_{680}^+ و یون‌های H^+ بسیار مثبت‌تر از پتانسیل احیایی آب است، و بنابراین می‌تواند آب را اکسید کرده و O_2 و یون‌های H^+ تولید می‌کند. در باکتری‌های فتوسنتزی به دلیل این‌که کروفیل a^+ تهییج شده در مرکز واکنش به حدکافی اکسیدکننده قوی نمی‌باشد، آن‌ها نمی‌توانند آب را اکسید کنند (همان‌طور که قبلاً اشاره شد، باکتری‌های ارغوانی به منظور احیا کلروفیل a^+ در جریان خطی الکترونی از دهنده‌های الکترونی مثل H_2S و H_2 استفاده می‌کنند).

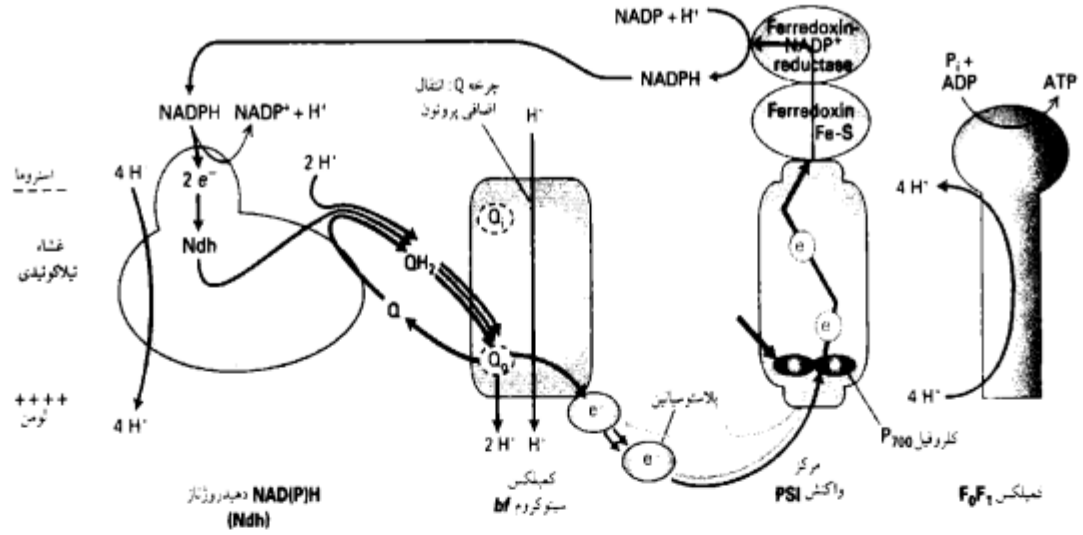
شکست مولکول آب، که الکترون‌های مورد نیاز برای احیا P_{680}^+ در PSII را تأمین می‌کند، توسط یک کمپلکس دارای سه پروتئین، **کمپلکس تولیدکننده اکسیژن** که در سطح لومینال غشاء تیلاکوئیدی قرار دارد، کاتالیز می‌گردد. کمپلکس تولیدکننده اکسیژن دارای چهار یون منگنز (Mn) به علاوه یون‌های Cl^- و Ca^{2+} می‌باشد (شکل ۱۲ـ۳۸). یون‌های منگنز و سه پروتئین خارجی را می‌توان توسط تیمار با محلول‌های نمکی غلیظ از مرکز واکنش برداشت؛ این عمل تشکیل O_2 را مهار می‌کند اما بر روی جذب نور یا مرحله اول انتقال الکترونی تأثیر نمی‌گذارد.



▲ **شکل تجربی ۱۲ـ۴۰ چاپرون HSP70B به PSII کمک می‌کند تا بعد از مجاورت با نور شدید از مهار نوری فرار کند.** جلبک سبز تک سلولی کلامیدوموناس رینارددی به‌طور ژنتیکی تغییر داده شد تا پروتئین چاپرون HSP70B را به میزان غیرطبیعی تولید کند. سویه‌ها که چاپرون طبیعی، بیشتر و کم‌تر دارند به مدت ۶۰ دقیقه تحت مجاورت نور بسیار شدید ($2400 m\mu Em^{-2}s^{-1}$) قرار گرفتند تا مهار نوری القا شود و سپس به مدت ۱۵۰ دقیقه تحت نور ضعیف ($20\mu Em^{-2}s^{-1}$) قرار گرفتند. اثرات مهار نوری حاصله از نور بسیار شدید و توانایی PSII در فرار از مهار نوری با اندازه‌گیری فعالیت PSII با استفاده از اسپکتروسکوپی فلورسانس سنجیده شد. توانایی سلول‌ها در برگرداندن فعالیت PSII بستگی به سطح HSP 70B داشت ـ هر چقدر میزان HSP 70B بیشتر بود برگشت فعالیت سریع‌تر بود ـ زیرا HSP 70B از مراکز واکنش PSII که در آن زیر واحد D1 در اثر $^1O_2$ دچار آسیب شده بود، محافظت می‌کند.

اکسیداسیون دو مولکول H_2O و تشکیل O_2 نیاز به برداشت

1- Oxygen-Evolving complex



▲ **شکل ۱۲ـ۴۱ جریان چرخه‌ای الکترون در گیاهان که نیروی محرکه پروتونی و ATP تولید می‌کند ولی اکسیژن یا NADPH تولید نمی‌کند.** در مسیر وابسته به NAD(P)H ـ دهیدروژناز (Ndh) جریان چرخه‌ای الکترون، از انرژی نورانی جذب شده توسط PSI به منظور انتقال الکترونی در چرخه استفاده می‌شود و بدون اکسید کردن آب، نیروی محرکه پروتونی و ATP تولید می‌گردد. NADPH تولید شده از طریق FNR / فرودوکسین / PSI به جای این‌که در تثبیت کربن مورد استفاده قرار گیرد، توسط Ndh اکسید می‌شود. الکترون‌های آزاد شده در غشاء به پلاستوکینون (Q) منتقل می‌شوند تا QH_2 تولید کند. QH_2 الکترون‌ها را به کمپلکس سیتوکروم *bf*، سپس به پلاستوکینون و سرانجام به PSI منتقل می‌کند که مسیری مشابه مسیر جریان خطی الکترونی می‌باشد (شکل ۱۲ـ۳۷ را ملاحظه کنید).

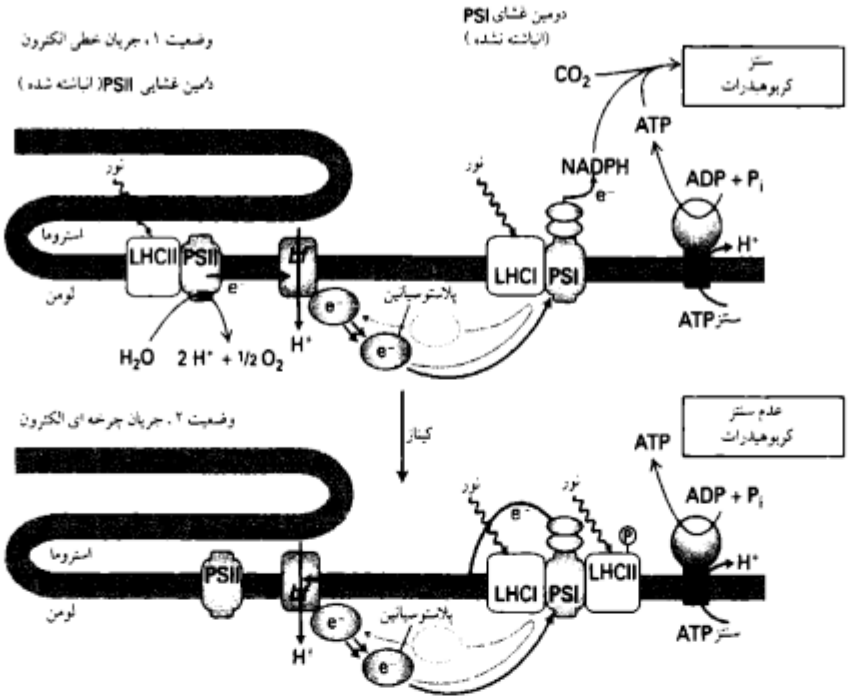
چهار الکترون دارد، اما جذب فوتون توسط PSII تنها منجر به انتقال یک الکترون می‌گردد. یک آزمایش ساده، که در شکل ۱۲ـ۳۹ آورده شده است، مشخص کرد که آیا تشکیل O_2 بستگی به یک PSII واحد دارد یا به چندین فتوسیستم که با یکدیگر همکاری می‌کنند. نتایج حاکی از این بود که یک PSII واحد بایستی یک الکترون از دست دهد و سپس به‌طور منظم چهار بار کمپلکس تولیدکننده اکسیژن را اکسید کند تا یک مولکول O_2 تولید گردد.

مشخص شده است که منگنز در حالت‌های مختلف اکسیداسیونی، از دو بار مثبت تا پنج بار مثبت یافت می‌شود. در واقع مطالعات اسپکتروسکوپی نشان داد که یون‌های منگنز متصل شده به کمپلکس تولیدکننده اکسیژن در پنج حالت مختلف اکسیداسیونی S_0-S_4 یافت می‌شود. در این چرخه S دو مولکول H_2O به چهار پروتون، چهار الکترون، و یک مولکول O_2 تجزیه می‌شود. الکترون‌های آزاد شده از H_2O به‌طور مرتب از طریق یون‌های منگنز و زنجیره جانبی تیروزین زیر واحد D1 به مرکز واکنش P_{680}^+، جایی که آنها باعث تولید مجدد کلروفیل احیا شده، حالت پایه P680، می‌گردند، منتقل می‌شوند. پروتون‌های آزاد شده از تجزیه H_2O در لومن تیلاکوئیدی می‌مانند.

علف‌کش‌هایی که فتوسنتز را مهار می‌کنند نه تنها در کشاورزی مهم هستند بلکه در مطالعه جزئیات مسیر انتقال فوتوالکترونی گیاهان نیز مفید می‌باشد. یکی از رده‌های علف‌کش‌ها، S ـ تری‌آزین‌ها (مثل آترازین)، به‌طور ویژه به زیر واحد D1 مرکز واکنش PSII متصل می‌گردد، و بنابراین از اتصال Q_B به سطح استرمایی غشای تیلاکوئیدی ممانعت می‌کند. وقتی که S ـ تری‌آزین‌ها به کلروپلاستی که در معرض روشنایی است اضافه می‌گردد، باعث می‌شود که تمام حاملین الکترونی پایین‌دست در حالت اکسید شده تجمع یابند و بنابراین هیچ الکترونی نمی‌تواند از PSII آزاد گردد. در جهش یافته‌های مقاوم به آترازین، تغییر یک اسیدآمینه در D1 مانع از اتصال علف‌کش می‌شود، و بنابراین فتوسنتز با سرعت طبیعی انجام می‌شود. چنین علف‌های هرز مقاوم، یکی از مشکلات عمده کشاورزی می‌باشد.

سلول‌ها به منظور محافظت از تخریبات حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در هنگام انتقال فوتوالکترونی از مکانیسم‌های متعددی استفاده می‌کنند

همان‌گونه که قبلاً در مورد تولید ROS توسط میتوکندری دیدیم، تولید ATP توسط زنجیره انتقال الکترون دارای اثرات جانبی احتمالی می‌باشد. این پدیده در مورد کلروپلاست نیز صادق است. اگرچه فتوسیستم‌های PSI و PSII و کمپلکس‌های



▲ **شکل ۴۲-۱۲ فسفریلاسیون LHCII و تنظیم جریان خطی و چرخه‌ای الکترونی.** (بالا) در نور معمولی PSI و PSII به یک اندازه فعال می‌گردند و فتوسیستم‌ها در وضعیت ۱ آرایش می‌یابند. در این نوع آرایش، کمپلکس جمع‌کننده نور II (LHCII) فسفریله نشده است و به طور محکم به مرکز واکنش PSII در گرانا متصل شده است. در نتیجه PSII و PSI می‌توانند به‌طور موازی جریان خطی و چرخه‌ای را داشته باشند. (پایین) زمانی که تهییج نوری دو فتوسیستم متعادل نیست (مثلاً در PSII زیاد باشد)، LHCII فسفریله شده، از PSII جدا می‌شود، و به غشاهای انباشته نشده، جایی که در آنجا به PSI و LHCI چسبیده به آن متصل می‌شود، انتشار می‌یابد. در این نوع سازمان‌یابی فوق مولکولی جایگزین (وضعیت ۲)، بیشتر انرژی نور جذب شده به PSI منتقل شده و باعث حفظ جریان چرخه‌ای الکترونی و تولید ATP می‌گردد. اما تولید NADPH و بنابراین تثبیت CO_2 وجود نخواهد داشت.

جمع‌کننده نور همراه آنها به‌طور قابل ملاحظه‌ای توانایی تبدیل انرژی تابشی را به انرژی شیمیایی به شکل ATP و NADPH دارند، اما آنها عالی عمل نمی‌کنند. بر حسب شدت نور و شرایط فیزیولوژیک سلول، انرژی نسبتاً کم‌تر ـ اما مؤثر ـ که توسط کلروفیل‌های موجود در آنتن‌های جمع‌کننده نور و مراکز واکنش جذب می‌گردد باعث می‌شود کلروفیل به یک حالت فعال شده به نام کلروفیل «**سه گانه**[1]» تبدیل گردد. در این وضعیت، کلروفیل می‌تواند مقداری از انرژی خود را به اکسیژن مولکول داده و آن را از حالت طبیعی خود، حالت پایه نسبتاً غیرفعال، به نام اکسیژن سه‌گانه ($^3O_2$) به حالت بسیار فعال (ROS)، $^1O_2$ تبدیل کند. هر گاه $^1O_2$ توسط «مولکول‌های جاروکننده[2]» ویژه O_2 جمع‌آوی نشود با مولکول‌های نزدیک خودش واکنش داده و آنها را تخریب می‌کند. این تخریب کارایی فعالیت تیلاکوئیدی را مهار می‌کند و **مهار با نور**[3] نامیده می‌شود. کاروتنوئیدها (پلیمری از گروه‌های اشباع نشده ایزوپرنی، مثل بتا کاروتن که رنگ نارنجی هویج به دلیل آن می‌باشد ـ و αـ توکوفرول (شکلی از ویتامین E) مولکول‌های کوچک هیدروفوب هستند که به عنوان خاموش‌کننده[4] عمل می‌کنند و از گیاهان محافظت می‌کنند. برای مثال، مهار سنتز توکوفرول در جلبک سبز تک سلولی **کلامیدوموناس رینباردی** توسط علف‌کش پیرازولینات باعث مهار نوری القا شده توسط نور بسیار شدید می‌شود. به منظور جلوگیری از تخریب احتمالی در آنتن‌های جمع‌کننده نور، مولکول‌های کاروتنوئیدی انرژی را از کلروفیل سه‌گانه خطرناک منحرف می‌کنند و بنابراین مانع از تشکیل $^1O_2$ می‌شوند.

تحت روشنایی شدید، فتوسیستم PSII به‌طور ویژه استعداد تولید $^1O_2$ دارد، در حالی که ROS PSIهای دیگر مثل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را تولید می‌کند. زیر

1- Triplet chlorophyll
2- Scavenger molecules
3- Photoinhibition
4- Quencher

واحد D1 موجود در مرکز واکنش PSII (شکل ۳۸ـ۱۲ را ملاحظه کنید) حتی در شرایط نوری پایین در معرض آسیب‌های ناشی از $^1O_2$ می‌باشد. مرکز واکنش آسیب‌دیده از گرانا به نواحی انباشته نشده تیلاکوئید حرکت می‌کند و در آنجا زیر واحد D1 توسط پروتئازی تجزیه شده و طی فرایندی به نام چرخه تعمیر آسیب پروتئین D1[1]، زیرواحد D1 توسط پروتئین‌ها D1 تازه سنتز شده جایگزین می‌گردد. جایگزینی سریع D1 آسیب‌دیده، که نیاز به سرعت بالای سنتز D1 دارد، به PSII کمک می‌کند تا از مهار نوری فرار کرده و فعالیت خود را حفظ کند. آزمایش شکل ۴۰ـ۱۲ نشان می‌دهد که ترکیب اصلی چرخه تعمیر آسیب، پروتئین چاپرونی HSP70B می‌باشد (فصل ۳ را ملاحظه کنید) که به PSII آسیب‌دیده متصل شده و به آن کمک می‌کند تا در هنگام جایگزینی D1 سایر اجزا آن از بین نرود. میزان مهار نوری می‌تواند به میزان HSP70B موجود در کلروپلاست بستگی داشته باشد.

جریان چرخه‌ای الکترون در PSI تولید نیروی محرکه پروتونی می‌کند اما NADPH یا O_2 تولید نمی‌کند

همان‌گونه که مشاهده کردیم، الکترون‌های حاصله از فرودوکسین احیا شده در PSI در هنگام جریان خطی الکترونی به $NADP^+$ انتقال می‌یابند و باعث تولید NADPH می‌گردند (شکل ۳۷ـ۱۲ را ملاحظه کنید). در برخی موارد سلول‌ها بایستی نسبت متفاوتی از ATP و NADPH در جریان خطی الکترونی تولید کنند (مثلاً ATP بیشتری نسبت به NADPH تولید کنند). برای انجام این کار، آنها از نظر فتوسنتزی بدون تولید NADPH در PSI، ATP تولید می‌کنند. این عمل به کمک یک فرایند مستقل از PSII به نام **فتوفسفریلاسیون چرخه‌ای**[2] محقق می‌گردد. طی این فرایند الکترون‌ها بین PSI، فرودوکسین، پلاستوکینون (Q)، و کمپلکس سیتوکروم *bf* چرخش می‌کنند (شکل ۴۱ـ۱۲)؛ بنابراین NADPH تولید نشده و نیازی به اکسیدکردن آب و تولید O_2 نمی‌باشد. دو مسیر جریان چرخه‌ای الکترونی وجود دارد: مسیر ***وابسته به NAD(P)H دهیدروژناز (Ndh)*** (در شکل ۴۱ـ۱۲ نشان داده شده) و مسیر ***مستقل از Ndh***. Ndh آنزیم کمپلکسی است که بسیار شبیه به کمپلکس I میتوکندریایی می‌باشد (شکل ۱۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). این آنزیم در حالی که NADPH یا NADH را اکسید می‌کند Q را به QH_2 احیا می‌کند و با انتقال پروتون در تولید نیروی محرکه پروتونی نقش دارد. در جریان چرخه‌ای الکترون، سوبسترای Ndh، NADPH تولید شده در اثر جذب نور توسط فتوسیستم PSI، فرودوکسین و فرودوکسین ـ NADP ردوکتاز (FNR) می‌باشد. سپس QH_2 تشکیل شده توسط Ndh از طریق غشای تیلاکوئیدی به سمت محل اتصال Q_o در سطح لومینال کمپلکس سیتوکروم *bf* انتشار می‌یابد. در آنجا، آن دو الکترون به کمپلکس *bf* و دو پروتون به لومن تیلاکوئیدی آزاد می‌کند و نیروی محرکه پروتونی تولید می‌کند. مانند جریان خطی الکترون، این الکترون‌ها از طریق پلاستوسیانین به PSI بر می‌گردند. این جریان چرخه‌ای الکترون به فرایند چرخه‌ای که تنها در فتوسیستم واحد باکتری‌های ارغوانی اتفاق می‌افتد، شباهت دارد (شکل ۳۶ـ۱۲ را ملاحظه کنید). چرخه Q در هنگام جریان چرخه‌ای الکترون در کمپلکس سیتوکروم *bf* برقرار است و به ازای هر جفت الکترون منتقل شده باعث انتقال دو پروتون دیگر به لومن می‌گردد و نیروی محرکه پروتونی را افزایش می‌دهد.

در مسیر چرخه‌ای الکترونی مستقل از Ndh که مکانیسم آن کاملاً مشخص نشده است، الکترون‌های حاصل از فرودوکسین خواه از طریق فرودوکسین متصل به غشاء؛ پلاستوکینون اکسیدوردکتاز (FQR) و خواه از طریق مکان Q_i که جزئی از چرخه Q در کمپلکس سیتوکروم **bf** می‌باشد، در احیا Q استفاده می‌شود.

فعالیت نسبی فتوسیستم‌های I و II تنظیم شده است

برای این‌که PSII، که ترجیحاً در گرانا قرار دارد، و PSI، که ترجیحاً در غشاهای تیلاکوئیدی انباشته نشده قرار گرفته است، در هنگام جریان خطی الکترونی به‌طور متوالی عمل کنند بایستی مقدار انرژی نورانی که به دو مرکز واکنش می‌رسد طوری کنترل شود که هر مرکز واکنش تعداد یکسانی الکترون فعال کند. این شرایط متعادل وضعیت ۱ نامیده می‌شود (شکل ۴۲ـ۱۲). هرگاه دو فتوسیستم به‌طور یکسان تهییج نگردد جریان چرخه‌ای الکترون که در PSI و PSII اتفاق می‌افتد کم‌تر فعال می‌شود (وضعیت ۲). تغییرات طول موجی وشدتی نور خورشید (در اثر طول روز، هوای ابری، و غیره) فعالیت نسبی دو فتوسیستم را تغییر می‌دهد به این معنی که مقادیر نسبی جریان خطی و چرخه‌ای الکترونی مورد نیاز برای تولید نسبت بهینه ATP و NADPH را آشفته می‌سازد.

یکی از مکانیسم‌های تنظیم همکاری نسبی PSI و PSII در پاسخ به تغییرات شرایط نوری و بنابراین میزان نسبی جریان خطی و چرخه‌ای الکترونی متضمن توزیع مجدد کمپلکس جمع‌کننده نور LHCII بین دو فتوسیستم می‌باشد. هر چقدر LHCII بیشتری با

1- D1 Prptein damage - repair cycle

2 - Cyclic photophosphorylation

فتوسیستم خاصی همراه شود، فتوسیستم با کارایی بیشتری توسط نور فعال می‌گردد و همکاری بیشتری در جریان الکترونی خواهد داشت. توزیع LHCII در بین PSI و PSII توسط فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون برگشت‌پذیر آن توسط آنزیم کیناز تنظیمی غشایی و فسفاتاز فعال تنظیم می‌شود. فرم دفسفریله LHCII ترجیحاً به PSII چسبیده است و فرم فسفریله در غشای تیلاکوئیدی از گرانا به ناحیه انباشته نشده انتشار می‌یابد و بیشتر از فرم غیرفسفریله به PSI متصل می‌شود. در شرایط نوری که ترجیحاً PSII نور را جذب می‌کند میزان بالایی از QH_2 تولید شده که به کمپلکس سیتوکروم *bf* متصل می‌شود (شکل ۳۷ـ۱۲ را ملاحظه کنید). تغییرات کنفورماسیون این کمپلکس مسئول فعالسازی LHCII کیناز، افزایش فسفریلاسیون LHCII، افزایش فعالیت PSI نسبت به PSII، و بنابراین افزایش جریان چرخه‌ای الکترونی در وضعیت ۲ می‌باشد (شکل ۴۲ـ۱۲).

بنابراین تنظیم سازمان‌یابی فوق مولکولی[1] فتوسیستم‌ها در گیاهان بر حسب شرایط نوری و احتیاجات متابولیکی گیاه تأثیر مستقیمی در تولید ATP (وضعیت ۲) یا تولید اکی‌والان‌های احیایی (NADPH) و ATP دارد (وضعیت ۱). هم NADPH و هم ATP در تبدیل CO_2 به ساکارز یا نشاسته (مرحله چهارم فتوسنتزکه در بخش آخر این فصل بحث می‌شود) ضروری می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۲

آنالیز مولکولی فتوسنتز

■ در تنها فتوسیستم باکتری‌های ارغوانی، جریان چرخه‌ای الکترون از یک جفت مولکول کلروفیل a ویژه تهییج شده توسط نور موجود در مرکز واکنش باعث تولید نیروی محرکه پروتونی می‌شود. نیروی محرکه پروتونی تولیدشده عموماً توسط کمپلکس F_0F_1 موجود در غشای پلاسمایی در سنتز ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد. (شکل ۳۶-۱۲)

■ گیاهان دارای دو فتوسیستم، PSI و PSII می‌باشند که دارای نقش‌های متفاوتی هستند و در غشای تیلاکوئیدی از نظر فیزیکی از یکدیگر جدا شده‌اند. PSII مولکول آب را به O_2 تجزیه می‌کند و PSI باعث احیا $NADP^+$ به NADPH می‌گردد. سیانوباکترها دو فتوسیستم مشابه دارند.

■ در کلروپلاست‌ها، انرژی نور جذب‌شده توسط کمپلکس‌های جمع‌کننده نور (LHC)ها به مولکول‌های کلروفیل a موجود در هر واکنش (P_{680} در PSII و P_{700} در PSI)منتقل می‌شود.

■ الکترونها توسط حامل‌های مشابه حامل‌های موجود در فتوسیستم باکتریایی در PSII حرکت می‌کنند. برخلاف سیستم باکتریایی، P_{680}^+ اکسید شده در PSII توسط الکترون‌هایی که از تجزیه H_2O بوجود می‌آید مجدداً به P_{680} تبدیل می‌شود (شکل ۳۷-۱۲، چپ)

■ در جریان خطی الکترون P_{700}^+ اکسید شده در PSI توسط الکترون هایی که از طریق کمپلکس سیتوکروم *bf* و پلاستوسیانین محلول جابجا می‌شوند احیا شده و P700 تولید می‌شود. الکترون‌هایی که بدنبال تهییج PSI از P_{700} آزاد می‌شوند از طریق چندین حامل سرانجام به $NADP^+$ رسیده و NADPH تولید می‌کنند (شکل ۳۷-۱۲، راست)

■ جذب نور بوسیله رنگیزه‌های کلروپلاستی ممکن است باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، مثل اکسیژن تنها، $^1O_2$، و پراکسیدهیدروژن، H_2O_2 شود. جارو کننده‌های کوچک ROS و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مولکول‌ها را در برابر تخریبات ناشی از ROS محافظت می‌کنند. با وجود این اکسیژن تنها باعث تخریب زیرواحد PSII D1 می‌گردد و باعث مهار نوری می‌شود. چاپرون HSP70 باعث از بین رفتن اثر آسیب وارده به PSII می‌شود.

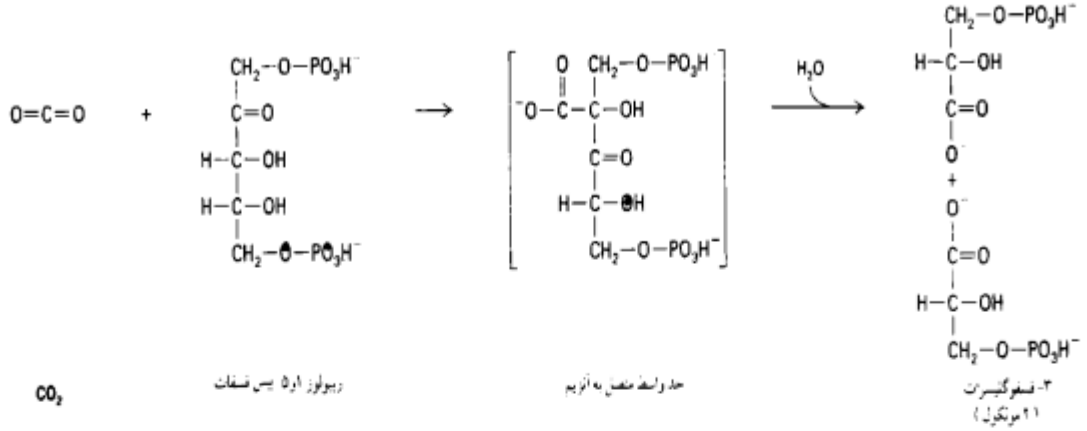
■ برخلاف جریان خطی الکترونی، که به هر دو PSI و PSII نیاز دارد، در جریان چرخه‌ای الکترونی تنها PSI درگیر است. در این مسیر با وجود تولید نیروی محرکه پروتونی هیچ NADPH یا O_2 تشکیل نمی‌شود.

■ فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون برگشت‌پذیر کمپلکس جمع‌کننده نور II سازماندهی دستگاه فتوسنتزی در غشاهای تیلاکوئیدی را کنترل می‌کند. در حالت ۱ جریان خطی الکترون رخ می‌دهد در حالیکه در حالت ۲ جریان الکترون چرخه‌ای است (شکل ۴۲-۱۲)

۱۲.۶ متابولیسم CO_2 در فتوسنتز

کلروپلاست‌ها بسیاری از واکنش‌های متابولیکی را در برگ‌های سبز انجام می‌دهد، علاوه بر تثبیت CO_2 ـ ترکیب CO_2 گازی با مولکول‌های کوچک آلی و تولید قند ـ سنتز تقریباً تمامی اسیدهای آمینه، تمامی اسیدهای چرب و کاروتن‌ها، تمامی پیریمیدین‌ها و احتمالاً تمامی پورین‌ها در کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد.

1 Supramolecular



▲ **شکل ۴۳ـ۱۲ واکنش اول روبیسکو که CO_2 را در ترکیبات آلی تثبیت می‌کند.** در این واکنشی که توسط ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز (روبیسکو) کاتالیز می‌گردد CO_2 با یک قند پنج کربنه، ریبولوز ۱ و ۵ فسفات ترکیب می‌شود. فرآورده نهایی دو مولکول ۳ ـ فسفوگلیسرات می‌باشد.

با وجود این سنتز قند از CO_2، از جمله مسیرهای بیوسنتزی می‌باشد که در سلول‌های گیاهی بیشتر مطالعه شده است. ما ابتدا مسیر بی‌همتایی بنام **چرخه کالوین** (کشف شده توسط ملوین کالوین) که در آن CO_2 با ترکیبات سه کربنه تثبیت می‌شود را بحث می‌کنیم. انرژی پیش‌برنده این چرخه از هیدرولیز ATP و اکسیداسیون NADPH تأمین می‌شود.

روبیسکو CO_2 را در استرمای کلروپلاست تثبیت می‌کند

آنزیم **ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز**، یا روبیسکو، CO_2 را در مولکول‌های پیش‌ساز که بعداً به کربوهیدرات‌ها تبدیل می‌شوند تثبیت می‌کند. جایگاه روبیسکو فضای استرمایی کلروپلاست می‌باشد. این آنزیم CO_2 را با قند ۵ کربنه ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات ترکیب می‌کند و دو مولکول سه کربنه ۳ ـ فسفوگلیسرات تولید می‌کند (شکل ۴۳ـ۱۲). روبیسکو آنزیم بزرگی است(≃۵۰۰kDa) که از هشت زیر واحد بزرگ و هشت زیر واحد کوچک تشکیل شده است. یک زیر واحد آن توسط DNA کلروپلاست و دیگری توسط DNA هسته‌ای کد می‌شود. به دلیل این‌که سرعت کاتالیز روبیسکو بسیار پایین است، نسخه‌های زیادی از آنزیم به منظور تثبیت CO_2 مورد نیاز است. در واقع این آنزیم تقریباً ۵۰٪ پروتئین‌های کلروپلاست را تشکیل می‌دهد و عقیده بر این است که فراوان‌ترین پروتئین موجود در زمین است.

وقتی که جلبک‌های فتوسنتزکننده در معرض پالس کوتاه CO_2 نشاندار با ^{14}C قرار گرفت و سپس سلول‌ها سریعاً شکسته شدند، ۳ ـ فسفوگلیسرات نشاندار شد و رادیواکتیویتی در گروه کربوکسیل مشاهده شد. به دلیل این‌که CO_2 ابتدا در یک ترکیب سه کربنه ظاهر می‌شود، چرخه کالوین به مسیر C_3 تثبیت کربن نیز معروف است (شکل ۴۴ـ۱۲).

سرنوشت ۳ ـ فسفوگلیسرات ساخته شده توسط روبیسکو پیچیده است: مقداری از آن به هگزوز تبدیل می‌شود که در نشاسته یا ساکارز وارد می‌شود اما مقداری از آن در تولید مجدد ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات مصرف می‌شود. حداقل ۹ آنزیم برای تولید ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات از ۳ ـ فسفوگلیسرات نیاز است. به‌طور کمّی، به ازای هر ۱۲ مولکول ۳ ـ فسفوگلیسرات تولید شده توسط روبیسکو (۳۶ اتم کربن)، دو تا از آنها (۶ اتم کربن) به دو مولکول گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات (و سرانجام به یک هگزوز) تبدیل می‌شود، در حالی که ۱۰ مولکول (۳۰ اتم کربن) به ۶ مولکول ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات تبدیل می‌شود (شکل ۴۴ـ۱۲ بالا). تثبیت ۶ مولکول CO_2 و تشکیل دو مولکول گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات به ۱۸ ATP و ۱۲ NADPH، که توسط فرایندهای وابسته به نور فتوسنتز تولید شده‌اند، نیاز دارد.

سنتز ساکارز از CO_2 تثبیت شده، در سیتوزول صورت می‌گیرد

بعد از این‌که گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات در استرمای کلروپلاست تولید شد در معاوضه با فسفات به سیتوزول انتقال می‌یابد. مراحل نهایی سنتز ساکارز (شکل ۴۴ـ۱۲ پایین) در سیتوزول سلول‌های برگ رخ می‌دهد.

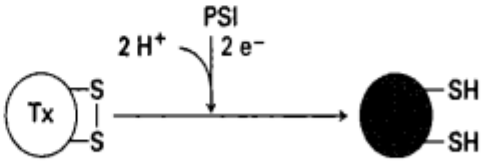
یک پروتئین آنتی‌پورت موجود در غشای کلروپلاست وقتی که سلول ساکارز را به بیرون می‌فرستد، CO_2 تثبیت شده (به صورت گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات) را به داخل سیتوزول می‌آورد. تا زمانی که

فسفاتی وارد کلروپلاست نشود تا جایگزین فسفات مصرف شده به صورت گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات گردد هیچ CO_2 تثبیت شده‌ای کلروپلاست را ترک نمی‌کند. در هنگام سنتز ساکارز از گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات، گروه‌های فسفات آلی آزاد می‌گردد (شکل ۴۴ـ۱۲ پایین، چپ). بنابراین سنتز ساکارز با تأمین فسفات برای آنتی‌پورتر همراه است که به نوبه خود باعث تسهیل انتقال گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات از کلروپلاست به سیتوزول می‌گردد.

نور و آنزیم روبیسکو اکتیواز[1] تثبیت CO_2 را تحریک می‌کنند

آنزیم‌های چرخه کالوین که باعث تثبیت CO_2 می‌شوند در تاریکی سریعاً غیرفعال می‌گردند، بنابراین باعث حفظ ATP تولید شده در تاریکی برای سایر واکنش‌های سنتزی مثل بیوسنتز لیپید و اسیدآمینه می‌شود. یکی از مکانیسم‌های دخیل در این کنترل وابستگی چندین آنزیم چرخه کالوین به pH می‌باشد. به دلیل این‌که پروتون‌ها در هنگام انتقال فوتوالکترونی، از استرما به لومن تیلاکوئیدی منتقل می‌شوند (شکل ۳۷ـ۱۲ را ملاحظه کنید)، pH استرما در روشنایی از pH تقریباً ۷ در تاریکی به تقریباً ۸ افزایش می‌یابد. افزایش pH باعث افزایش فعالیت چند آنزیم چرخه کالوین می‌شود که آن هم به نوبه خود تثبیت CO_2 را در روشنایی افزایش می‌دهد.

یک پروتئین استرمایی به نام **تیوردوکسین** *(Tx)* نیز نقش مهمی در کنترل بعضی از آنزیم‌های چرخه کالوین بازی می‌کند. در تاریکی تیوردوکسین دارای یک پیوند دی سولفیدی است؛ در روشنایی الکترون‌ها از طریق فرودوکسین از PSI به تیوردوکسین منتقل می‌شوند و باعث احیا پیوندهای دی‌سولفیدی می‌شوند:



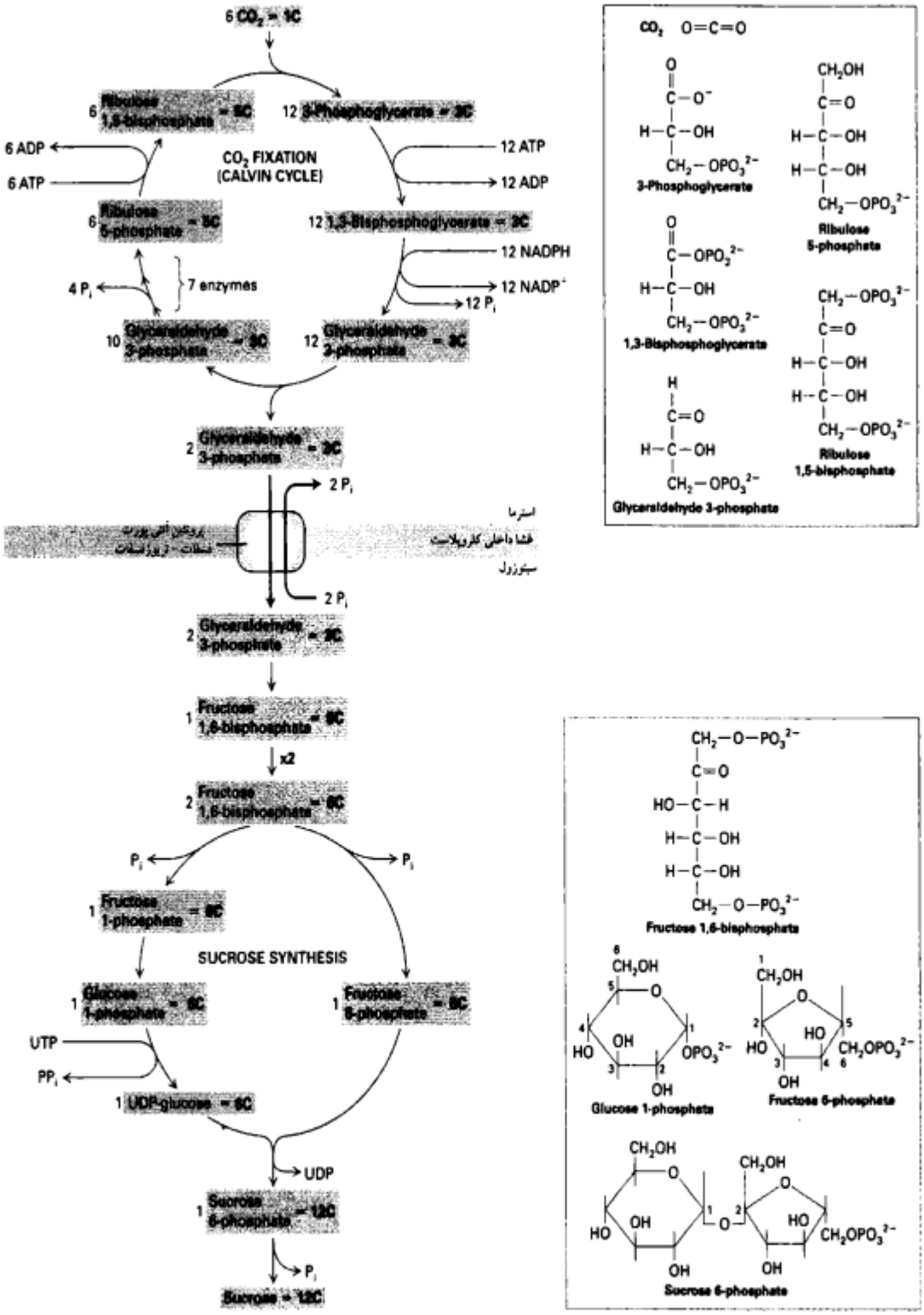
سپس تیوردوکسین احیا شده با احیا پیوندهای دی‌سولفیدی چند آنزیم چرخه کالوین، باعث فعال شدن آنها می‌شود. در تاریکی وقتی که تیوردوکسین اکسید می‌شود، این آنزیم‌ها نیز اکسید می‌شوند و در نتیجه غیرفعال می‌گردد. بنابراین، این آنزیم‌ها به وضعیت احیایی استرما که آن هم به نوبه خود به روشنایی حساس است، حساس می‌باشد. این مکانیسم یک مکانیسم دقیقی در تنظیم فعالیت آنزیمی توسط روشنایی می‌باشد.

روبیسکو اگرچه دارای تنظیم پیچیده و مبهمی می‌باشد و کاملاً تنظیم آن شناخته نشده است اما یکی از آنزیم‌های حساس به روشنایی / احیا می‌باشد. روبیسکو در حضور غلظت بالای CO_2 و Mg^{2+} به‌طور خود به‌خودی فعال می‌گردد. در واکنش فعالسازی، CO_2 به‌طور کوالان به گروه آمین لیزین موجود در جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود و گروه کربامات تشکیل می‌دهد. سپس این گروه به یون Mg^{2+} که برای فعالیت ضروری است متصل می‌شود. با وجود این، تحت شرایط طبیعی، در غلظت‌های محدود CO_2 واکنش آهسته است و به منظور کاتالیز نیاز به **روبیسکو اکتیواز** دارد. این آنزیم به‌طور خود به‌خودی ATP را هیدرولیز می‌کند و از انرژی آن به منظور اتصال CO_2 به لیزین استفاده می‌کند. روبیسکو اکتیواز هم‌چنین تغییر کنفورماسیون را در روبیسکو تسریع می‌کند (تغییر حالت بسته ـ غیرفعال به حالت باز ـ فعال). تنظیم روبیسکو اکتیواز توسط تیوردوکسین، حداقل در بعضی از گونه‌ها، مسئول حساسیت روبیسکو به روشنایی / احیا می‌باشد. مضافاً این‌که فعالیت روبیسکو اکتیواز به نسبت ATP:ADP حساس است. هر گاه این نسبت کم باشد (در ADP زیاد)، اکتیواز روبیسکو را فعال نمی‌کند (و بنابراین سلول مقدار کمتری از میزان ATP پایین خود را صرف تثبیت کربن می‌کند). با توجه به نقش کلیدی روبیسکو در کنترل کسب انرژی و جریان کربن (هر دو نقش را در یک کلروپلاست واحد و به عبارت دیگر در کل بیوسفر دارد) تنظیم دقیق فعالیت آن تعجب آور نخواهد بود.

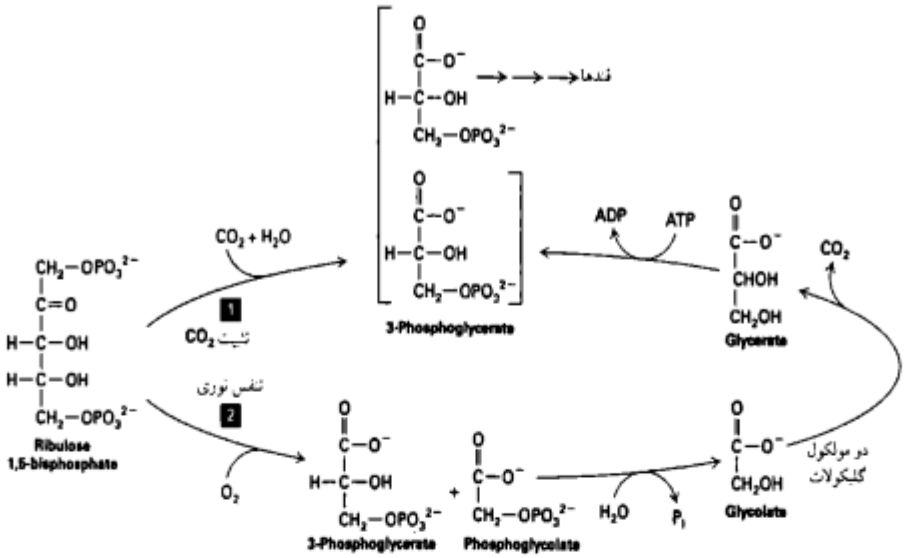
تنفس نوری، که با فتوسنتز رقابت می‌کند، در گیاهانی که CO_2 را از طریق مسیر C_4 تثبیت می‌کنند، کاهش می‌یابد

همان‌طور که در بالا اشاره شد، روبیسکو ترکیب CO_2 با ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات را کاتالیز می‌کند. روبیسکو می‌تواند یک واکنش ثانویه متفاوت و رقابتی را با همان سوبسترا ـ ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات ـ کاتالیز کند اما به جای CO_2 از O_2 به عنوان سوبسترای ثانویه استفاده می‌کند (شکل ۴۵ـ۱۲). فراورده‌های واکنش ثانویه یک مولکول ۳ ـ فسفوگلیسرات و یک مولکول دو کربنه فسفوگلیکولات می‌باشد. واکنش اول (تثبیت کربن) زمانی رخ می‌دهد که غلظت CO_2 نسبتاً بالا است در حالی که واکنش ثانویه در زمانی که غلظت CO_2 پایین و O_2 بیشتر است، رخ می‌دهد. مسیری که توسط واکنش ثانویه

1- Rubisco activase



▲ **شکل ۴۴-۱۲ مسیر کربن در فتوسنتز.** (بالا) شش مولکول CO_2 به دو مولکول گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات تبدیل می‌شود. این واکنش‌ها، که چرخه کالوین را تشکیل می‌دهند، در استرمای کلروپلاست رخ می‌دهد. گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات توسط آنتی‌پورتر فسفات / تریوزفسفات، در معاوضه با یک فسفات به سیتوزول انتقال داده می‌شود. (پایین) گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات در سیتوزول توسط یک سری واکنش‌های انرژی‌زا به فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات تبدیل می‌شود. دو مولکول فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات در سنتز یک دی‌ساکارید ساکارز مصرف می‌شود. مقداری از گلیسرآلدهید ۳ ـ فسفات (در این‌جا نشان داده نشده است) به اسیدهای آمینه و چربی‌ها تبدیل می‌شود که برای رشد گیاه ضروری است.



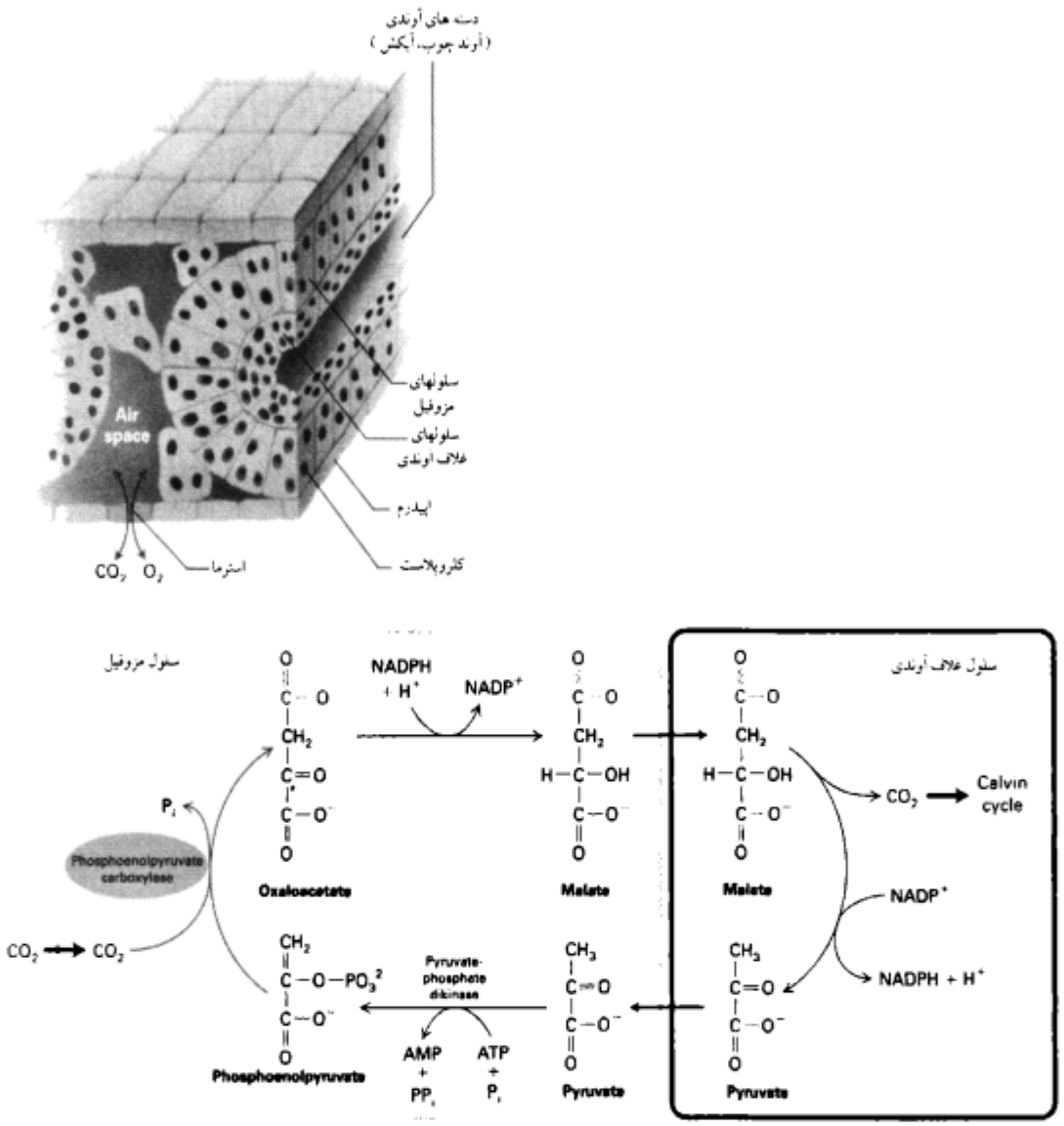
▲ **شکل ۴۵ـ۱۲ تثبیت CO_2 و تنفس نوری.** هر دو این مسیرهای رقابتی توسط ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز (روبیسکو) شروع می‌شوند و در هر دو ریبولوز ۱ و ۶ بیس فسفات استفاده می‌شود. تثبت CO_2، مسیر ❶، به‌کمک CO_2 بالا و فشار پایین O_2 شروع می‌شود. تنفس نوری، مسیر ❷، در CO_2 پایین و فشار بالای O_2 اتفاق می‌افتد (تحت شرایط طبیعی اتمسفری). فسفوگلیکولات توسط یک سری واکنش‌های پیچیده که در پراکسیزوم‌ها، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها اتفاق می‌افتد گردش می‌کند. نتیجه نهایی: به ازای هر دو مولکول فسفوگلیکولات تشکیل شده در اثر تنفس نوری (چهار اتم کربن)، سرانجام یک مولول ۳ ـ فسفوگلیسرات‌تشکیل شده و گردش می‌کند و یک مولکول CO_2 از دست می‌رود.

با O_2 آغاز می‌گردد، **تنفس نوری**[1] نامیده می‌شود. تنفس نوری فرایندی است که در روشنایی رخ می‌دهد، O_2 مصرف می‌کند و ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات را به‌طور جزئی به CO_2 تبدیل می‌کند. همان‌طور که در شکل ۴۵ـ۱۲ نشان داده شده است تنفس نوری برای اقتصاد انرژی گیاه مضر است: زیرا آن ATP و O_2 مصرف می‌کند و بدون تثبیت کربن، CO_2 تولید می‌کند. در واقع، زمانی که غلظت CO_2 پایین و O_2 بیشتر است، مقدار زیادی از CO_2 تثبیت شده توسط چرخه کالوین، به دلیل تنفس نوری از دست می‌رود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این واکنش عجیب و اتلاف‌کننده که توسط روبیسکو کاتالیز می‌گردد ممکن است نتیجه نقص ذاتی آنزیم است که به مولکول CO_2 متصل می‌شود و یا به دلیل توانایی CO_2 و O_2 در واکنش با حد واسطهای آنزیم ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات اولیه یکسان می‌باشد که فرآورده‌های متفاوتی تولید می‌کند.

تنفس نوری در گیاهانی که در محیطهای گرم و خشک زندگی می‌کنند مشکل‌ساز است زیرا آنها بایستی منافذ مبادله‌کننده گاز (روزنه‌ها) برگ‌هایشان را غالباً بسته نگه دارند تا از خروج زیاد رطوبت جلوگیری کنند. در نتیجه سطح CO_2 داخل برگ به کم‌تر از K_m روبیسکو برای CO_2 کاهش می‌یابد. تحت این شرایط سرعت فتوسنتز کند شده و شدیداً تنفس نوری آغاز می‌شود و زندگی گیاه به دلیل تثبیت ناکافی CO_2 به خطر می‌افتد. ذرت، نیشکر، Crabgrass و سایر گیاهانی که در مناطق گرم و خشک رشد می‌کنند یک مسیری دارند که از این مشکل فرار می‌کنند. آنها از یک مسیر دو مرحله‌ی تثبیت CO_2 استفاده می‌کنند که در آن، یک مرحله انباشت CO_2[2] بر چرخهٔ کالوین تقدم می‌یابد. این مسیر به **مسیر C_4** نامگذاری شد زیرا به‌کمک $[^{14}C]Co_2$ نشاندار مشخص شد که در این مسیر اولین مولکول‌های رادیواکتیو ساخته شده در فتوسنتز به جای مولکول‌های سه کربنه‌ای که چرخه کالوین را آغاز می‌کنند (مسیر C_3) ترکیبات چهار کربنه مثل اگزالواستات و مالات می‌باشد.

در مسیر C_4 دو نوع سلول درگیر می‌شود: ***سلول‌های مزوفیل***، که در مجاورت روزنه‌های هوایی داخل برگ می‌باشد، و سلول‌های ***غلاف آوندی***[3] که بافت آوندی را در بر می‌گیرند و از سطح بالای اکسیژن که سلول‌های مزوفیل در مجاورت آن هستند به دور می‌باشد (شکل a ۴۶ـ۱۲). در سلول‌های مزوفیل گیاهان C_4، فسفوانول

1 Photorespiration
2- CO_2 - hoarding step
3- Bundle sheath cells



▲ **شکل ۴۶ـ۱۲ آناتومی برگ گیاهان C_4 و مسیر C_4.** (a) در گیاهان C_4، سلول‌های غلاف آوندی سطح دسته‌های آوندی دارای آوندهای چوب و آبکش را مفروش می‌کنند. سلول‌های مزوفیل، که در مجاورت فضای هوایی است، می‌تواند CO_2 را در غلظت‌های محدود با ترکیبات چهار کربنه ترکیب کند و آن را به سلول‌های غلاف آوندی داخلی توزیع کند. سلول‌های غلاف آوندی دارای کلروپلاست‌های زیادی می‌باشد و مکان فتوسنتز و سنتز ساکارز می‌باشد. ساکارز از طریق آوند آبکشی به بقیه قسمت‌های گیاه حمل می‌شود. در گیاهان C_3، که فاقد سلول‌های غلاف آوندی می‌باشند، چرخه کالوین در سلول‌های مزوفیل عمل تثبیت CO_2 را انجام می‌دهد. (b) آنزیم کلیدی در مسیر C_4 فسفوانول پیروات کربوکسیلاز می‌باشد که باعث جذب CO_2 و تشکیل اگزالواستات و سلول‌های مزوفیل می‌شود. طی دکربوکسیلاسیون مالات یا سایر حد واسطهای C_4 در سلول‌های غلاف آوندی CO_2 آزاد می‌شود، که به چرخه کالوین وارد می‌شود (شکل ۴۴ـ۱۲ بالا را ملاحظه کنید).

پیروات، یک مولکول سه کربنه مشتق شده از پیروات، با CO_2 وارد واکنش می‌شود و یک ترکیب چهار کربنه، اگزالواستات تولید می‌کند (شکل b ۴۶ـ۱۲). آنزیمی که این واکنش را کاتالیز می‌کند، ***فسفوانول پیروات کربوکسیلاز***، نام دارد و تقریباً در تمام گیاهان C_4 یافت می‌شود ولی بر خلاف روبیسکو به O_2 حساس نمی‌باشد. در واکنش پیروات تا اگزالواستات یک مولکول ATP هیدرولیز می‌شود و این واکنش دارای ΔG منفی می‌باشد. بنابراین تثبیت CO_2 حتی در زمانی که غلظت CO_2 پایین است نیز انجام خواهد شد. اگزالواستات تولید شده در سلول‌های مزوفیل به مالات احیا می‌شود سپس مالات توسط یک ناقل ویژه به سلول‌های غلاف آوندی انتقال داده می‌شود و در آنجا CO_2 توسط دکربوکسیلاسیون آزاد شده و وارد چرخه کالوین می‌شود (شکل b ۴۶ـ۱۲).

به دلیل انتقال CO_2 از سلول‌های مزوفیل، غلظت CO_2 در

سلول‌های غلاف آوندی گیاهان C_4 از غلظت نرمال اتمسفری بیشتر خواهد شد. سلول‌های غلاف آوندی هم‌چنین بدلیل نداشتن PSII و این‌که تنها جریان چرخه‌ای الکترونی توسط PSI انجام می‌شود و بنابراین O_2 تولید نمی‌شود غیرمعمول هستند. غلظت بالای CO_2 و غلظت پایین O_2 در سلول‌های غلاف آوندی به تثبیت CO_2 توسط روبیسکو و تولید ۳ـ فسفوگلیسرات کمک می‌کند و مصرف ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات را در تنفس نوری مهار می‌کند.

علی‌رغم این، غلظت بالای O_2 در اتمسفر به تنفس نوری در سلول‌های مزوفیل گیاهان C_3 کمک می‌کند (مسیر ۲ در شکل ۴۵ـ۱۲) و در نتیجه تقریباً ۵۰ درصد از کربن تثبیت شده توسط روبیسکو ممکن است به CO_2 تبدیل شود. گیاهان C_4 در کسب CO_2 موجود به گیاهان C_3 تفوق دارد زیرا آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز C_4 تمایل بیشتری نسبت به روبیسکو چرخه کالوین به CO_2 دارد. با وجود این در فرایند چرخه‌ای C_4 یک ATP مصرف می‌شود (در تولید فسفوانول پیروات از پیروات)؛ بنابراین کارایی کلی تولید قند از NADPH و ATP در گیاهان C_4 نسبت به گیاهان C_3 که تنها در چرخه کالوین تثبیت CO_2 انجام می‌دهند، پایین‌تر است. با وجود این سرعت خالص فتوسنتز در گیاهان C_4 مثل ذرت یا نیشکر دو یا سه برابر سرعت گیاهان C_3 مثل گندم، برنج، یا جو می‌باشد که به دلیل حذف تلفات ناشی از تنفس نوری می‌باشد.

از دو ترکیب کربوهیدراتی تولید شده در فتوسنتز، نشاسته در سلول‌های مزوفیل گیاهان C_3 و سلول‌های غلاف آوندی گیاهان C_4 باقی می‌ماند. در این سلول‌ها، با استفاده از نشاسته، گلیکولیز انجام می‌شود و ATP، NADH و مولکول‌های کوچک تشکیل می‌شود. مولکول‌های کوچک به عنوان واحدهای سازنده در سنتز اسیدهای آمینه، لیپیدها و سایر اجزای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ساکارز بر خلاف نشاسته از سلول‌های فتوسنتزی به خارج حمل می‌شود و به کل قسمت‌های گیاه منتقل می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۲

متابولیسم CO_2 در هنگام فتوسنتز

■ در چرخه کالوین، CO_2 طی یک سری واکنش‌هایی که در استرمای کلروپلاست رخ می‌دهد به مولکول‌های آلی تبدیل شده و تثبیت می‌گردد. واکنش اول توسط روبیسکوکاتالیز می‌شود و ترکیب سه کربنه شکل می‌گیرد. مقداری از گلیسر آلدهید ۳ - فسفات تولیدشده در چرخه به سیتوزول منتقل شده و به ساکارز تبدیل می‌گردد (شکل ۴۴-۱۲ را ملاحظه کنید).

■ فعالسازی وابسته به نور بعضی از آنزیم‌های چرخه کالوین و سایر مکانیسم‌ها باعث افزایش تثبیت CO_2 در نور می‌گردند. حالت احیایی استرما نقش کلیدی در این تنظیم دارد مانند تنظیم فعالیت روبیسکو بوسیله آنزیم روبیسکو اکتیواز.

■ در گیاهان C_3، بخش اعظم CO_2 که توسط چرخه کالوین تثبیت می‌شود در اثر تنفس نوری از دست می‌رود. این فرایند واکنشی است که در سطح پایین CO_2 و بالای O_2 توسط روبیسکو کاتالیز می‌گردد و یک واکنش اتلاف کننده است (شکل ۴۵-۱۲ را ملاحظه کنید).

■ در گیاهان C_4، CO_2 ابتدا با فسفوانول پیروات در سلولهای مزوفیل خارجی واکنش داده و تثبیت می‌گردد. سپس مولکول چهار کربنه حاصله به سلولهای غلاف آوندی درونی، جائیکه که CO_2 آزاد شده و در چرخه کالوین مورد استفاده قرار می‌گیرد، منتقل می‌شود. سرعت تنفس نوری در گیاهان C_4 بسیار پایین‌تر از گیاهان C_3 است.

چشم‌اندازی به آینده

اگرچه فرایندهای کلی فتوسنتزی و اکسیداسیون میتوکندریایی به خوبی کشف شده‌اند، ولی بسیاری از جزئیات مهم هنوز در ابهام باقی مانده است و نیاز به کشف دارد. برای مثال، چگونه کمپلکس I و IV میتوکندری با استفاده از حرکت پروتونی و الکترونی باعث تولید نیروی محرکه پروتونی می‌کند. مشابهاً اگرچه مکانیسم تغییر ناشی از اتصال برای سنتز ATP توسط کمپلکس F_0F_1 امروزه عموماً پذیرفته شده است ولی ما نمی‌دانیم که چگونه تغییرات کنفورماسیون هر زیر واحد β با اتصال چرخه‌ای ADP و P_i، تشکیل ATP و سرانجام آزاد شدن ATP جفت شده است. به علاوه سؤالات زیادی دربارهٔ مکانیسم عمل دقیق پروتئین‌های انتقالی موجود در غشاهای داخلی میتوکندریایی و کلروپلاستی، که نقش مهمی در فسفریلاسیون اکسیداتیو و فتوسنتز بازی می‌کنند، وجود دارد.

ما امروزه می‌دانیم که آزاد شدن سیتوکروم c و سایر پروتئین‌های دیگر از فضای بین غشایی میتوکندری‌ها به داخل سیتوزول نقش اصلی را در شروع آپوپتوزیس بازی می‌کند (فصل ۲۱). پروتئین‌های خاصی از خانواده BcL-2 که پروتئین‌های آپوپتوتیک هستند و پروتئین‌های خاصی از کانال‌های یونی موجود در غشای خارجی میتوکندری در این فرایند نقش دارند. ارتباطات بین متابولیسم انرژی و مکانیسم‌های آپوپتوزی هنوز نیاز به کشف دارد و کاملاً درک نشده است.

تولید ROS سمی در کلروپلاست باعث فعال شدن ژن‌های محافظت‌کننده در هسته می‌گردد. تعیین مکانیسم‌های این مسیرهای انتقال پیام باعث ایجاد نگرش‌های عمیق در علت وجود چنین مسیرهای تنظیمی می‌گردد. هر چقدر که ما مکانیسم دقیق فتوسنتز را، مخصوصاً عملکرد روبیسکو و تنظیم آن را بدانیم، قادر خواهیم بود این نگرش‌ها را در بهبود بازده محصول به کار بگیریم و مواد غذایی فراوان و ارزان برای همگان تأمین کنیم.

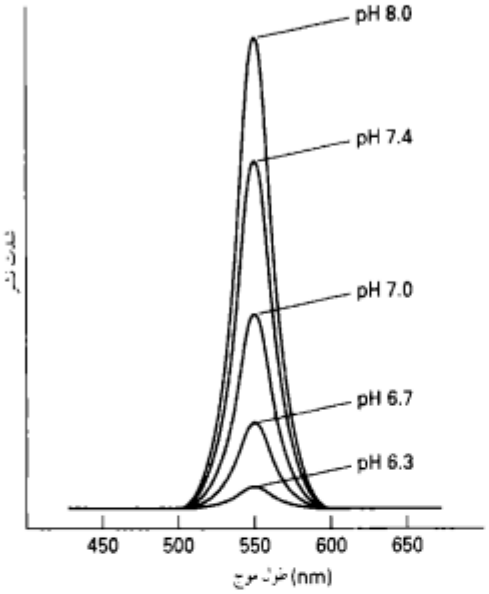
تجزیه و تحلیل داده‌ها

شیب پروتونی را می‌توان با رنگ‌های فلورسنت که شدت نشر آنها با تغییر pH تغییر می‌کند تعیین کرد. یکی از رنگ هایی که در اندازه‌گیری شیب pH عرض غشای میتوکندری عموماً مورد استفاده قرار می‌گیرد فلوروفور ۲′، ۷′ - بیس - (۲ - کربوکسی اتیل) - ۵ (۶) - کربوکسی فلورسین (BCECF) می‌باشد که ترکیب محلول در آب و غیرقابل عبور از غشا می‌باشد. تأثیر pH بر شدت نشر BCECF با طول موج تهییجی ۵۰۵nm در شکل نشان داده شده است. در یک مطالعه از وزیکول‌های حاوی این ترکیب استفادهٔ شد. این وزیکول‌ها از مخلوط کردن غشای داخلی میتوکندری با BCECF بدست می‌آید؛ بعد از اینکه وزیکول‌ها مجدداً توسط غشاء تشکیل شدند، توسط سانتریفیوژ جمع آوری شده و در محیط غیرفلورسنت حل گردید.

a) وقتی که این وزیکول‌ها در بافرفیزیولوژیک حاوی NADH، ADP، P_i و O_2 انکوبه شد شدت فلورسنت BCECF درون آن به تدریج کاهش پیدا کرد. کاهش شدت فلورسنت در این وزیکول‌ها نشاندهنده چیست؟

b) انتظار دارید غلظت ADP، P_i و O_2 در طی انجام آزمایش الف چه تغییری کند؟ چرا؟

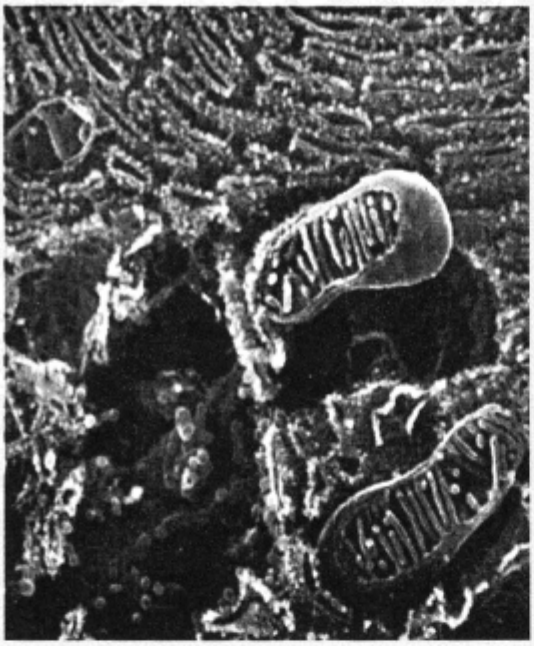
c) بعد از اینکه وزیکول‌ها در بافر حاوی ADP، P_i و O_2 انکوبه شدند بعد از مدتی اضافه کردن دی‌نیتروفنول باعث افزایش فلورسانس BCECF گردید. در مقابل اضافه کردن والینومایسین تغییر اندکی ایجاد کرد. این یافته‌ها را تفسیر کنید.



d) هرگاه آزمایش a با غشاهای داخلی میتوکندری چربی قهوه‌ای انجام شود چه اتفاقی می‌افتاد. پاسخ خود را تفسیر کنید.

فصل ۱۳

حرکت پروتئین‌ها به غشاءها و اندامک‌ها



تصویر الکترونی نگاره یک سلول، دو جز درون سلولی را نشان می‌دهد که پروتئین‌های تازه تولید شده به سمت آنها هدف گرفته شده‌اند. غشاهای شبکه آندوپلاسمی خشن پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشایی را که برای سطح سلول تخصیص داده شده‌اند، دریافت می‌کنند. پروتئین‌های سیتوزولی دخیل در تنفس به طرف اجزا مختلفی از میتوکندری هم چون ماتریکس، غشاء داخلی و فضای بین غشایی ارسال می‌شوند.

رئوس مطالب

۱۳.۱- انتقال پروتئین‌های ترشحی از میان عشای شبکه آندوپلاسمی

۱۳.۲- ورود پروتئین‌ها به غشاء شبکه آندوپلاسمی

۱۳.۳- تغییر تا خوردن و کنترل کیفیت پروتئین در ER

۱۳.۴- ارسال پروتئین‌ها به میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها

۱۳.۵- ارسال پروتئین‌های پراکسیزوم

۱۳.۶- انتقال به داخل و خارج از هسته

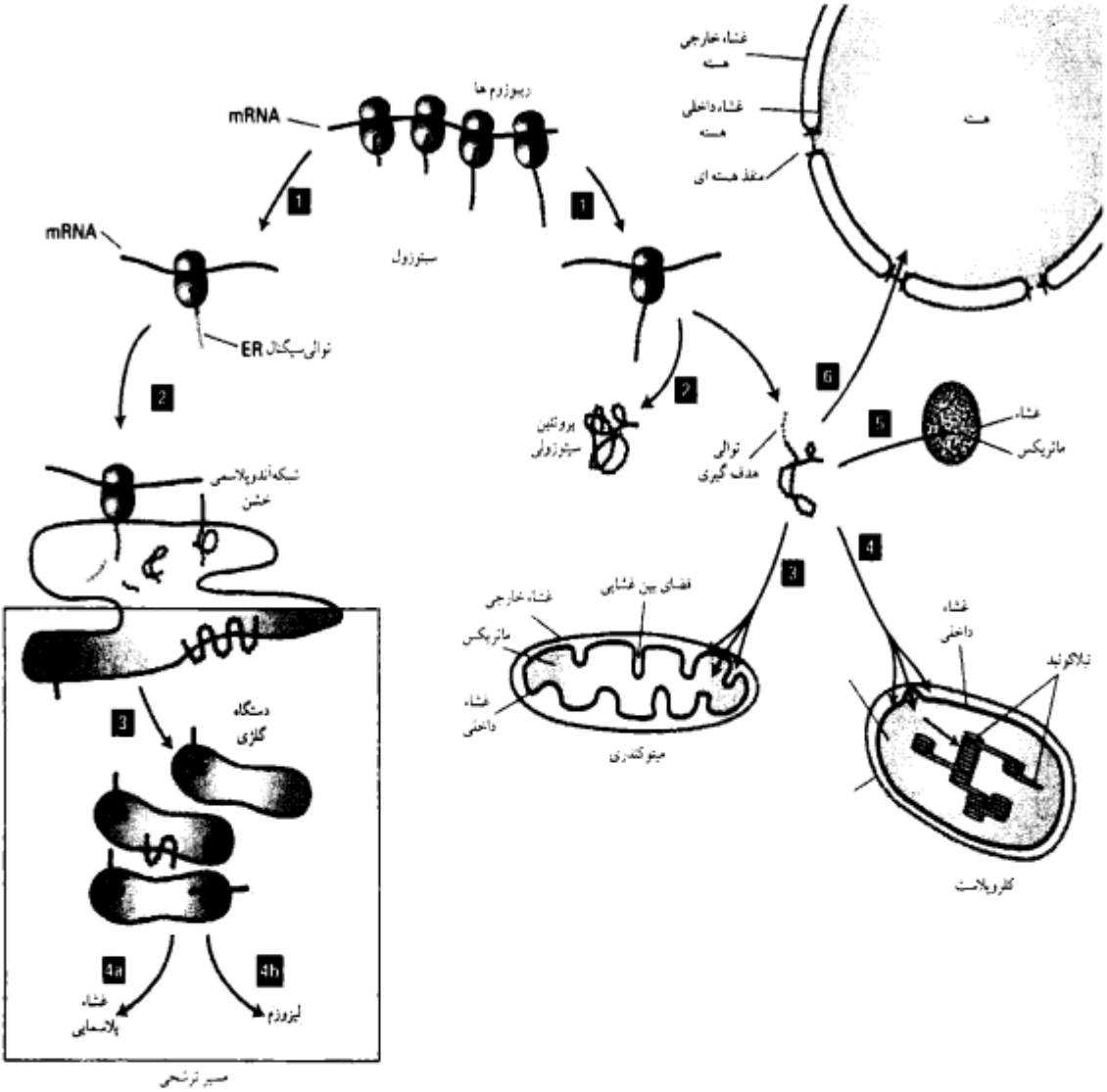
یک سلول پستاندار تا ۱۰/۰۰۰ نوع و یک سلول مخمر تا ۵۰۰۰ نوع پروتئین مختلف دارد. مقدار زیادی از این پروتئین‌ها توسط ریبوزوم‌های سیتوزولی تولید شده و خیلی از آنها در سیتوزول می‌مانند. اما حدود نیمی از انواع پروتئین‌های تولید شده در یک سلول به یک اندامک خاص درون سلول یا به سطح سلول ارسال می‌شوند. برای مثال، خیلی از پروتئین‌های گیرنده هورمون‌ها و پروتئین‌های ناقل باید به غشای پلاسمایی منتقل شوند. برخی از آنزیم‌های محلول در آب مثل DNA و RNA پلیمرازها باید به سمت هسته بروند و اجزای ماتریکس خارج سلول به همراه آنزیم‌های هضم کننده و مولکول‌های پلی‌پپتیدی پیام دهنده (سیگنالی) باید در جهت ترشح از سلول، به سمت سطح هدایت شوند. این‌ها و تمامی پروتئین‌های دیگر تولید شده توسط یک سلول باید در موقعیت مکانی صحیح خود قرار گیرند تا بتوانند عملکرد مناسبی داشته باشند.

تحویل پروتئین‌های تازه سنتز شده به مقاصد مناسب سلولی، معمولاً به **هدف‌یابی پروتئین**[1] یا **انتقال پروتئین**[2] موسوم بوده و روند بسیار متفاوتی هستند. اولین روند شامل هدف‌یابی یک پروتئین به سمت غشاء یک اندامک درون سلولی بوده و می‌تواند در حین فرآیند ترجمه یا بلافاصله پس از تکمیل سنتز پروتئین صورت گیرد. در مورد پروتئین‌های غشایی، هدف‌یابی پروتئین منجر به ورود پروتئین به دو لایه لیپیدی غشاء می‌شود، در حالی که در مورد پروتئین‌های محلول در آب، هدف‌یابی منجر به جابه‌جایی کل پروتئین از بین غشاء به محیط آبی داخل اندامکی می‌شود.

پروتئین‌ها با این فرآیند کلی، به شبکه‌های آندوپلاسمی (ER)، میتوکندری، کلروپلاست‌ها، پراکسیزوم‌ها و هسته هدایت می‌شوند (شکل ۱-۱۳).

دومین روش معمول تقسیم و انتقال پروتئین‌ها به عنوان

1- Protein targeting 2- Protein sorting



▲ **شکل ۱-۱۳ مروری بر مسیرهای اصلی انتقال پروتئین در یوکاریوت‌ها.** تمامی mRNAهای رمزدهی شده در هسته، در ریبوزوم‌های سیتوزول ترجمه می‌شوند. راست (مسیر غیرترشحی): سنتز پروتئین‌ها در غیاب توالی سیگنالی شبکه آندوپلاسمی، در ریبوزوم‌های آزاد تکمیل می‌شود (مرحله ❶). آن پروتئین‌هایی که توالی جهت‌دهنده ندارند در سیتوزول رها شده و در آنجا می‌مانند (مرحله ❷). پروتئین‌هایی با توالی جهت‌دهنده خاص یک اندامک، در ابتدا به داخل سیتوزول رها می‌شوند (مرحله ❷) اما بعد وارد میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها، پروکسی‌زوم‌ها یا هسته می‌شوند (مراحل ❻-❸). پروتئین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی معمولاً از غشاهای خارجی و داخلی عبور می‌کنند تا به ترتیب وارد ماتریکس یا فضای استرومایی شوند. بقیه پروتئین‌ها در مراحل بعدی انتقال در زیر اجزای دیگر این اندامک‌ها تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های هسته‌ای از منافذ قابل مشاهده در پاکت هسته‌ای وارد و خارج می‌شوند، چپ (مسیر ترشحی): ریبوزوم‌های سنتزکنندهٔ پروتئین‌های جدید در مسیر ترشحی توسط یک توالی سیگنالی ER به سمت شبکه آندوپلاسمی خشن هدایت می‌شوند (صورتی؛ مراحل ❶ و ❷). بعداز تکمیل ترجمه در شبکه آندوپلاسمی، این پروتئین‌ها می‌توانند توسط وزیکول‌های انتقال‌دهنده به سمت دستگاه گلژی حرکت کنند (مرحله ❸). انتقالات دیگر پروتئین‌ها را به غشاء پلاسمایی یا به لیزوزوم‌ها تحویل می‌دهد (مراحل ❹a و ❹b). فرآیندهایی که در زیر مجموعه مسیر ترشحی قرار می‌گیرند (مراحل ❹ و ❸) در فصل ۴ مورد بحث قرار گرفته‌اند.

مسیر ترشحی[1] شناخته می‌شود. این روند در شبکه آندوپلاسمی شروع می‌شود؛ بنابراین تمامی پروتئین‌هایی که برای ورود به مسیر ترشحی در نظر گرفته می‌شوند، ابتدا به سمت غشاء شبکه آندوپلاسمی جهت‌گیری می‌کنند. این پروتئین‌ها نه تنها شامل پروتئین‌های محلول و غشایی می‌شوند که در خود شبکه آندوپلاسمی باقی مانده‌اند، بلکه شامل پروتئین‌های ترشح شده از سلول، پروتئین‌هایی موجود در لومن دستگاه گلژی و لیزوزوم‌ها و پروتئین‌های انتگرال در غشاء این اندامک‌ها و غشاء پلاسمایی نیز

1- Secretory pathway

می‌باشند. جهت‌گیری به شبکه اندوپلاسمی عموماً شامل پروتئین‌های در حال سنتز می‌باشند. وقتی این پروتئین‌ها از غشای شبکه آندوپلاسمی جابه‌جا می‌شوند، آنها توسط کاتالیزورهای تادهنده پروتئین موجود در لومن شبکه اندوپلاسمی، به کونفورماسیون طبیعی خود در می‌آیند. این روند به دقت تحت نظارت قرار می‌گیرد و فقط بعد از تکمیل تا خوردگی و ساخت پروتئین‌ها به آنها اجازه داده می‌شود تا از شبکه آندوپلاسمی خارج شده و به دیگر اندامک‌ها منتقل شوند. پروتئین‌ها همچنین بعد از انتقال به شبکه آندوپلاسمی، با روش‌های متفاوتی تغییر می‌یابند. این تغییرات می‌تواند شامل اضافه شدن گروه‌های کربوهیدرات، پایدار شدن ساختار پروتئینی در اثر تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، و برش‌های پروتئولیزی اختصاصی، باشد. پروتئین‌هایی که مقصد نهایی آنها گلژی، لیزوزوم یا سطح سلول است، در طول مسیر ترشحی به وسیله عمل وزیکول‌های کوچک منتقل می‌شوند. این وزیکول‌های کوچک از غشاء یک اندامک جوانه زنده و سپس به غشاء اندامک دیگر جوش می‌خورند (شکل ۱ـ۱۳). ما در مورد انتقال پروتئین‌ها توسط وزیکول‌ها در فصل بعد بحث خواهیم کرد زیرا از نظر مکانیسمی، تفاوت‌های فاحشی با جهت‌گیری پروتئین‌ها به غشاء اندامک‌های درون سلولی دارد.

در این فصل، ما مطالعه می‌کنیم که چگونه پروتئین‌ها به سمت غشاء اندامک‌های درون سلولی جهت‌گیری کرده، در پی آن به غشاء اندامک ملحق شده و یا به سمت درون اندامک حرکت می‌کنند. دو خصوصیت این فرآیند انتقال پروتئین، مبهم و مورد سؤال است: چگونه یک پروتئین تنها به سمت یک غشاء خاص هدایت می‌شود و این که چگونه مولکول‌های نسبتاً بزرگ پروتئین، بدون به هم ریختگی و تخریب غشاء دو لایه، همانند یون‌ها و مولکول‌های کوچک، از بین غشاء جابه‌جا می‌شوند. با استفاده از روش‌های خالص‌سازی بیوشیمیایی ـ به همراه جداسازی ژنتیکی جهش یافته‌هایی که قادر به انجام مراحل خاصی از جابه‌جایی نیستند – زیست‌شناسان سلولی اجزای سلولی زیادی را شناسایی کردند که برای انتقال پروتئین از غشاهای مختلف داخل سلولی لازم است. به علاوه، خیلی از روندهای انتقالی اصلی در سلول با استفاده از اجزای پروتئین خالص وارد شده در لایه‌های لیپیدی مصنوعی، بازسازی شده‌اند. چنین سیستم‌های آزمایشگاهی را می‌توان به راحتی بررسی نمود.

این مطالعات نشان داده علی‌رغم برخی تغییرات، مکانیسم پایه‌ای مشترک برای انتقال پروتئین به اندامک‌های مختلف درون سلولی وجود دارد. به طور مثال، ما هم‌اکنون می‌دانیم، اطلاعات برای ورود پروتئین به یک اندامک خاص در توالی اسیدآمینه‌ای آن پروتئین رمزدهی می‌شود (معمولاً توالی‌های ۵۰ـ۲۰ اسیدآمینه‌ای و عموماً با عنوان **توالی سیگنال**[1] شناخته می‌شود) (شکل ۱ـ۱۳)؛ این توالی‌ها را هم چنین **توالی‌های هدف یابی جذب**[2] یا **پپتیدهای سیگنالی** نیز می‌نامند. هر اندامک مجموعه‌ای از گیرنده‌های پروتئینی دارد، این گیرنده‌ها فقط به نوع خاصی از توالی‌های سیگنال متصل می‌شوند. اطلاعات رمز شده در توالی سیگنالی باعث اختصاصی شدن جهت‌گیری پروتئین می‌شود. وقتی پروتئین دارای توالی سیگنال با گیرنده خود میانکنش می‌دهد، زنجیره پروتئینی به نوعی **کانال انتقال**[3] تغییر شکل داده و به پروتئین اجازه می‌دهد تا از غشای دو لایه عبور کند. انتقال یک‌طرفه پروتئین به یک اندامک، بدون بازگشت دوباره به سیتوزول، معمولاً در اثر جفت شدن انتقال با یک واکنش انرژی‌زا مثل هیدرولیز ATP صورت می‌گیرد. برخی پروتئین‌ها بعداً به اجزای کوچک‌تر در یک اندامک انتقال می‌یابند؛ این انتقال به توالی‌های سیگنال و گیرنده‌های پروتئینی دیگری وابسته است. در نهایت، اغلب وقتی انتقال از غشاء انجام گرفت، توالی‌های سیگنال توسط پروتئازهای ویژه از پروتئین بالغ حذف می‌شوند.

برای هر یک از وقایع جهت‌گیری پروتئینی مورد بحث در این فصل، ما به دنبال جواب چهار سؤال اساسی هستیم:

۱ـ ماهیت **توالی سیگنالی** چیست و چه چیزی آن را از دیگر توالی‌های سیگنالی متمایز می‌کند؟

۲ـ **گیرنده** توالی سیگنال چیست؟

۳ـ ساختار **کانال انتقالی** که به پروتئین امکان عبور از غشاء دو لایه را می‌دهد، چگونه است؟ به ویژه این که آیا این کانال به اندازه‌ای باریک است که فقط پروتئین در حالت باز شده [بدون تاخوردگی] می‌تواند از آن عبور کند، یا کانال می‌تواند با دمین تا خوردهٔ پروتئین نیز همراهی نماید؟

۴ـ منبع انرژی که باعث انتقال یک‌طرفه از غشاء می‌شود، چیست؟

در قسمت اول این فصل، جهت‌گیری پروتئین به شبکه آندوپلاسمی مورد بحث قرار می‌گیرد. این قسمت شامل تغییرات پس از ترجمه‌ای بوده و وقتی پروتئین‌ها وارد مسیر ترشحی می‌شوند روی آنها صورت می‌گیرد. سپس ما در مورد جهت‌گیری پروتئین‌ها به

1- Signal sequence
2- Uptake-targeting sequence
3- Translocation canal

میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و پراکسیزوم‌ها بحث خواهیم کرد. در نهایت، در مورد انتقال پروتئین‌ها به داخل و خارج هسته از طریق منافذ هسته‌ای صحبت خواهیم کرد.

۱ـ۱۳ انتقال پروتئین‌های ترشحی از میان غشای شبکه آندوپلاسمی

همه سلول‌های یوکاریوت برای سنتز و انتقال پروتئین‌های ترشح شده و پروتئین‌هایی که در فضای آبی لومن یا غشاء شبکه آندوپلاسمی، گلژی و لیزوزوم‌ها باقی می‌مانند، از یک مسیر استفاده می‌کنند (شکل ۱ـ۱۳ چپ). برای سهولت بیشتر، ما مجموع این پروتئین‌ها، را **پروتئین‌های ترشحی** می‌نامیم. مکانیسم پایهٔ مسیر ترشحی شامل سه مرحله است: ۱ـ سنتز پروتئین و انتقال از داخل غشاء شبکه آندوپلاسمی ۲ـ تاخوردن و تغییر پروتئین‌ها در داخل لومن شبکه آندوپلاسمی و ۳ـ انتقال پروتئین‌ها به گلژی، لیزوزوم و یا سطح سلول از طریق جوانه‌زنی و جوش خوردن وزیکول‌ها. در دو قسمت اول این فصل چگونگی هدف‌یابی پروتئین‌های ترشحی به شبکه آندوپلاسمی و این که چگونه برخی پروتئین‌ها می‌توانند به غشاء شبکه آندوپلاسمی وارد شوند، مورد بحث قرار می‌گیرد زیرا این فرآیند از نظر مکانیسمی مشابه هدف‌یابی پروتئین‌ها به دیگر اندامک‌های مورد بحث در این فصل می‌باشد. هم چنین در قسمت ۳ـ۱۳ چگونگی تا خوردن و تغییرات پروتئین‌ها در حین ورود به شبکه آندوپلاسمی مورد توجه قرار می‌گیرد. فرآیند انتقال وزیکولی نیز در این قسمت بررسی می‌شود.

علی‌رغم این که همه سلول‌ها پروتئین‌های مختلفی را ترشح می‌کنند (مثلاً پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی)، انواع مشخصی از سلول‌ها برای ترشح مقادیر زیادی از پروتئین‌های خاص، تخصص یافته‌اند. برای مثال، سلول‌های آسینی پانکراس، مقادیر زیادی از چندین آنزیم هضمی را تولید و آنها را از طریق مجاری به روده ترشح می‌کنند. چون این سلول‌ها به مقدار زیادی حاوی اندامک‌های مسیر ترشحی (نظیر شبکه آندوپلاسمی و گلژی) هستند، از آنها در مطالعه این مسیر استفاده‌های زیادی می‌شود.

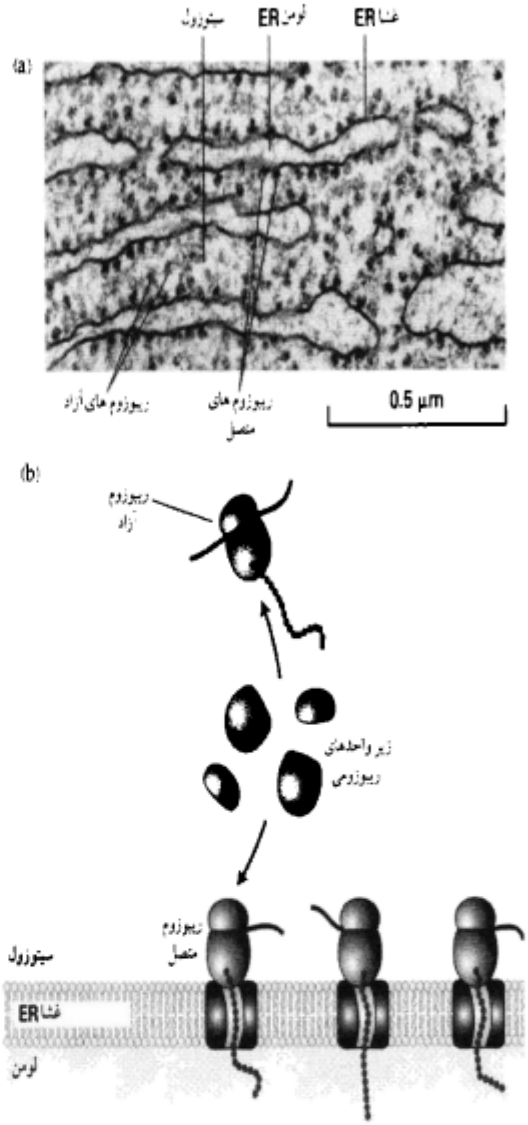
ترتیب وقایعی که بلافاصله پس از سنتز پروتئین‌های ترشحی صورت می‌گیرد، اولین بار با آزمایش‌های نشاندار کردن پالسی بر روی سلول‌های آسینی پانکراس مشخص گردید. در چنین سلول‌هایی، اسیدهای‌آمینه نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو در ساختار پروتئین‌های سنتز شده در ریبوزوم‌های متصل به سطح شبکه آندوپلاسمی، وارد می‌شوند. بخشی از شبکه اندوپلاسمی که پروتئین‌های وروی مسیر ترشحی را دریافت می‌کند، به عنوان شبکه **آندوپلاسمی خشن** شناخته می‌شود. زیرا تراکم زیادی از ریبوزوم‌ها آن را پوشانده و از نظر ظاهری از غشاهای دیگر شبکه آندوپلاسمی متفاوت می‌باشد (شکل ۲ـ۱۳). وقتی سلول‌ها هوموژنیزه می‌شوند، شبکه آندوپلاسمی خشن به وزیکول‌های بسته و کوچکی به نام **میکروزوم‌های خشن**[1] می‌شکنند، که جهت آنها با جهت‌گیری موجود در سلول سالم مشابه است (ریبوزوم‌ها در خارج هستند). آزمایش‌های موجود در شکل ۳ـ۱۳ (که در آنها میکروزوم‌ها از سلول‌های نشاندار شده پالسی تیمار شده با پروتئاز جدا شده‌اند) نشان می‌دهد با این که پروتئین‌های ترشحی در ریبوزوم‌های متصل به سطح سیتوزولی غشاء شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند، اما پلی‌پپتیدهای تولید شده این ریبوزوم‌ها به لومن وزیکول‌های شبکه آندوپلاسمی وارد می‌شوند. آزمایش‌هایی مشابه این، این سؤال را در ذهن ایجاد می‌کند که چگونه پلی‌پپتیدها در مدت کوتاهی پس از شروع سنتز، به عنوان پروتئین‌های ترشحی شناخته شده و چگونه انتهای N یک پروتئین نوظهور ترشحی، از غشاء شبکه آندوپلاسمی عبور می‌کند.

توالی سیگنالی آبگریز در انتهای N، پروتئین نوظهور ترشحی را به سمت شبکه آندوپلاسمی جهت‌دهی می‌کند

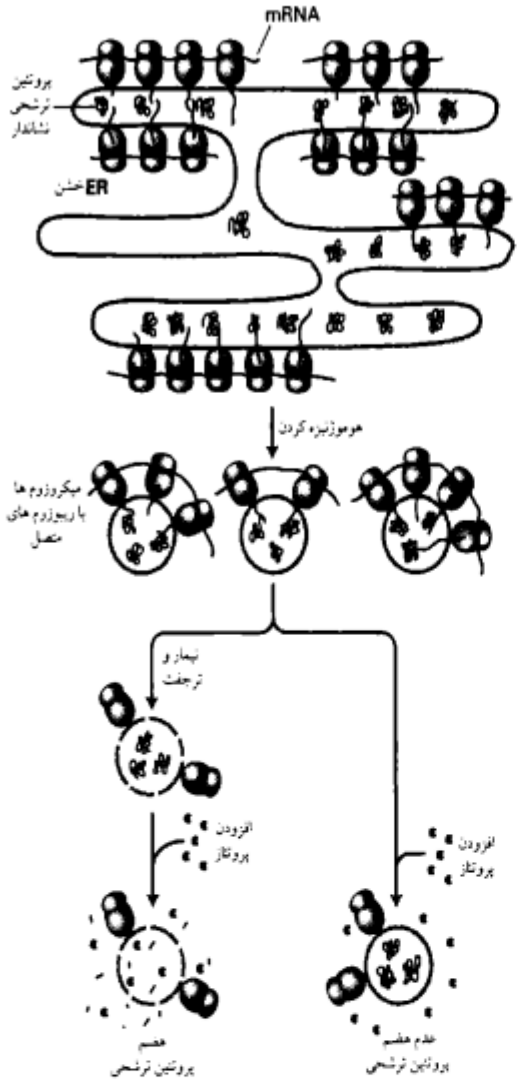
بعد از شروع سنتز پروتئین‌های ترشحی در ریبوزوم‌های آزاد در سیتوزول، یک توالی سیگنالی شبکه آندوپلاسمی ۳۰ـ۱۶ اسید آمینه‌ای در پروتئین تازه سنتز شده، ریبوزوم را به سمت غشاء شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌کند و انتقال پلی‌پپتید در حال سنتز از میان غشاء ER آغاز می‌شود (شکل ۱ـ۱۳، چپ). توالی سیگنالی ER در انتهای N پروتئین واقع شده و اولین بخشی از پروتئین است که سنتز می‌شود. توالی‌های سیگنالی پروتئین‌های ترشحی مختلف همگی دارای چند اسیدآمینه با بار مثبت بوده و درمجاورت یک دنباله ۱۲ـ۶تایی آبگریز (هسته) قرار دارند، اما این توالی‌ها از جهات دیگر، اشتراکات کمی دارند. در اغلب پروتئین‌های ترشحی، توالی سیگنالی هنگامیکه پروتئین در ریبوزوم در حال طویل شدن است، از آن بریده می‌شود؛ بنابراین توالی‌های سیگنال معمولاً در پروتئین‌های «بالغ» در سلول مشاهده نمی‌شوند.

هسته آبگریز توالی‌های سیگنال شبکه آندوپلاسمی برای عملکرد آنها ضروری است. برای مثال، حذف هر کدام از اسیدهای‌آمینه آبگریز از توالی سیگنالی یا وارد کردن اسیدهای‌آمینه

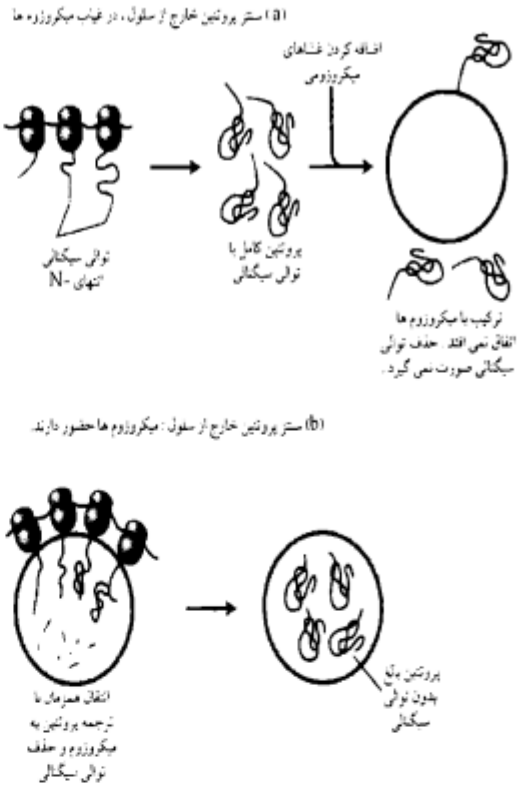
1- Rough microsomes



▲ **شکل ۲-۱۳ ساختار شبکه آندوپلاسمی خشن.** (a) میکروگراف الکترونی از ریبوزوم‌های متصل به شبکه آندوپلاسمی خشن در سلول‌های آسینی پانکراس. بیشتر پروتئین‌های تولید شده توسط این نوع سلول‌ها، به وسیله ریبوزوم‌های متصل به غشاء ترشح و شکل داده می‌شوند. تعداد کمی ریبوزوم متصل‌نشده به غشاء (آزاد) نیز مشاهده می‌شوند؛ احتمالاً این ریبوزوم‌های آزاد، پروتئین‌های سیتوزولی یا دیگر پروتئین‌های غیرترشحی را تولید می‌کنند. (b) تصویر شماتیک سنتز پروتئین در شبکه آندوپلاسمی. توجه کنید ریبوزوم‌های متصل به غشاء و آزاد سیتوزولی یکسان هستند. ریبوزوم‌های متصل به غشاء طی سنتز پروتئین حاوی توالی سیگنال شبکه آندوپلاسمی، به شبکه آندوپلاسمی متصل می‌شوند.



▲ **شکل ۳-۱۳ پروتئین‌های ترشحی وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شوند.** آزمایش‌های نشاندار کردن، مشخص کرد که پروتئین‌های ترشحی در مدت کوتاهی پس از تولید در لومن شبکه آندوپلاسمی قرار می‌گیرند. سلول‌ها برای مدت کوتاهی در مجاورت اسیدهای‌آمینه نشاندار شده رادیو اکتیو قرار می‌گیرند تا پروتئین‌های تازه سنتز شده نشاندار شوند. سپس سلول‌ها هموژنیزه و غشاء پلاسمایی شکافته و شبکه آندوپلاسمی خشن به صورت وزیکول‌های کوچکی به نام میکروزوم خرد می‌شوند. به دلیل وجود ریبوزوم‌های متصل، میکروزوم‌ها چگالی بیشتری نسبت به غشاء دیگر اندامک‌ها داشته و می‌توان آنها را با استفاده از سانتریفوژ شیب چگالی از هم جدا کرد (فصل ۹). میکروزوم‌های تخلیص شده در حضور یا غیاب دترجنت با پروتئاز تیمار می‌شوند. پروتئین‌های ترشحی نشاندار مرتبط با میکروزوم‌ها فقط وقتی توسط پروتئازها هضم می‌شوند که سد نفوذپذیری غشاء میکروزوم در ابتدا توسط تیمار با دترجنت تخریب شده باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد پروتئین‌های تازه ساخته شده در درون میکروزوم‌ها که معادل لومن شبکه آندوپلاسمی خشن می‌باشد، هستند.



▲ شکل تجربی ۴ـ۱۳ انتقال و ترجمه به صورت همزمان صورت می‌گیرد. آزمایشات خارج از سلول ثابت کرد که انتقال پروتئین‌های ترشحی با ترجمه جفت شده است. تیمار میکروزوم‌ها با EDTA، که یون‌های Mg^{2+} را می‌گیرند، باعث رها شدن ریبوزوم‌ها از میکروزوم‌ها شده و به ما اجازه می‌دهد تا میکروزوم‌های بدون ریبوزوم را که همان غشاء شبکه آندوپلاسمی است جدا کنیم (شکل ۳ـ۱۳). سنتز در سیستم خارج از سلول حاوی ریبوزوم‌های فعال، tRNAها، ATP، GTP و آنزیم‌های سیتوزولی که mRNA را رمزگشایی می‌کند، صورت می‌گیرد. پروتئین ترشحی در غیاب میکروزوم‌ها سنتز می‌شود (a). اما فقط زمانی از غشاء وزیکول منتقل شده و توالی سیگنالی خود را از دست می‌دهد که در طول سنتز پروتئین، میکروزوم‌ها نیز حضور داشته‌باشند (b).

باردار به هسته آبگریز بوسیله جهش می‌تواند باعث اختلال در عملکرد انتهای N پروتئین که به عنوان توالی سیگنال است، گردد. در نتیجه، پروتئین تغییر یافته در سیتوزول باقی مانده و قادر نیست از طریق غشاء ER وارد لومن شود. با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیب، محققین به پروتئین‌های سیتوزولی توالی‌های اسیدآمینه‌ای در انتهای N اضافه کردند. اگر توالی اضافه شده به اندازه مناسب طویل و آبگریز باشد، این پروتئین دستکاری شده سیتوزولی به لومن ER منتقل می‌شود. بنابراین دنباله آبگریز در هسته توالی سیگنالی ER محل اتصالی را شکل می‌دهد که برای میانکنش بین توالی‌های سیگنالی با ماشین مسئول هدف‌یابی پروتئین به غشاء شبکه آندوپلاسمی، ضروری است.

مطالعات بیوشیمیایی با استفاده از سنتز پروتئین در خارج از سلول، mRNA رمزدهی‌کننده پروتئین ترشحی، و میکروزوم‌هایی که ریبوزوم‌هایشان کنده شده، عملکرد و سرنوشت توالی‌های سیگنالی ER را روشن می‌سازد. آزمایشات ابتدایی با این سیستم مشخص کرد پروتئین ترشحی به میکروزوم‌ها وارد شده و فقط زمانی توالی سیگنالی خود را از دست می‌دهد که میکروزوم‌ها در طول سنتز پروتئین حضور داشته باشند. اگر میکروزوم‌ها بعد از تکمیل سنتز پروتئین به سیستم اضافه شوند، هیچ انتقال پروتئینی به میکروزوم‌ها صورت نمی‌گیرد (شکل ۴ـ۱۳).

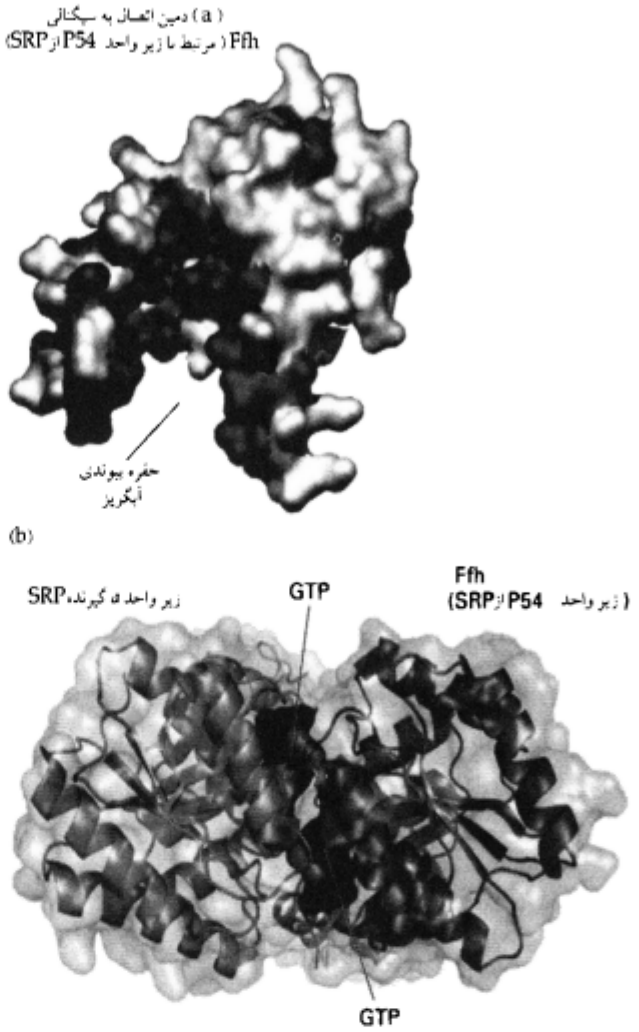
آزمایشات بعدی برای تعیین مرحله دقیق حضور میکروزوم‌ها در حین سنتز پروتئین انجام شد که در آن مرحله میکروزوم‌ها حتماً باید حضور داشته باشند تا انتقال صورت گیرد. در این آزمایشات، میکروزوم‌ها به مخلوط در حال واکنش در زمان‌های مختلف بعد از شروع سنتز پروتئین اضافه شدند، این آزمایشات نشان داد میکروزوم‌ها پیش از اتصال حدود ۷۰ اسیدآمینه اول پروتئین بایستی اضافه شوند تا جای‌گیری پروتئین ترشحی در لومن میکروزوم به‌طور کامل انجام شود. در این نقطه، حدود ۴۰ اسیدآمینه یا بیشتر از ریبوزوم بیرون آمده و شامل توالی سیگنالی می‌باشد که بعداً بریده می‌شود، و حدود ۳۰ اسیدآمینه دیگر در کانال ریبوزوم قرار دارند (شکل ۲۶ـ۴). بنابراین انتقال اغلب پروتئین‌های ترشحی به شبکه آندوپلاسمی وقتی شروع می‌شود که پروتئین جدید در حال سنتز هنوز به ریبوزوم متصل است، به این فرآیند **انتقال همزمان با ترجمه**[1] گفته می‌شود.

انتقال همزمان با ترجمه توسط دو پروتئین هیدرولیزکننده ـ GTP آغاز می‌شود

چون پروتئین‌های ترشحی با مشارکت غشاء شبکه آندوپلاسمی (نه در هیچ غشاء سلولی دیگر) سنتز می‌شوند و یک مکانیسم تشخیص توالی سیگنالی بایستی پروتئین‌های ترشحی را به غشاء شبکه آندوپلاسمی هدایت نماید. دو جزو اصلی این هدف‌یابی **ذره تشخیص ـ سیگنال (SRP)**[2] و گیرنده آن هستند که در غشاء شبکه آندوپلاسمی قرار دارند. SRP یک ذره ریبونوکلئوپروتئین

1- Cotranslational translocation

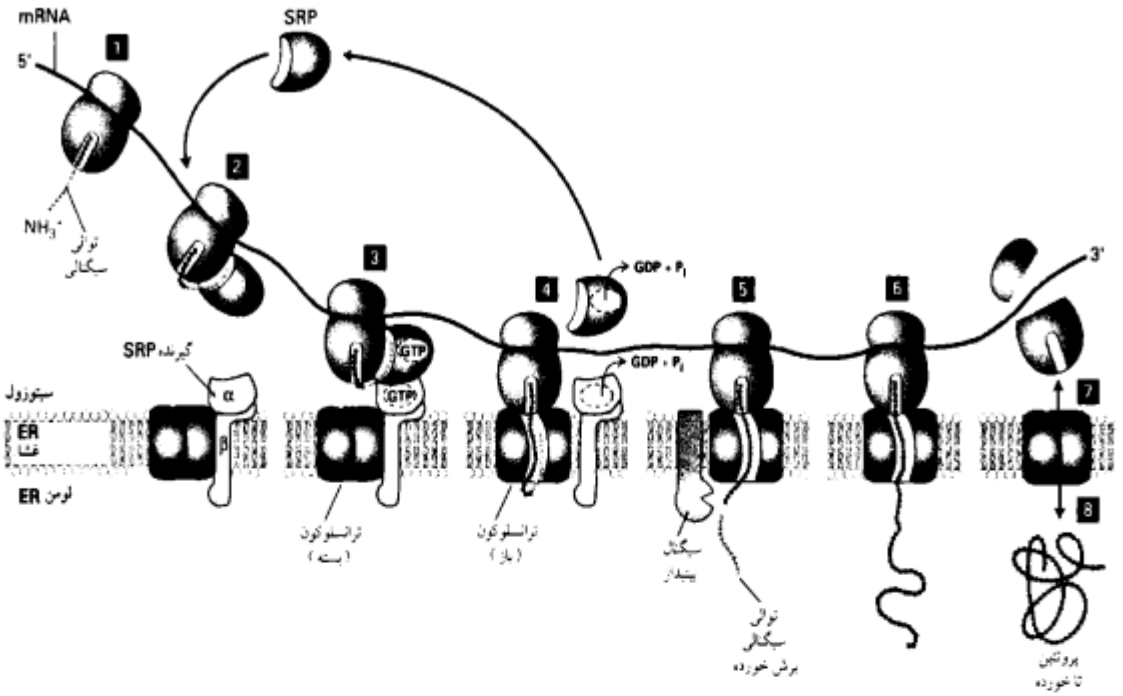
2- Signal-Reeognition Particle



شکل ۱۳.۵ ساختار ذره تشخیص سیگنال (SRP). (a) پروتئین Ffh باکتریایی هومولوگ پروتئین P54 است که به توالی‌های سیگنال ER متصل می‌شود. مدل سطح، دُمین اتصالی در Ffh را نشان می‌دهد. این دُمین دارای شکاف بزرگی می‌باشد که در آن اسیدهای‌آمینه آبگریز قرار می‌گیرند. زنجیره جانبی این اسیدهای‌آمینه با توالی‌های سیگنال میانکنش می‌دهد. (b) ساختار GTP متصل شده به پروتئین‌های FtsY (همولوگ باکتریایی زیر واحد α گیرنده SRP) و Ffh نشان می‌دهد، چگونه میانکنش بین این پروتئین‌ها با اتصال و هیدرولیز GTP کنترل می‌شود. Ffh و FtsY هر دو می‌توانند به یک مولکول GTP متصل شده و هر گاه Ffh و FtsY به همدیگر اتصال یابند دو مولکول GTP متصل شده در بین دو زیر واحد قرار گرفته و دیمر را پایدار می‌کنند. ایجاد دیمر نیمه متقارن باعث تشکیل دو جایگاه فعال برای هیدرولیز دو مولکول GTP متصل شده، می‌گردد. هیدرولیز GTP به GDP میانه دیمر را ناپایدار نموده و باعث می‌شود زیر واحدهای دیمر از هم جدا شوند.

سیتوزولی است و به صورت موقت به توالی سیگنالی ER در پروتئین جدید و زیر واحد بزرگ ریبوزومی متصل شده و کمپلکس بزرگی را تشکیل می‌دهد؛ سپس SRP با اتصال به گیرنده SRP در غشاء ER کمپلکس پروتئین - ریبوزوم را به سمت غشاء شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌کند. SRP از شش پلی‌پپتید جداگانه ساخته شده که به یک RNAی ۳۰۰ نوکلئوتیدی متصل می‌شوند، RNA به عنوان داربست برای این شش زیرواحد عمل می‌کند. یکی از پروتئین‌های SRP (P54) از طریق شیمیایی می‌تواند با توالی سیگنالی ER اتصال برقرار کند. این امر نشان می‌دهد این پروتئین خاص در زیر واحدی است که به توالی سیگنالی در پروتئین جدید متصل می‌شود. ناحیه‌ای از P54 شامل دنباله‌ای از اسیدهای‌آمینه آبگریز بوده و با پروتئین باکتریایی به نام Ffh همولوگ است که عملکردی مشابه با P54 در انتقال پروتئین از غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های باکتری دارد. ساختار Ffh دارای یک شکاف بوده و سطح داخلی این شکاف با زنجیره جانبی اسیدهای‌آمینه آبگریز به هم متصل شده است (شکل a ۱۳.۵). عقیده بر این است که ناحیه آبگریز P54 نیز دارای شکاف مشابهی بوده و با سیگنال‌های انتهای N آبگریز از پروتئین ترشحی میانکنش داده و به‌طور انتخابی آنها را به سمت غشاء شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌کند. بقیه پلی‌پپتیدها در SRP با ریبوزوم میانکنش داده و یا برای انتقال پروتئین به لومن ER مورد نیاز می‌باشند. SRP، کمپلکس زنجیره پلی‌پپتیدی تازه سنتز شده - ریبوزوم را با اتصال به گیرنده SRP به غشاء ER می‌آورد. پروتئین گیرنده در غشاء ER از دو زیر واحد ساخته شده است: یک زیر واحد آلفا (α) و یک زیر واحد کوچک‌تر بتا (β). میانکنش کمپلکس SRP / زنجیره تازه سنتز شده / ریبوزوم با گیرنده SRP وقتی قدرت می‌گیرد که زیر واحد P54 از SRP و زیر واحد آلفا (α) از گیرنده SRP به GTP متصل شوند.

ساختار مشابه به زیر واحد P54 از SRP (Ffh) و زیر واحد α گیرنده SRP (FtsY) از آرکئو باکتری *Thermus aquatiqus*، نظریاتی را در مورد این‌که چگونه چرخه اتصال و هیدرولیز GTP می‌تواند اتصال و جداسازی این پروتئین‌ها را پیش برد، ارائه داد. شکل b ۱۳.۵ نشان می‌دهد که Ffh و FtsY هر کدام به یک



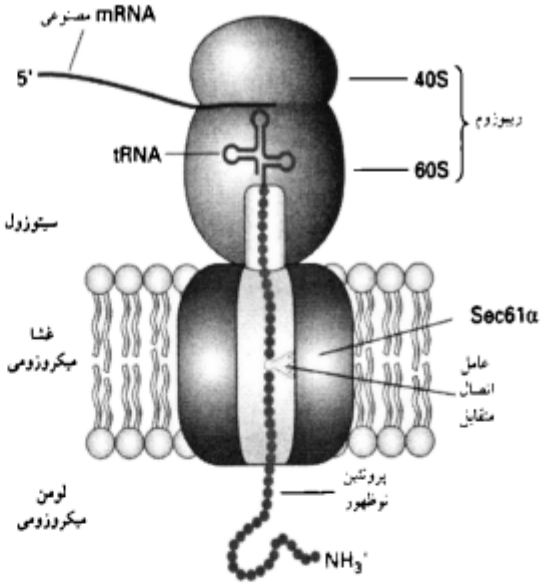
▲ **شکل ۶ـ۱۳ انتقال همزمان با ترجمه.** مراحل ❷ و ❶: هنگامی که توالی سیگنال ER از ریبوزوم بیرون می‌زند، به ذره تشخیص سیگنال (SRP) متصل می‌شود. مرحله ❸: SRP، کمپلکس ریبوزوم / پلی‌پپتید جدید را به گیرنده SRP در غشاء ER تحویل می‌دهد. این میانکنش با پیوند GTP به SRP و گیرنده آن محکم می‌شود. مرحله ❹: انتقال ریبوزوم / پلی‌پپتید جدید به ترانسلوکون باعث باز شدن این کانال انتقالی و ورود توالی سیگنالی و قطعه پلی‌پپتیدی مجاور و در حال سنتز به حفره مرکزی می‌شود. هم SRP و هم گیرنده SRP هنگامی که از ترانسلوکون جدا شدند و GTP متصل را هیدرولیز کردند، سپس آماده شروع برای وارد کردن زنجیره پلی‌پپتیدی دیگری می‌شوند. مرحله : درحالی که زنجیره پلی‌پپتید طویل می‌شود، از بین کانال ترانسلوکون به سمت لومن شبکه آندوپلاسمی عبور می‌کند، در آنجا توالی سیگنالی توسط سیگنال پپتیداز بریده و به سرعت تجزیه می‌گردد. مرحله ❻: به موازات ترجمه mRNA به سمت انتهای ۳، زنجیره پپتیدی طویل می‌شود. چون ریبوزوم به ترانسلوکون متصل است، زنجیره در حال سنتز از طریق ترانسلوکون به سمت لومن ER می‌رود. مراحل ❼ و ❽: وقتی ترجمه کامل شد، ریبوزوم رها شده، و پروتئین به داخل لومن شبکه آندوپلاسمی کشیده می‌شود، ترانسلوکون بسته شده و پروتئین کنفورماسیون طبیعی به خود می‌گیرد.

مولکول ساده GTP متصل شده و یک هترودیمر متقارن کاذب[1] را تشکیل می‌دهند. هر کدام از زیر واحدها به تنهایی دارای یک جایگاه فعال برای هیدرولیز GTP هستند، اما وقتی دو پروتئین کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، دو جایگاه فعال کامل را تشکیل می‌دهند که قادر است هر دو مولکول GTP متصل شده را هیدرولیز نماید.

شکل ۶ـ۱۳ خلاصه‌ای از دانسته‌های ما در مورد سنتز پروتئین‌های ترشحی و نقش SRP و گیرنده آن در این فرآیند، است. هیدرولیز GTP اتصال یافته در جدا شدن SRP و گیرنده SRP نقش داشته و به طریقی که هنوز شناخته شده نیست، انتقال زنجیره تازه سنتز شده و ریبوزوم را به محلی که در آنجا جابجایی پروتئین به داخل ER می‌تواند انجام شود، آغاز می‌کند. بعد از جدا شدن SRP و گیرنده‌اش از همدیگر، هر کدام GDP متصل را رها می‌کنند. SRP به سیتوزول برگشته و هر دو (SPR و گیرنده‌اش) آماده آغاز دور دیگری از میانکنش بین ریبوزوم‌های سنتزکننده پروتئین‌های جدید ترشحی و غشاء شبکه آندوپلاسمی می‌شوند.

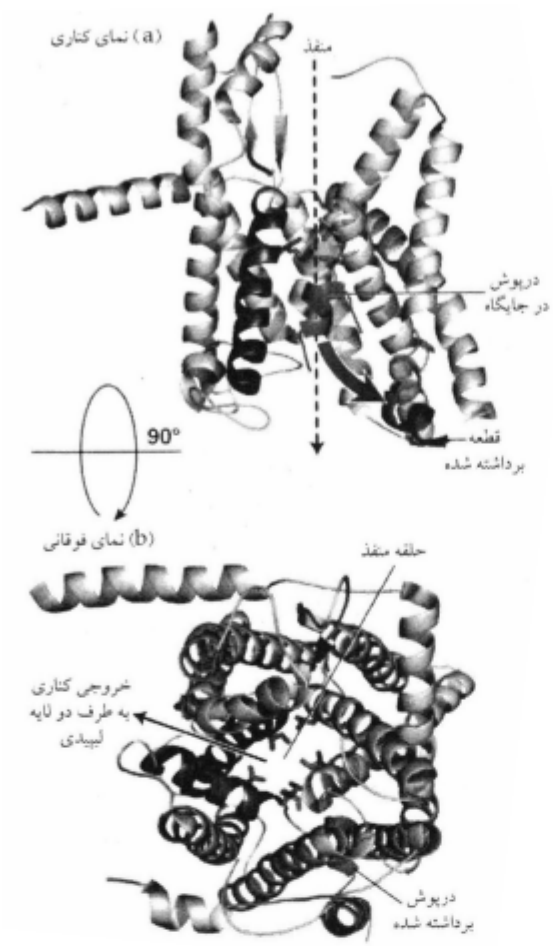
در سیستم ترجمه خارج سلولی که قبلاً شرح داده شد، در غیاب میکروزوم‌ها، حضور SRP باعث آهسته طویل شدن پروتئین ترشحی شده و در نهایت از سنتز پروتئین کامل جلوگیری می‌شود (شکل ۴ـ۱۳). این یافته‌ها بیان می‌کند، میانکنش SRP با زنجیره تازه سنتز شده پروتئین ترشحی و با ریبوزوم‌های آزاد مانع از طویل‌تر شدن زنجیره تازه سنتز شده می‌گردد. تنها بعد از این که کمپلکس SRP / زنجیره تازه سنتز شده / ریبوزوم به گیرنده SRP، در غشاء

1- Psedo-symmetrical heterodimer



▲ **شکل تجربی ۷ـ۱۳ Sec61α یکی از اجزای ترانسلوکون است.** آزمایش‌های اتصال شیمیایی نشان داد Sec61α یکی از اجزای ترانسلوکون، هنگامیکه پروتئین‌های ترشحی جدید به سمت لومن ER عبور می‌کنند، به آنها متصل می‌شود. mRNA رمزکننده ۷۰ اسیدآمینه انتهای N پروتئین ترشحی پرولاکتین در سیستم بدون سلول محتوی میکروزوم‌ها، ترجمه شد (شکل b ۴ـ۱۳ را ملاحظه کنید). این mRNA فاقد کدون خاتمه زنجیره و حاوی یک کدون لیزین در نزدیکی وسط توالی است. واکنش‌ها دارای لیزیل ـ tRNAی تغییر یافته شیمیایی بودند که در آن یک معرف اتصالی فعال‌شونده با نور (Light-activated cross-linking reagent) به زنجیره جانبی لیزین متصل شده بود. با وجود این که تمام mRNA ترجمه شد، پلی‌پپتید کامل شده بدون کدون خاتمه، نمی‌توانست از ریبوزوم رها شود بنابراین به صورت چسبیده به غشاء ER باقی ماند. سپس مخلوط واکنش در معرض نور شدید قرار داده شد. این امر باعث می‌شود زنجیره تازه سنتز شده با هر پروتئینی که در نزدیکی ترانسلوکون است پیوند کووالانسی ایجاد نماید. وقتی آزمایش با میکروزوم‌های سلول‌های پستانداران انجام شد، زنجیره جدید با Sec61α پیوند کووالانسی برقرار کرد. انواع مختلفی از mRNA پرولاکتین ساخته شد که در آنها اسیدهای آمینه تغییر یافته لیزین در فاصله‌های مختلفی از ریبوزوم قرار داشت؛ اما پیوند متقابل با Sec61α تنها زمانی مشاهده شد که اسید آمینه تغییر یافته لیزین درون کانال انتقالی قرار می‌گرفت.

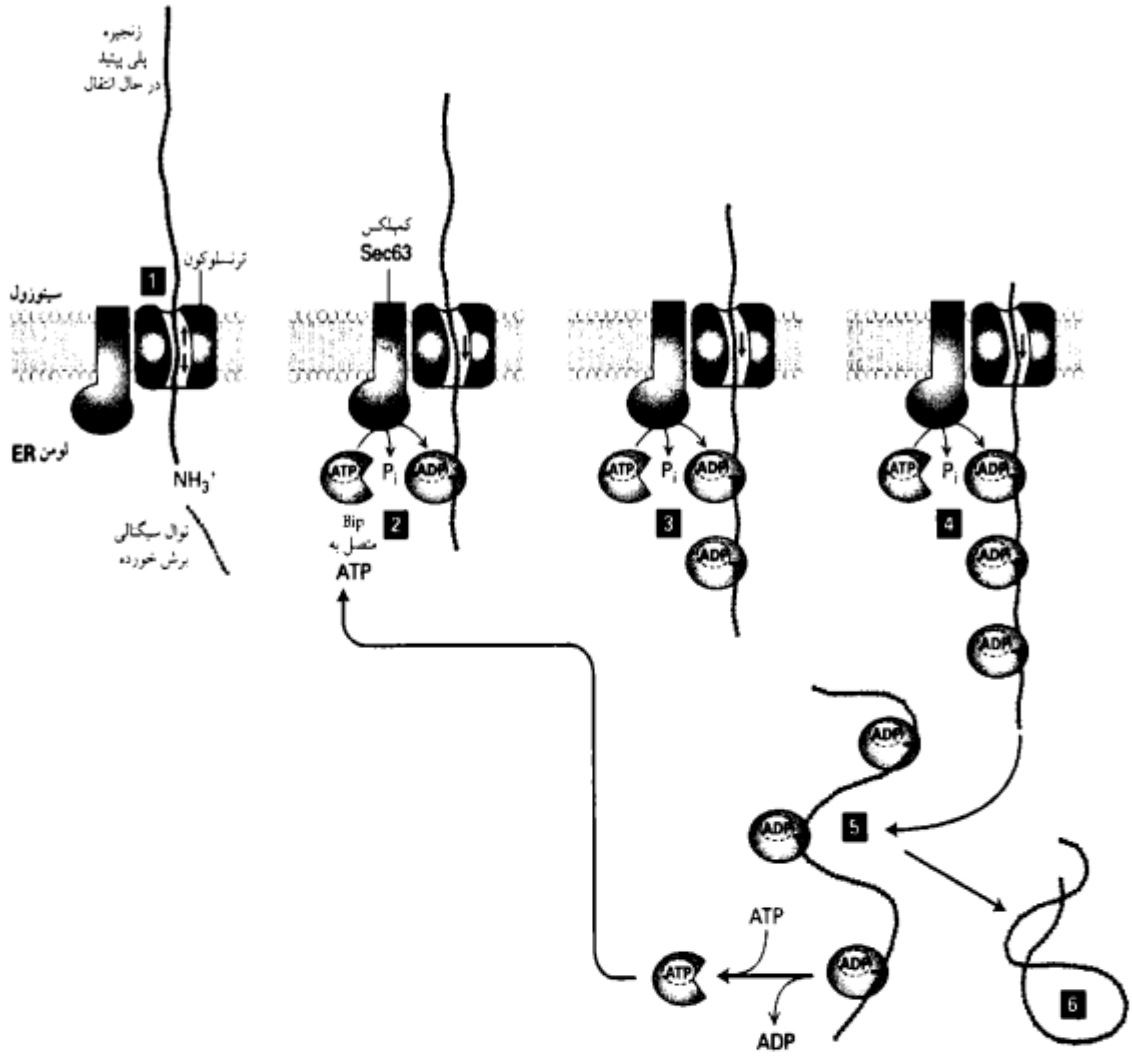
هنگامی که پلی‌پپتید در حال سنتز وارد لومن ER می‌شود، توالی سیگنالی توسط **سیگنال پپتیداز** که یک پروتئین عبور کننده از غشاء بوده و با ترانسلوکون در ارتباط است (شکل ۶ـ۱۳) بریده می‌شود. سیگنال پپتیداز یک توالی را در سمت انتهایی C هسته آبگریز پپتید سیگنالی شناسایی نموده و هنگامی که این توالی به فضای لومن شبکه آندوپلاسمی وارد شد، زنجیره را برش می‌دهد. بعد از بریده شدن توالی سیگنال، پلی‌پپتید در حال طویل شدن از طریق



▲ **شکل تجربی ۸ـ۱۳ ساختار کمپلکس Sec61 باکتریایی.** ساختار Sec61 حل شده در دترجنت از آرکئی‌باکتری M.jannaschii (که به عنوان کمپلکس SecY هم نامیده می‌شود) توسط کریستالوگرافی با اشعه x تعیین شد. a) نمای کناری، کانالی به شکل ساعت شنی را در مرکز حفره نشان می‌دهد. حلقه‌ای از اسیدهای آمینه ایزولوسین در کمر منقبض شدهٔ حفره ممکن است به شکل یک واشری در آمده و کانال را تا هنگام عبور پلی‌پپتید انتقالی از کانال در برابر مولکول‌های کوچک بسته نگه دارد. هنگامیکه پلی‌پپتید در حال انتقال وجود ندارد، کانال توسط درپوش مارپیچی بسته می‌شود. به نظر می‌رسد این درپوش در حین انتقال به سمت خارج از کانال حرکت می‌کند. در این نما؛ نیمهٔ جلویی پروتئین حذف شده تا حفره بهتر دیده شود. b) نمایی از مرکز کانال را نشان می‌دهد که در آنجا (در سمت چپ) مارپیچ‌ها جدا شده و امکان عبور جانبی دمین گذرنده از غشاء آبگریز را به داخل دو لایه لیپیدی می‌دهند.

ترانسلوکون[1] به لومن ER وارد می‌شود. ترانسلوکون تا کامل شدن ترجمه و ورود کامل زنجیره پلی‌پپتیدی به لومن شبکه آندوپلاسمی باز باقی می‌ماند.

1. Translocon



▲ **شکل ۹-۱۳ انتقال پس از ترجمه.** این مکانیسم در مخمرها متداول بوده و احتمالاً گاهی در یوکاریوت‌های عالی نیز مشاهده می‌شود. پیکان‌های کوچک در درون ترانسلوکون‌ها، نشان‌دهنده سُر خوردن‌های تصادفی پپتیدهای انتقالی به سمت داخل و خارج است. اتصال BiP.ADP به قطعات پلی‌پپتید وارد شده، از سر خوردن پلی‌پپتید به سمت خارج یعنی سیتوزول جلوگیری می‌کند.

شبکه آندوپلاسمی متصل شد و SRP زنجیره جدید را رها کرد، اجازه طویل شدن با سرعت طبیعی داده می‌شود. بنابراین SRP و گیرنده SRP، نه تنها به میانکنش بین زنجیره پروتئینی جدید و غشاء ER کمک می‌کنند، بلکه با هم طوری عمل می‌کنند که فقط در حضور غشاء شبکه آندوپلاسمی اجازه طویل شدن و تولید پروتئین کامل را می‌دهند.

عبور پلی‌پپتید در حال سنتز از میان ترانسلوکون به وسیله انرژی آزاد شده در طول ترجمه انجام می‌گیرد

وقتی SRP و گیرنده آن یک ریبوزوم در حال سنتز پروتئین ترشحی را به غشاء ER می‌برند، ریبوزوم و زنجیره تازه سنتز شده به سرعت به **ترانسلوکون** منتقل می‌شوند. ترانسلوکون یک پروتئین کانال در درون غشاء است. در حین ادامه ترجمه، زنجیره در حال طویل شدن مستقیماً از زیر واحد بزرگ ریبوزوم به حفره مرکزی ترانسلوکون وارد می‌شود. زیر واحد ۶۰S ریبوزومی چنان با حفره ترانسلوکون تطابق می‌یابد که زنجیره در حال رشد به هیچ وجه در معرض سیتوپلاسم قرار نمی‌گیرد و این امر از تا خوردن پروتئین قبل از رسیدن به لومن شبکه آندوپلاسمی جلوگیری می‌کند (شکل ۱۳-۶).

برای اولین بار جهش‌هایی در ژن مخمری رمزکنندهٔ Sec61α، که باعث توقف انتقال پروتئین ترشحی به لومن ER می‌شد، باعث شناسایی و تشخیص ترانسلوکون گردید. سپس سه پروتئین به نام کمپلکس Sec61 یافت شدند که ترانسلوکون پستانداران را تشکیل می‌دادند این سه پروتئین عبارتند از: Sec61α، یک پروتئین

سرتاسری غشایی با ۱۰ مارپیچ عبورکننده از غشاء و دو پروتئین کوچک‌تر به نام‌های Sec61β و Sec61γ. آزمایشات اتصال شیمیایی ثابت کرد، زنجیره پلی‌پپتیدی در حال انتقال هم در مخمر و هم در سلول‌های پستانداران با پروتئین Sec61α تماس پیدا می‌کند، این امر ثابت می‌کند Sec61α یکی از اجزا ترانسلوکون است (شکل ۷ـ۱۳).

وقتی میکروزوم‌ها در سیستم انتقال بدون سلول با وزیکول‌های فسفولیپیدی بازسازی شده که حاوی گیرنده SRP و کمپلکس Sec61 می‌باشد، جایگزین شدند، پروتئین ترشحی جدید از کمپلکس SRP / ریبوزوم‌اش به وزیکول منتقل شد. این یافته‌ها مشخص کرد که گیرنده SRP و کمپلکس Sec61 تنهاپروتئین‌های غشای ER هستند که برای انتقال ضروری هستند. چون هیچ‌کدام از این دو نمی‌توانند از هیدرولیز ATP و یا از طریق دیگری انرژی لازم جهت راه‌اندازی انتقال را فراهم نمایند، به نظر می‌رسد انرژی حاصل از طویل شدن زنجیره در ریبوزوم برای هل دادن زنجیره پلی‌پپتیدی در غشاء، کافی باشد.

ترانسلوکون باید قادر باشد انواع مختلفی از توالی‌های پلی‌پپتیدی را از خود عبور دهد و در عین حال نسبت به مولکول‌های کوچک نظیر ATP و یا اسیدآمینه‌ها بسته باشد. علاوه بر این، جهت نگه داشتن سد نفوذپذیری غشای شبکه آندوپلاسمی در غیاب پلی‌پپتید انتقالی، بایستی مسیری وجود داشته باشد تا ترانسلوکون را طوری تنظیم نماید که در حالت عادی بسته باشد، و تنها هنگامی باز شود که کمپلکس زنجیره تازه سنتز شده ریبوزوم، به آن متصل می‌گردد. ساختار دقیق کمپلکس Sec61 از آرکئی باکتری *Methanococcus nasehiijan* اخیراً توسط کریستالوگرافی اشعه x تعیین شد. این یافته بیان می‌کند، چگونه ترانسلوکون یکپارچگی غشاء را حفظ می‌کند (شکل ۸ـ۱۳). ۱۰ مارپیچ گذرنده از غشاء در Sec61α یک کانال مرکزی را تشکیل می‌دهند که پپتید انتقالی از آن عبور می‌کند. ساختار در میانه حفره مرکزی Sec61α حاوی اسیدهای آمینه ایزولوسین آبگریز بوده و احتمالاً مثل یک واشر دور پپتید انتقالی را می‌گیرد. به علاوه، مدل ساختاری کمپلکس Sec61 (که بدون پپتید انتقالی جداسازی شد و احتمالاً فرم بسته است) نشان داد یک پپتید مارپیچی همانند سرپوشی، کانال مرکزی را می‌بندد. مطالعات بیوشیمیایی درباره کمپلکس Sec61 نشان داد پپتید تشکیل‌دهنده سرپوش طی جابه‌جایی فعال، متحمل تغییر شکل مهمی می‌گردد، بطوریکه وقتی پپتید انتقالی وارد کانال می‌شود، پپتید سرپوش به کنار رفته و اجازه جابه‌جایی را می‌دهد.

بررسی‌ها با میکروسکوپ الکترونی بر روی کمپلکس Sec61 جدا شده از ER سلول‌های یوکاریوتی نشان داد سه یا چهار نسخه از Sec61α با همدیگر در قسمتی از غشاء کنار هم قرار می‌گیرند. اهمیت عملکردی این ارتباط بین کانال‌های ترانسلوکون هنوز مشخص نشده، اما الیگومریزه شدن کانال‌های ترانسلوکون ممکن است باعث تسهیل ارتباط بین ترانسلوکون، سیگنال پپتیداز و کمپلکس‌های پروتئینی لومن شود که در فرآیند انتقال مشارکت می‌کنند.

هیدرولیز ATP به انتقال‌های پس از ترجمه‌ای بعضی پروتئین‌های ترشحی در مخمر انرژی می‌دهد

در اغلب یوکاریوت‌ها، پروتئین‌های ترشحی همزمان با ترجمه وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شوند اما در مخمر، برخی پروتئین‌های ترشحی بعد از کامل شدن ترجمه وارد لومن شبکه آندوپلاسمی می‌گردند. در چنین **انتقال بعد از ترجمه‌ای**[1] پروتئین انتقالی از همان Sec61 که در انتقال همزمان با ترجمه استفاده می‌شد عبور می‌کند اما SRP و گیرنده SRP در انتقال بعد از ترجمه شرکت نداشته و به نظر می‌رسد در چنین مواردی میانکنش مستقیم بین ترانسلوکون و توالی سیگنالی در پروتئین کامل شده برای هدف‌یابی به غشاء ER کافی می‌باشد. به علاوه، نیروی پیش‌برنده برای انتقال یک طرفه از غشای ER، توسط کمپلکس پروتئینی دیگری تأمین می‌گردد. این کمپلکس به عنوان کمپلکس Sec63 شناخته شده و یکی از اعضای چاپرون‌های مولکولی خانواده Hsc ۷۰ یعنی BiP است. کمپلکس تترامری Sec63 در غشاء ER نزدیکی ترانسلوکون قرار دارد، در حالی‌که BiP در لومن ER وجود دارد. همچون اعضای دیگر خانواده Hsc ۷۰، BiP یک دمین اتصال به پپتید و یک دُمین ATP آزی دارد. این چاپرون‌ها به پروتئین‌های تا نخورده یا پروتئین‌های تا خورده به صورت جزئی، متصل شده و آنها را پایدار می‌کنند (شکل ۱۶ـ۳).

مدل انتقال پس از ترجمه یک پروتئین به ER، در شکل ۹ـ۱۳ نشان داده شده است. وقتی انتهای N یک پروتئین وارد لومن ER می‌شود، سیگنال پپتیداز توالی سیگنالی از دقیقاً مثل انتقال همزمان با ترجمه برش می‌دهد (مرحله ❶). میانکنش BiP. ATP به همراه بخش لومنی کمپلکس Sec63 باعث هیدرولیز ATP متصل می‌شود. این امر خود باعث تغییر در کنفورماسیون BiP شده و باعث اتصال آن به زنجیره پلی‌پپتیدی می‌شود. (مرحله ❷). چون Sec63 در نزدیکی ترانسلوکون قرار گرفته است، بنابراین BiP در مناطقی

1- Post-translational translocation

فعال می‌شود که پلی‌پپتید نوظهور از آن مناطق می‌تواند وارد ER شود. برخی آزمایشات بیان می‌کند بدون اتصال به BiP، پلی‌پپتیدها بدون تاخوردگی در کانال ترانسلوکون به عقب یا جلو سُر می‌خورند. چنین حرکات و سُر خوردن‌های اتفاقی به ندرت باعث عبور پلی‌پپتید از غشاء ER می‌شود. اتصال یک مولکول BiP.ADP به قسمت لومنی پلی‌پپتید از سُر خوردن پلی‌پپتید به بیرون ER جلوگیری می‌کند. به موازات سر خوردن‌های تصادفی، قسمت بیشتری از پلی‌پپتیدها به سمت غشاء ER رفته و با اتصال مولکول‌های BiP.ADP به زنجیره پلی‌پپتیدی این مولکول‌ها به عنوان چرخ‌دندهٔ عمل نموده و در نهایت تمام پلی‌پپتید را در عرض چند ثانیه به داخل ER می‌کشانند (مراحل ❹ و ❸). در مقیاس زمانی آهسته، مولکول‌های BiP به صورت خودبه‌خود ADP اتصال یافته را با ATP جایگزین کرده و این امر موجب رهاسازی پلی‌پپتید شده و پلی‌پپتید می‌تواند ساختمان‌فضایی طبیعی خود را به خود بگیرد (مراحل ❺ و ❻). BiP.ATP بازیافت شده برای میانکنش بعدی با Sec63 آماده است. BiP و کمپلکس Sec63 هم چنین برای انتقال همزمان با ترجمه نیز لازم و ضروری هستند. جزئیات نقش آنها در این فرآیند به خوبی مشخص نیست، اما عقیده بر این است که آنها در مراحل ابتدایی این روند هم چون همسو کردن و ردیف کردن پپتید نشانه به درون حفره ترانسلوکون، وارد عمل می‌شوند.

واکنش کلی انجام شده توسط BiP مثال مهمی از این است که چگونه انرژی شیمیایی آزاد شده از هیدرولیز ATP می‌تواند موجب حرکت مکانیکی یک پروتئین از غشاء شود. سلول‌های باکتریایی نیز از انرژی حاصل از ATP برای انتقال پروتئین‌های کامل شده، از غشاء پلاسمایی استفاده می‌کنند. در باکتری‌ها، نیروی پیشبرنده انتقال توسط یک ATP آز سیتوزولی به نام پروتئین SecA حاصل می‌شود. SecA به سمت سیتوپلاسمی ترانسلوکون متصل شده و ATP سیتوزولی را هیدرولیز می‌کند. پروتئین SecA با مکانیسمی که هنوز به خوبی شناخته نشده، در یک چرخه مکانیکی جفت شده با هیدرولیز ATP، قطعات پلی‌پپتیدی را از غشاء عبور می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۳

انتقال پروتئین‌های ترشحی از غشای ER

■ سنتز پروتئین‌های ترشحی، پروتئین‌های انتگرال غشاء پلاسمایی، پروتئین‌های رهسپار به ER، کمپلکس گلژی یا لیزوزوم روی ریبوزوم‌های سیتوزولی شروع می‌شود. این ریبوزوم‌ها به غشاء ER متصل شده و ER خشن را تشکیل می‌دهند (شکل ۱-۱۳ سمت چپ را ملاحظه کنید).

■ توالی سیگنال ER روی پروتئین‌های ترشحی تاز سنتزشده حاوی قطعه‌ای آبگریز از اسیدهای آمینه بوده و بطور کلی در انتهای N قرار می‌گیرند.

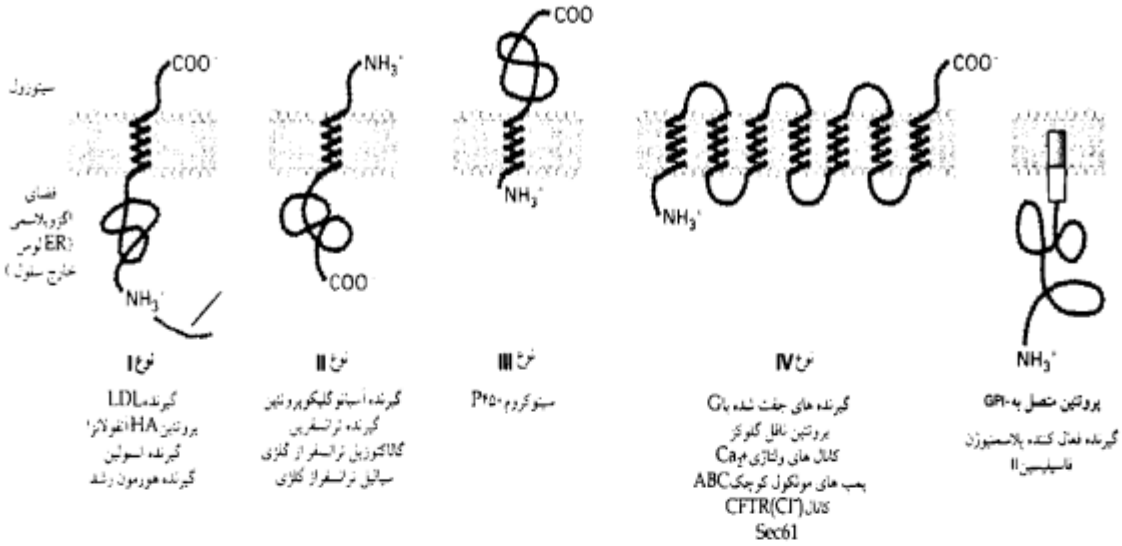
■ در انتقال همزمان با ترجمه، ذره شناسایی سیگنال (SRP) اول توالی سیگنال ER بر روی پروتئین ترشحی تازه سنتزشده را شناسایی نموده و به آن متصل می‌شود، SRP از طرف دیگر به گیرنده SRP روی غشاء ER متصل شده بنابراین باعث هدایت کمپلکس ریبوزوم / زنجیره در حال سنتز به ER می‌شود.

■ SRP و گیرنده SRP سپس باعث ورود پروتئین ترشحی در حال سنتز به داخل ترانسلوکون (کمپلکس Sec61) می‌شود. هیدرولیز دو مولکول GTP توسط SRP و گیرنده‌اش باعث ایجاد این فرآیند اتصال شده و موجب جداشدن SRP می‌شود (شکل‌های ۵-۱۳ و ۶-۱۳ را ملاحظه کنید). به موازات اتصال ریبوزوم به ترانسلوکون، ترجمه ادامه یافته و زنجیره تانخورده پروتئین به داخل لومن ER وارد می‌شود. برای انتقال انرژی دیگری لازم نیست.

■ ترانسلوکون حاوی یک کانال مرکزی است که در آن اسید هیا آمینه آبگریز قرار گرفته و امکان می‌دهد تا زنجیره پروتئین تانخورده از آن عبور کند، در حالیکه بقیه قسمت‌ها در ترانسلوکون به یون‌ها و مولکول‌های آبدوست متصل می‌شوند. علاوه بر این ترانسلوکون دارای دریوش بوده و فقط هنگامی باز است که پلی پپتیدی از آن در حال عبور می‌باشد.

■ در انتقال پس ترجمه‌ای، پروتئین‌های ترشحی کامل از طریق میانکنش توالی سیگنال با ترانسلوکون به طرف غشاء ER هدایت می‌شوند. زنجیره پلی‌پپتیدی از طریق مکانیسم چرخ دنده‌ای نیازمند به هیدرولیز ATP توسط BiP (که ورود پلی‌پپتیدی را پایدار می‌کند) به داخل ER وارد می‌شود (شکل ۹-۱۳ را ملاحظه کنید). در باکتریها نیروی محرکه برای انتقال پس ترجمه‌ای از طریق SecA تأمین می‌شود. SecA ATP آز سیتوزولی بوده و باعث حرکت پلی‌پپتید از کانال ترانسلوکون می‌شود.

■ هم در انتقال همزمان با ترجمه و هم انتقال پس از ترجمه، سیگنال پپتیدازی در غشاء ER توالی سیگنال ER را در پروتئین ترشحی به محض ورود انتهای N به لومن، می‌برد.



▲ **شکل ۱۰-۱۳ پروتئین‌های غشایی ER.** چهار دسته توپولوژیکی پروتئین‌های انتگرال غشاء در شبکه آندوپلاسمی خشن سنتز می‌شوند و نوع پنجم با دنباله فسفولیپیدی به غشاء متصل می‌شود. پروتئین‌های غشایی براساس جهت‌گیری‌هایشان در غشاء و انواع سیگنال‌هایی که آنها را به سمت غشاء هدایت می‌کند، دسته‌بندی می‌شوند. در دسته‌های I تا IV، قطعات آبگریز زنجیره پروتئینی، مارپیچ‌های α را تشکیل می‌دهند که در غشاء دو لایه قرار می‌گیرند. نواحی بیرون از غشاء آبدوست بوده و به صورت کنفورماسیون‌های مختلفی تا می‌خورند. همه پروتئین‌های نوع IV چند مارپیچ α عبورکننده از غشاء دارند. توپولوژی نوع IV نمایش داده شده در این جا مربوط به گیرنده جفت شده با G پروتئین بوده و دارای هفت مارپیچ α در انتهای N و در سمت اگزوپلاسمیک غشاء و انتهای C در سمت سیتوزولی قرار می‌گیرند. سایر پروتئین‌های نوع IV ممکن است تعداد مارپیچ‌های α مختلف و جهت‌گیری انتهای N و انتهای C متفاوتی داشته باشند.

۱۳-۲ ورود پروتئین‌ها به غشاء شبکه اندوپلاسمی

در فصل‌های قبل با پروتئین‌های اینتگرال مختلفی مواجه شدیم که در سلول حضور دارند. هر یک از پروتئین‌ها با توجه به غشاء دو لایه فسفولیپیدی جهت‌گیری خاصی دارند. پروتئین‌های انتگرال غشایی واقع در ER، گلژی و لیزوزوم‌ها و هم چنین پروتئین‌های موجود در غشاء پلاسمایی، همگی در شبکه آندوپلاسمی خشن سنتز شده، و با جهت‌گیری خاص خود در غشاء باقی می‌مانند تا از طریق مسیر مشابه پروتئین‌های ترشحی محلول، به طرف هدف نهایی خود حرکت کنند (شکل ۱-۱۳، چپ). طی این جابه‌جایی، جهت‌گیری پروتئین غشایی حفظ می‌شود؛ بدین معنی که بعضی از قطعات پروتئین همیشه به سمت سیتوزول بوده و بعضی دیگر همیشه در جهت مخالف قرار می‌گیرند. بنابراین جهت‌گیری نهایی این پروتئین‌های غشایی در طول بیوسنتز آنها بر روی غشاء ER مشخص می‌شود. در این قسمت ابتدا در این رابطه بحث خواهیم کرد که چگونه پروتئین‌های انتگرال می‌توانند با غشاءها میانکنش دهند و سپس بررسی می‌کنیم چگونه انواع مختلفی از توالی‌ها، که در مجموع به عنوان **توالی‌های توپوژنیک**[1] شناخته می‌شوند، ورود و جهت‌گیری کلاس‌های متفاوتی از پروتئین‌های انتگرال در غشاء را هدایت می‌کنند. این فرآیندها در اثر تغییرات مکانیسم پایه‌ای مورد استفاده برای جابه‌جایی پروتئین‌های ترشحی محلول از بین غشاء ER، صورت می‌گیرند.

گروه‌های توپولوژیک متعددی از پروتئین‌های اینتگرال غشایی در ER سنتز می‌شوند

توپولوژی یک پروتئین غشایی به دو نکته اشاره دارد. تعداد دفعاتی که زنجیره پلی‌پپتیدی از درون غشاء عبور می‌کند و جهت این قطعات عبورکننده از غشاء در درون غشاء. قطعات کلیدی پروتئینی که توپولوژی آن را تعیین می‌کنند خودشان قطعات عبورکننده از غشاء بوده و معمولاً مارپیچ‌های α با ۲۵-۲۰ اسیدآمینه آبگریز می‌باشند که در میانکنش‌های مناسب از لحاظ انرژی در درون دو لایه فسفولیپیدی آبگریز شرکت می‌کنند.

اکثر پروتئین‌های انتگرال غشاء جزو یکی از چهار دسته

1- Topogenic sequences

توپولوژیکی که شکل ۱۰ـ۱۳ نشان داده شده هستند. دسته‌های پروتئینی I، II و III شامل پروتئین‌های تک ـ گذر[1] بوده و فقط یک قطعه مارپیچ α گذرنده از غشاء دارند. پروتئین‌های نوع I یک توالی سیگنالی بریده شده در انتهای N داشته و با ناحیه انتهای N شان که در سمت لومن (به سمت لومنی، **سمت اگزوپلاسمی** نیز گفته می‌شود.) و با ناحیه آبگریز انتهای ـ C، در سمت سیتوزولی غشاء قرار می‌گیرند. پروتئین‌های نوع II توالی سیگنالی ER قابل برش نداشته و با ناحیه آبگریز انتهای N در سمت سیتوزولی و ناحیه آبگریز انتهای C در سمت اگزوپلاسمیک در غشاء ER جهت‌گیری (یعنی بر خلاف پروتئین‌های نوع I) می‌کنند. پروتئین نوع III، جهتی مشابه پروتئین‌های نوع I داشته، اما توالی سیگنالی ER قابل برش ندارند. این توپولوژی متفاوت همان‌طور که در بخش بعدی مورد بحث قرار خواهد گرفت، حاصل مکانیسم‌های جداگانه‌ای است که توسط سلول استفاده می‌شود تا جهت‌گیری غشایی قطعات درون غشاء را ایجاد کند.

پروتئین‌های تشکیل‌دهنده دسته توپولوژیکی IV، دو یا چند قطعه گذرنده از غشاء داشته و **پروتئین‌های چند گذره**[2] نامیده می‌شوند. برای مثال خیلی از پروتئین‌های انتقالی غشایی مورد بحث در فصل ۱۱ و تعداد زیادی از گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین (که در فصل ۱۵ ذکر می‌شوند) جزو این دسته قرار می‌گیرند. آخرین نوع پروتئین‌های غشایی قطعه آبگریز عبورکننده از غشاء را نداشته ولی این پروتئین‌ها به یک دنباله آمفی‌پاتیک فسفولیپیدی متصل هستند که در داخل غشاء قرار می‌گیرد (شکل ۱۰ـ۱۳، راست).

توالی‌های داخلی متوقف‌کننده انتقال و توالی‌های اتصال سیگنال، توپولوژی پروتئین‌های تک‌گذر را تعیین می‌کنند.

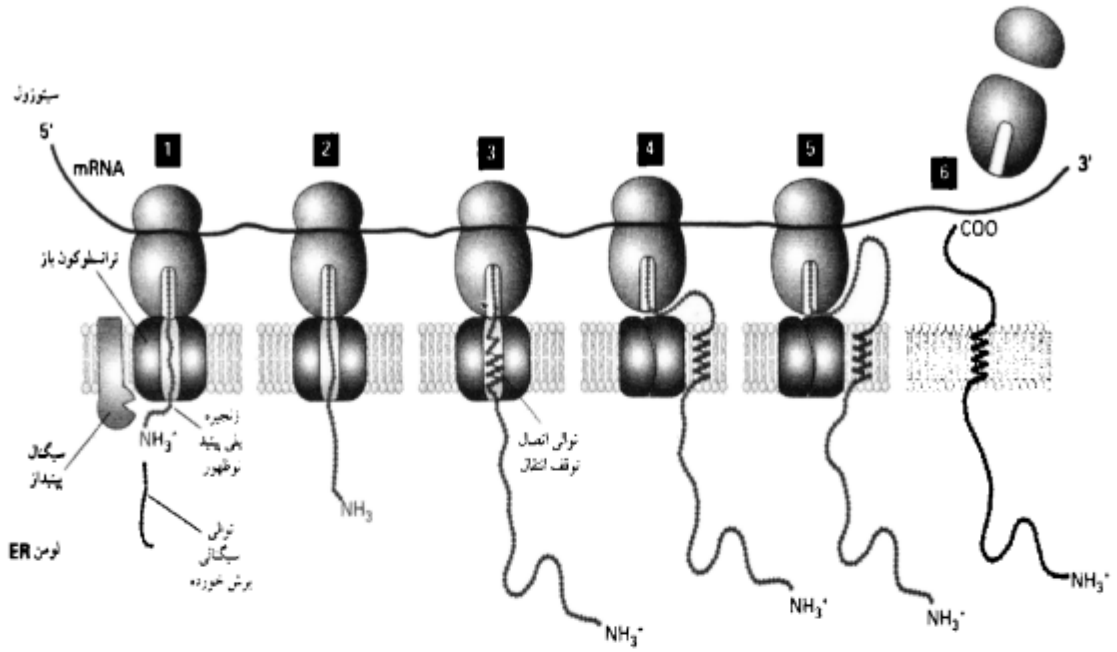
ما بحث خود را با این موضوع شروع می‌کنیم که چگونه توپولوژی پروتئین غشایی با ورود غشایی پروتئین‌های اینتگرال که شامل یک قطعه آبگریز درون غشایی هستند، تعیین می‌شود. دو توالی در هدف‌یابی و جهت‌گیری پروتئین‌های نوع I در غشاء شبکه آندوپلاسمی نقش دارند، در حالی که پروتئین‌های نوع II و III شامل یک توالی توپوژن داخلی هستند. همان‌طور که خواهیم دید، سه نوع توالی توپوژن اصلی وجود دارد که برای هدایت پروتئین‌ها به غشاء ER و جهت‌گیری آنها در غشاء استفاده می‌شوند. با یک توالی سیگنالی ER در انتهای N آشنا شدیم. دوتای دیگر در این جا مورد بحث قرار می‌گیرند. این توالی‌های داخلی به عنوان توالی‌های اتصالی توقف انتقال و توالی‌های اتصال سیگنالی نیز شناخته می‌شوند.

پروتئین‌های نوع I. تمامی پروتئین‌های درون غشایی نوع I یک توالی سیگنالی در انتهای N و هم چنین یک توالی آبگریز که مارپیچ α عبورکننده از غشاء را تشکیل می‌دهد، دارند. توالی سیگنال انتهای N در پروتئین نوع I تازه سنتز شده هم چون پروتئین‌های ترشحی، انتقال همزمان با ترجمه پروتئین را با عمل مشترک SRP و گیرنده SRP آغاز می‌کند. هنگامی که انتهای N پلی‌پپتید در حال سنتز، وارد لومن ER می‌شود توالی سیگنالی بریده شده و زنجیره در حال سنتز به خارج شدن از غشاء ER ادامه می‌دهد. با این حال، بر خلاف پروتئین‌های ترشحی وقتی توالی حدوداً ۲۲ اسیدآمینه‌ای آبگریز که ناحیه گذرنده از غشاء زنجیره جدید می‌باشد، وارد ترانسلوکون شد، انتقال پروتئین از کانال را متوقف می‌کند (شکل ۱۱ـ۱۳). ساختار کمپلکس Sec61 نشان می‌دهد کانال ممکن است مانند دو کفه یک صدف باز شده و به قطعه آبگریز گذرنده از غشاء پپتید در حال انتقال اجازه دهد تا به صورت جانبی از بین دمین‌های پروتئین‌های تشکیل‌دهنده دیواره ترانسلوکون عبور کند (شکل ۸ـ۱۳). وقتی پپتید بدین صورت از ترانسلوکون خارج می‌شود، به دو لایه فسفو لیپیدی غشاء متصل گردد. به دلیل عمل دوگانه این چنین توالی‌هایی یعنی توقف عبور زنجیره پلی‌پپتیدی از ترانسلوکون و به وجود آوردن یک قطعه گذرنده از غشای آبگریز در غشاء دولایه، به آن **توالی اتصالی توقف انتقال**[3] می‌گویند.

وقتی انتقال مختل شد، ترجمه در ریبوزوم متصل به ترانسلوکون خالی و بسته ادامه می‌یابد. به موازات سنتز انتهای C زنجیره پروتئینی، این قسمت به طرف سیتوزولی غشاء خارج می‌شود. وقتی ترجمه کامل شد، ریبوزوم از ترانسلوکون جدا شده و انتهای C پروتئین نوع I تازه سنتز شده در سیتوزول باقی می‌ماند.

مطالعه بر روی cDNAهای رمزدهی‌کننده گیرنده‌های جهش یافته هورمون رشد انسانی (HGH) که در سلول‌های کشت داده شده و پستانداران بیان می‌شوند، تأییدی بر این مکانیسم است. گیرنده طبیعی HGH (یک پروتئین نوع I بوده) به صورت طبیعی به غشاء پلاسمایی منتقل می‌شود اما گیرنده جهش یافته‌ای که دارای اسیدهای آمینه باردار در قطعه مارپیچ α عبورکننده از غشاء بوده و یا فاقد قسمت زیادی از این قطعه مارپیچ باشد، به‌طور کامل به لومن ER انتقال پیدا کرده و در نهایت به عنوان یک پروتئین محلول از سلول ترشح می‌شوند. این قبیل آزمایشات نشان می‌دهند که مارپیچ

1- Single-pass 2- Multipass proteing
3- Stop-transfer anchor sequence



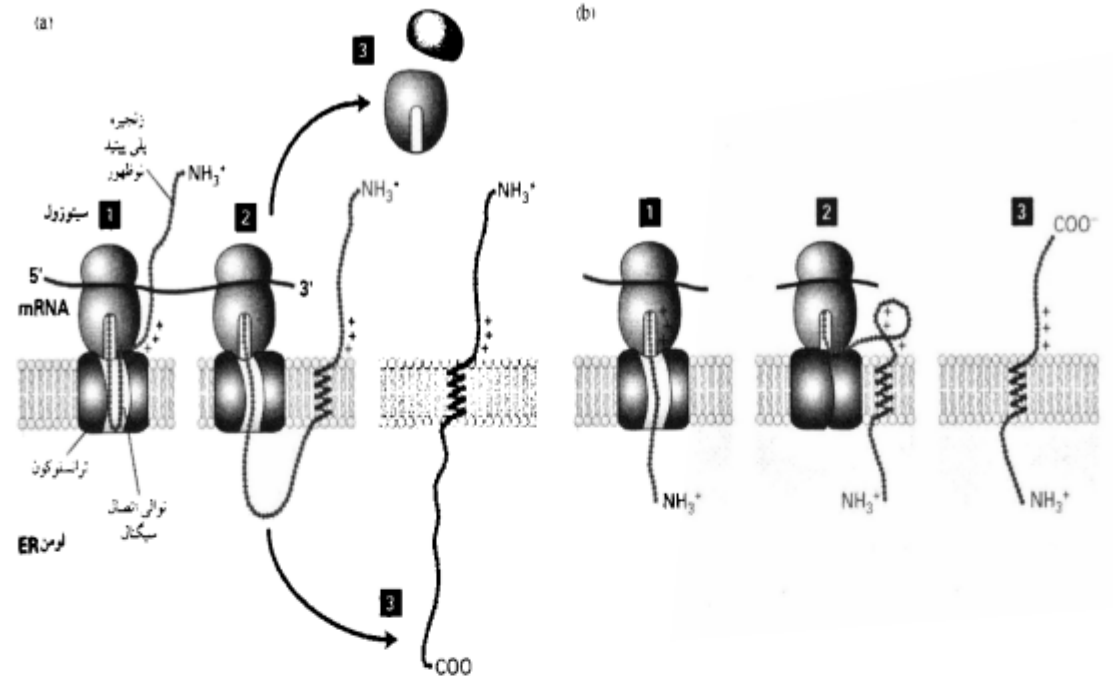
▲ **شکل ۱۱ـ۱۳ قرارگیری پروتئین‌های تک گذر نوع I در غشاء.** مرحله ❶: بعد از این‌که کمپلکس ریبوزوم / زنجیره جدید با ترانسلوکون در غشاء ER ارتباط پیدا کرد، توالی سیگنالی انتهای N بریده می‌شود. این فرآیند مشابه مکانیسم موجود در مورد پروتئین‌های ترشحی محلول است (شکل ۶ـ۱۳ را ملاحظه کنید). مراحل ❷ و ❸: زنجیره طویل می‌شود تا زمانی که توالی آبگریز اتصالی توقف انتقال سنتز شده و وارد ترانسلوکون گردد، در این هنگام این قطعه از خروج بیشتر زنجیره جدید به لومن ER جلوگیری می‌کند. مرحله ❹: توالی اتصالی توقف انتقال به صورت جانبی از بین زیرواحدهای ترانسلوکون حرکت کرده و به دولایه لیپیدی متصل می‌شود. در این هنگام، احتمالاً ترانسلوکون بسته می‌شود. مرحله ❺: به موازات ادامه سنتز، زنجیره در حال طویل شدن ممکن است از میان فضای کوچک بین ریبوزوم و ترانسلوکون به سمت سیتوزول خارج شود. مرحله ❻: وقتی سنتز کامل شد، زیر واحدهای ریبوزومی به سیتوزول رها شده و پروتئین را آزاد می‌گذارند تا در غشاء پخش گردد.

α آبگریز عبورکننده از غشاء در گیرنده HGH و سایر پروتئین‌های نوع I مشابه به توالی توقف انتقال و اتصال به غشاء عمل نموده و از عبور انتهای C پروتئین از غشاء ER جلوگیری می‌کند.

پروتئین‌های نوع II و نوع III. بر خلاف پروتئین‌های نوع I، پروتئین‌های نوع II و III توالی سیگنالی قابل برش در انتهای N ندارند، در عوض هر دو دارای **توالی اتصال سیگنال**[1] می‌باشند. این توالی، یک توالی داخلی آبگریز بوده و هم به عنوان توالی سیگنالی ER و هم به عنوان توالی اتصال غشایی عمل می‌کند. به یاد آورید که پروتئین‌های نوع II و نوع III در غشاء جهت‌گیری متضادی با هم دارند (شکل ۱۰ـ۱۳)؛ این اختلاف به جهت‌گیری توالی اتصال سیگنال آنها در ترانسلوکون بستگی دارد. توالی اتصال سیگنال داخلی در پروتئین‌های نوع II باعث هدایت ورود زنجیره تازه سنتز شده به غشاء ER می‌شود به‌طوری که انتهای N زنجیره به سمت سیتوزول قرار می‌گیرد. این عمل با استفاده از همان مکانیسم SRP شرح داده شده در مورد توالی‌های سیگنالی انجام می‌گیرد (شکل a ۱۲ـ۱۳). با این حال، توالی داخلی اتصال سیگنال برش داده نشده و به صورت جانبی از بین دُمین‌های پروتئین‌های ترانسلوکون عبور کرده و به سمت غشاء دولایه فسفولیپیدی رفته و آن جا به عنوان یک قطعه اتصالی به غشای عمل می‌کند. به موازات ادامه طویل شدن زنجیره، ناحیه انتهای C از زنجیره در حال سنتز از طریق انتقال همزمان با ترجمه، از ترانسلوکون به سمت لومن ER خارج می‌شود.

در مورد پروتئین‌های نوع III، توالی اتصال سیگنال موجود در نزدیکی انتهای N، زنجیره تازه سنتز شده را به غشاء ER وارد می‌کند، در این جا انتهای N به سمت لومن قرار می‌گیرد که خلاف جهت سیگنال اتصال در پروتئین‌های نوع II است. توالی اتصال سیگنال پروتئین‌های نوع III نیز همانند توالی توقف انتقال عمل

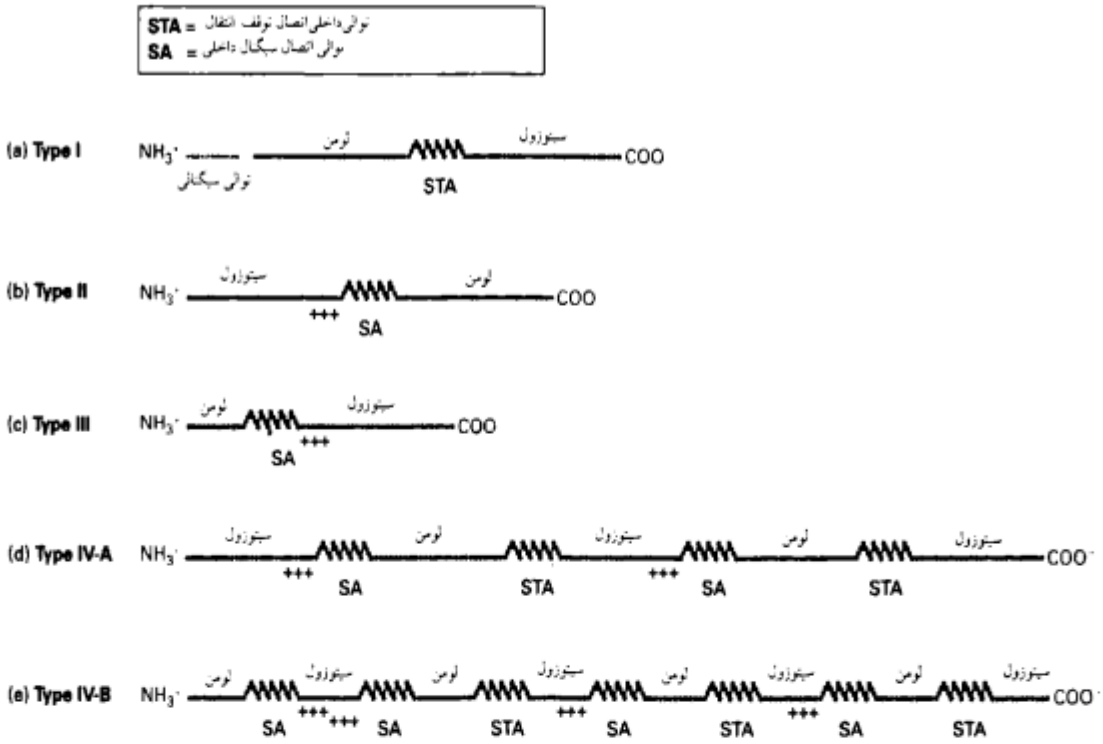
1- Signal-anchor sequence



▲ **شکل ۱۲ـ۱۳ قرارگیری پروتئین‌های تک گذر نوع II و نوع III.** (a) **پروتئین‌های نوع II.** مرحله ❶: بعد از سنتز توالی اتصال سیگنال داخلی در ریبوزوم‌های سیتوزولی، این توالی به SRP متصل می‌شود (نشان داده نشده)، SRP، کمپلکس ریبوزوم / زنجیره تازه سنتز شده را به سمت غشاء ER هدایت می‌کنند این عمل مشابه هدف‌یابی پروتئین‌های ترشحی محلول است، با این تفاوت که در پروتئین‌های ترشحی محلول توالی سیگنالی آبگریز در انتهای N واقع نشده و سپس بریده نمی‌شود. زنجیره تازه سنتز شده در ترانسلوکون با قسمت انتهای N خود به طرف سیتوزول جهت‌گیری می‌کند. اعتقاد بر این است که این جهت‌گیری به واسطهٔ اسیدهای آمینه با بار مثبت موجود در انتهای N توالی اتصال سیگنال می‌باشد. مرحله ❷: در حین طویل شدن زنجیره و ورودش به سمت لومن توالی اتصال سیگنال داخلی به صورت جانبی به سمت خارج از ترانسلوکون حرکت کرده و زنجیره را به دو لایه فسفولیپیدی متصل می‌کند. مرحله ❸: هنگامی که سنتز پروتئین تکمیل شد، انتهای C پلی‌پپتید در لومن آزاد شده و زیر واحدهای ریبوزومی در سیتوزول رها می‌گردند. b) پروتئین‌های نوع III. مرحله I: مرحله هدایت عملکرد ریبوزوم و زنجیره تازه سنتز شده به طرف ER مشابه پروتئین‌های نوع II است به جز با این تفاوت که اسیدهای آمینه با بار مثبت موجود در سمت انتهای C توالی اتصال سیگنال، باعث می‌شوند قطعه عبورکننده از غشاء در ترانسلوکون به صورتی جهت‌گیری کند که قسمت انتهای ـ C به سمت سیتوزول و انتهای N پروتئین به سمت لومن ER قرار گیرد. مراحل ❷ و ❸: طویل شدن زنجیره در قسمت انتهای C پروتئین تکمیل شده و زیر واحدهای ریبوزومی آزاد می‌گردند.

کرده و از خروج بیش از حد زنجیره تازه سنتز شده به لومن ER جلوگیری می‌کند (شکل b ۱۲ـ۱۳). طویل شدن زنجیره انتهای C مثل پروتئین‌های نوع I تا توالی اتصال سیگنال / توقف انتقال ادامه پیدا کرده و باعث ساخته شدن توالی آبگریزی می‌شود که با حرکت جانبی از بین زیر واحدهای ترانسلوکون عبور کرده و با اتصال به غشاء، باعث اتصال پلی‌پپتید به غشاء می‌شود (شکل ۱۱ـ۱۳).

یکی از خصوصیات توالی اتصال سیگنال که به نظر می‌رسد جهت‌گیری ورود را تعیین می‌کند، وجود تراکم زیادی از اسیدهای‌آمینه با بار مثبت در مجاورت یک انتهای قطعه آبگریز است. به دلایلی که به خوبی مشخص نیست، این دنباله با بار مثبت تمایل دارد در سمت سیتوزولی غشاء باقی مانده و از غشاء به سمت لومن ER حرکت نکند. بنابراین موقعیت اسیدهای آمینه باردار، جهت‌گیری توالی اتصال سیگنال را در ترانسلوکون تعیین نموده و مشخص می‌کنند که آیا باقیمانده زنجیره پلی‌پپتیدی به عبور به سمت لومن ER ادامه دهد یا ادامه انتقال متوقف شود. پروتئین‌های نوع II اسیدهای آمینه با بار مثبت را در سمت انتهای N توالی اتصال سیگنال خود داشته و با جهت‌دهی انتهای N در سیتوزول امکان عبور سمت انتهای C را به ER می‌دهند (شکل a ۱۲ـ۱۳). در حالی که در پروتئین‌های نوع III اسیدهای آمینه با بار مثبت در سمت انتهای C توالی اتصال سیگنال قرار داشته و با ورود انتهای N در ترانسلوکون،



▲ **شکل ۱۳-۱۳(شکل رنگی) توالی‌های توپوژنیک جهت‌گیری پروتئین غشایی ER را تعیین می‌کنند.** توالی‌های توپوژنیک به رنگ قرمز و پروتئین‌های محلول آبدوست به رنگ آبی نشان داده شده‌اند. توالی‌های توپوژن داخلی، مارپیچ‌های a عبورکننده غشاء را تشکیل داده و پروتئین‌ها یا قطعاتی از پروتئین‌ها را به غشاء متصل می‌کنند. (a) پروتئین‌های نوع I شامل یک توالی سیگنالی بریده شده و یک توالی اتصال داخلی توقف انتقال (STA) هستند. (b و c) پروتئین‌های نوع II و III دارای یک توالی داخلی اتصال سیگنال (SA) هستند. تفاوت در جهت‌گیری این پروتئین‌ها اغلب به این مسأله بستگی دارد که تراکم اسیدهای‌آمینه با بار مثبت (+++) در سمت انتهای N (نوع II) یا درست انتهای C (نوع III) توالی SA قرار گرفته باشند. (d و e) همان‌طور که در این مثال‌ها نشان داده شده تقریباً همه پروتئین‌های چندگذره فاقد توالی قابل برش هستند. پروتئین‌های نوع IV-A، که انتهای N آنها به سمت سیتوزول است، شامل تناوبی در توالی‌های S نوع II و توالی‌های STA هستند. پروتئین‌های نوع IV-B، که انتهای N آنها به سمت لومن قرار می‌گیرد، با توالی SA نوع III شروع شده و در پی آن تناوبی از توالی‌های SA و STA نوع II قرار می‌گیرد. نوع این پروتئین‌ها با تعداد متفاوت مارپیچ‌های α (زوج یا فرد) مشخص می‌شوند.

انتهای C در سیتوزول باقی می‌ماند (شکل b ۱۲-۱۳). یکی از تحقیقات جالب که نشان‌دهنده اهمیت باردار بودن توالی‌های مجاور در تعیین جهت‌گیری در غشاء است بر روی نورآمینیداز انجام گرفته است. نورآمینیداز پروتئین نوع II بوده و در سطح پوشش ویروس آنفلوآنزا وجود دارد. سه اسید آمینه آرژنین در انتهای N توالی اتصال سیگنال نورآمینیداز قرار دارد. جهش یافتن این سه اسید آمینه با بار مثبت به اسیدهای آمینه گلوتامات با بار منفی باعث می‌شود جهت‌گیری نورآمینیداز معکوس شود. تحقیقات مشابهی نشان داد جهت‌گیری پروتئین‌های دیگر در غشاء ER را که دارای جهت‌گیری نوع II و یا نوع III می‌باشند می‌توان با ایجاد جهش در اسیدهای آمینه باردار موجود در کنار قطعه داخلی اتصال سیگنال تغییر داد.

پروتئین‌های چندگذره دارای چندین توالی توپوژن هستند

شکل ۱۳-۱۳ آرایش توالی‌های توپوژن در پروتئین‌های عبورکننده از غشاء تک گذره و چند گذره را به صورت خلاصه آورده است. در پروتئین‌های چند گذره (نوع IV)، هر کدام از مارپیچ‌های α گذرنده از غشاء همان‌طوری که ذکر شد به عنوان توالی توپوژنیک عمل می‌کنند. آنها می‌توانند پروتئین را به ER هدایت نموده و باعث اتصال پروتئین در غشاء ER شوند و یا انتقال پروتئین از درون غشاء را متوقف نمایند. پروتئین‌های چند گذره براساس قرارگیری انتهای N در سمت سیتوزول یا فضای اگزوپلاسمی (مثلاً لومن ER، خارج سلول) به دو دسته تقسیم می‌شوند. این توپولوژی انتهای N معمولاً با قطعه آبگریز نزدیک انتهای N و بار توالی‌های مجاور آن تعیین

می‌گردد.

اگر یک پروتئین نوع IV تعداد زوجی مارپیچ α درون غشایی داشته باشد، هر دو انتهای C و انتهای N در یک طرف غشاء قرار می‌گیرند (شکل d ۱۳ـ۱۳). بر عکس اگر پروتئین نوع IV دارای تعداد فرد مارپیچ α باشد، دو انتهای آن جهت‌های مخالفی خواهند داشت (شکل e ۱۳ـ۱۳).

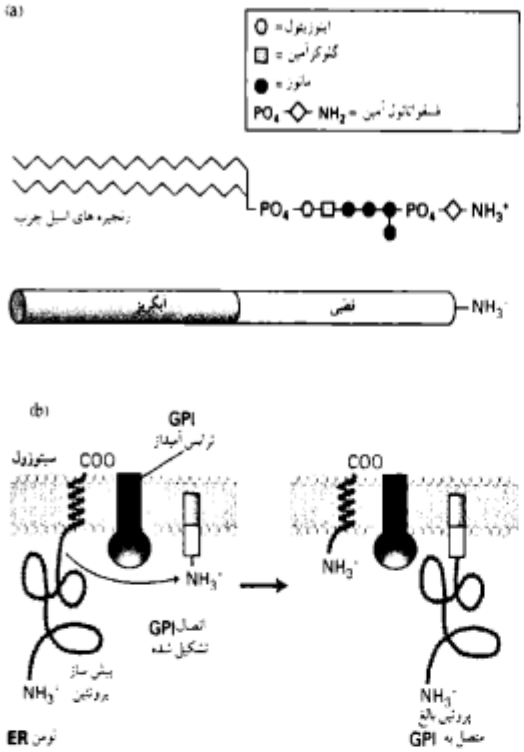
پروتئین‌های نوع IV با انتهای N در سیتوزول

در میان پروتئین‌های چند گذره که انتهای N آنها به سمت سیتوزول قرار می‌گیرد حامل‌های مختلف گلوکز (GLUT) و اغلب پروتئین‌های کانال یونی قرار می‌گیرند که در فصل ۱۱ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این پروتئین‌ها، قطعه آبگریز مجاور انتهای N، ورود زنجیره جدید را به غشاء ER با انتهای N به سمت سیتوزول آغاز می‌کند؛ بنابراین، این قطعه مارپیچ α همانند توالی داخلی اتصال سیگنال پروتئین‌های نوع II عمل می‌کند (شکل a ۱۲ـ۱۳ را ملاحظه کنید). هنگامی که زنجیره جدید به دنبال اولین مارپیچ α هلیکس طویل می‌شود، از میان ترانسلوکون عبور می‌کند، تا دومین مارپیچ α آبگریز شکل گیرد. این مارپیچ از بیرون‌زدگی بیشتر زنجیره جدید از ترانسلوکون جلوگیری می‌کند؛بنابراین عملکرد آن مشابه توالی اتصالی توقف انتقال در پروتئین‌های نوع I است (شکل ۱۱ـ۱۳).

بعد از سنتز دو مارپیچ α اوّل عبورکننده از غشاء، هر دو انتهای زنجیره جدید به سمت سیتوزول قرار گرفته و حلقه بین آنها به سمت لومن امتداد می‌یابد. سپس انتهای C زنجیره جدید مثل پروتئین‌های نوع I و III به رشد به سمت سیتوزول ادامه می‌دهد. براساس این مکانیسم، سومین مارپیچ α مثل یک توالی اتصال سیگنال نوع II و چهارمین مارپیچ α همانند یک توالی توقف انتقال عمل می‌کند (شکل d ۱۳ـ۱۳).

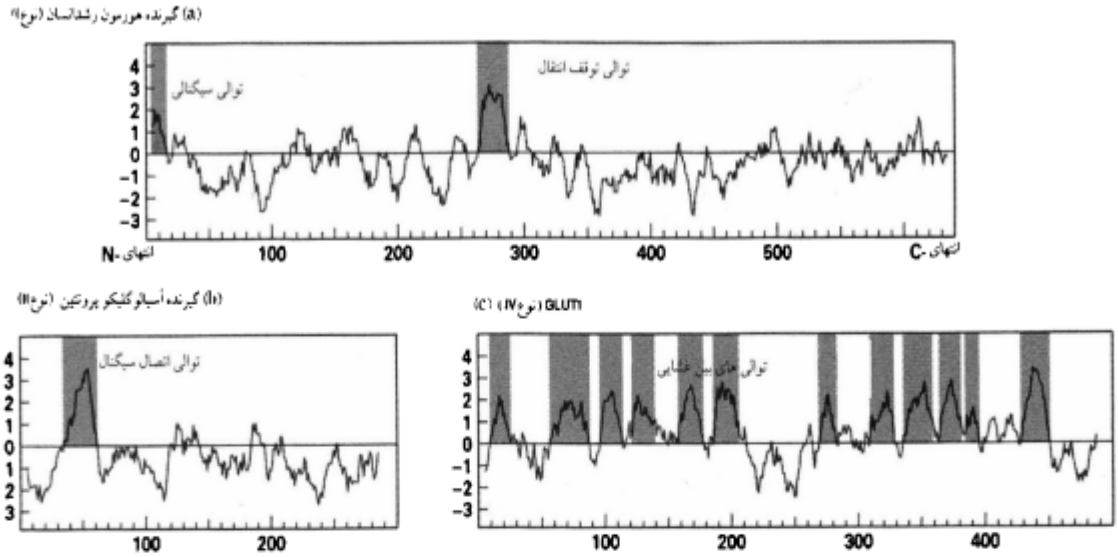
ظاهراً، وقتی اولین توالی توپوژن یک پلی‌پپتید چند گذره شروع به تجمع با ترانسلوکون می‌کند، ریبوزوم به‌طور متصل به ترانسلوکون باقی مانده، و توالی‌های توپوژنی که بعداً از ریبوزوم خارج می‌شوند بدون نیاز به SRP و گیرنده SRP به ترانسلوکون متصل می‌شوند.

آزمایشاتی که با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیب برای تعویض مارپیچ α آبگریز انجام شده، دیدگاه‌هایی در مورد عملکرد توالی‌های توپوژنیک در پروتئین‌های چند گذره تیپ IV-A ارائه داده است. این آزمایشات مشخص کرد که ترتیب مارپیچ‌های α آبگریز نسبت به همدیگر در یک زنجیره در حال رشد، به میزان



▲ **شکل ۱۳ـ۱۴** پروتئین‌های متصل شده با GPI. a) ساختار یک گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) از مخمر. بخش آبگریز مولکول از زنجیره‌های آسیل چرب تشکیل شده است در حالی که بخش قطبی (آبدوست) از دنبال‌های کربوهیدراتی و گروه‌های فسفات تشکیل شده است. در موجودات زنده دیگر، هم زنجیره‌های آسیل و هم بخش کربوهیدراتی ممکن است تا حدودی با ساختار نمایش داده شده، تفاوت داشته باشند. (b) تشکیل پروتئین‌های متصل شده با GPI در غشاء ER، همان‌طور که در شکل ۱۱ـ۱۳ نشان داده شده پروتئین سنتز شده و در ابتدا وارد غشاء ER می‌گردد. به‌طور همزمان یک ترانس آمیداز خاص، پروتئین پیش ساخته را در منطقه رو به سمت اگزوپلاسمی در نزدیکی توالی اتصالی توقف انتقال (قرمز) برش داده گروه کربوکسیل انتهای C جدید را به انتهای گروه آمینو در اتصال GPI انتقال می‌دهد.

زیادی تعیین می‌کند یک مارپیچ به عنوان یک توالی اتصال سیگنال عمل کند یا توالی اتصالی توقف انتقال. علاوه بر آبگریز بودن، توالی خاص اسید آمینه‌ای یک مارپیچ خاص، می‌تواند تأثیر اندکی بر عملکرد آن داشته باشد. بنابراین اولین مارپیچ α در انتهای N و دیگر مارپیچ‌های با شماره فرد به عنوان توالی‌های اتصال سیگنال عمل می‌کنند، در حالی که مارپیچ‌های با شماره زوج بینابینی به عنوان توالی اتصال توقف انتقال عمل می‌کنند.



▲ **شکل تجربی ۱۵ـ۱۳ پروفایل‌های هیدروپاتی:** پروفایل‌های هیدروپاتی می‌توانند توالی‌های توپوژنیک در پروتئین‌های پنتگرال غشایی را تعیین کنند. آنها با ترسیم آبگریز بودن هر قطعه از ۲۰ اسیدآمینه پشت سر هم در طول یک پروتئین، تولید می‌شوند. مقادیر مثبت نشان‌دهنده قسمت‌های نسبتاً آبگریز و مقادیر منفی قسمت‌های نسبتاً قطبی پروتئین هستند. توالی‌های توپوژن احتمالی علامت‌گذاری شده‌اند. پروفایل‌های پیچیده برای پروتئین‌های چندگذره (نوع IV)، مثل GLUT1 در قسمت (c). اغلب برای تعیین توپولوژی این پروتئین‌ها باید آنالیزهای دیگر نیز انجام شود.

پروتئین‌های نوع IV با انتهای N در فضای اگزوپلاسمی

خانواده بزرگی از گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین، که همگی آنها هفت مارپیچ α عبور کننده از غشاء دارند، معروف‌ترین پروتئین‌های نوع IV-B را تشکیل می‌دهند که انتهای N آنها به سمت فضای اگزوپلاسمی قرار می‌گیرد. در این پروتئین‌ها، مشابه توالی اتصال سیگنال نوع III، مارپیچ α آبگریز در مجاورت انتهای N بوده و به دنبال آن دسته‌ای از اسیدهای‌آمینه با بار مثبت قرار می‌گیرند (شکل b ۱۲ـ۱۳). در نتیجه، اولین مارپیچ α زنجیره پروتئینی جدید را با انتهای N قرار گرفته به سمت لومن، به ترانسلوکون وارد می‌کند (شکل e ۱۳ـ۱۳). در حین طویل شدن زنجیره دقیقاً به همان ترتیبی که در مورد پروتئین‌های نوع IV-A توضیح داده شد زنجیره توسط تناوبی از توالی‌های اتصال سیگنال نوع II و توالی‌های توقف انتقال به غشاء ER وارد می‌شود.

اتصال از طریق فسفولیپید برخی پروتئین‌های سطح سلول را به غشاء متصل می‌کند

برخی از پروتئین‌های سطحی سلول به جای توالی اسیدهای‌آمینه آبگریز از طریق پیوند کووالان با یک مولکول آمفی‌پاتیک یا همان، **گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول**[1] **(GPI)** به دو لایه فسفولیپیدی متصل می‌شوند. (شکل a ۱۴ـ۱۳ و فصل ۱۰). این پروتئین‌ها، سنتز شده و در ابتدا دقیقاً مشابه با پروتئین‌های عبورکننده از غشاء نوع I به غشاء ER، (با یک توالی سیگنالی انتهای N برش خورده و توالی اتصال داخلی توقف انتقال که فرآیند قرارگیری در غشاء را هدایت می‌کنند) متصل می‌شوند (شکل ۱۱ـ۱۳).

با این حال، یک توالی کوتاه اسیدآمینه‌ای در منطقه لومن، مجاور منطقه گذرنده از غشاء، توسط یک ترانس‌آمیداز واقع در غشاء ER تشخیص داده می‌شود. این آنزیم به‌طور همزمان توالی اصلی اتصال توقف را برش زده و قسمت لومنی پروتئین را به GPI متصل در غشاء منتقل می‌کند (شکل b ۱۴ـ۱۳).

چرا یک نوع اتصال غشایی با یکی دیگر جایگزین می‌شود؟ اتصال به GPI که باعث حذف ناحیه آبدوست در سمت سیتوزول از پروتئین می‌شود، می‌تواند پیامدهایی داشته باشد. پروتئین‌های متصل شده با GPI، برای مثال، می‌توانند به سرعت در منطقهٔ غشاء دولایه فسفولیپیدی منتشر شوند. بر خلاف این، خیلی از پروتئین‌های متصل شده با مارپیچ α گذرنده از غشاء نمی‌توانند به صورت جانبی در غشاء حرکت کنند چون قطعات به سمت سیتوزول آنها با اسکلت سلول میانکنش می‌دهند. علاوه بر این همان‌طور که در

1- Glycosiphos phatidy linosieol

فصل ۱۴ بحث خواهیم کرد، اتصال با GPI در برخی سلول‌های اپی‌تلیالی قطبی شده، پروتئین متصل شده را به سمت منطقه رأسی غشاء پلاسمایی جهت‌دهی می‌کند.

توپولوژی یک پروتئین غشایی را اغلب می‌توان از روی توالی آن تخمین زد

همان‌طور که دیدیم، توالی‌های توپوژن مختلفی در پروتئین‌های پنتگرال سنتز شده در ER، در میانکنش‌های میان زنجیره جدید با ترانسلوکون تأثیر می‌گذارند. وقتی دانشمندان در مورد یک پروتئین با عملکرد ناشناخته شروع به مطالعه می‌کنند، شناسایی توالی‌های توپوژن بالقوه در توالی ژنی مربوطه، می‌تواند کمک شایانی در مورد عملکرد و گروه توپولوژیکی پروتئین فراهم آورد. برای مثال فرض کنید که ژنی برای پروتئینی شناخته شده مورد نیاز در مسیر سیگنال‌دهی سلول، شامل توالی‌های نوکلئوتیدی است که توالی سیگنالی انتهای N و توالی آبگریز داخلی را رمزدهی می‌نماید. این یافته‌ها بیان می‌کند که این پروتئین یک پروتئین پنتگرال غشایی نوع I است و در نتیجه ممکن است برای یک لیگاند خارج سلولی یک گیرنده سطح سلولی باشد.

شناسایی یک توالی توپوژن نیاز به روشی دارد تا منابع اطلاعاتی در مورد توالی قطعاتی را که به اندازه کافی آبگریز بوده و توالی سیگنالی یا توالی اتصالی عبور کننده از غشاء را بررسی کند. توالی‌های توپوژن را معمولاً می‌توان با کمک برنامه‌های کامپیوتری که یک **نقشه هیدروپاتی**[1] برای پروتئین مورد نظر می‌سازند، شناسایی کرد. مرحله اول تخصیص یک مقدار شناخته شده به عنوان **شاخص هیدروپاتی**[2] برای هر اسید آمینه در پروتئین است. طبق قرارداد اسیدهای‌آمینه آبگریز مقادیر مثبت و اسیدهای‌آمینه آبدوست مقادیر منفی دارند. هر چند مقیاس‌های متفاوتی برای شاخص هیدروپاتیک وجود دارد، همه مقادیر مثبت را به اسیدهای‌آمینه با زنجیره جانبی ساخته شده از هیدروکربن (مثلاً فنیل آلانین و میتونین) و اغلب مقادیر منفی را به اسیدهای‌آمینه باردار (برای مثال آرژنین و آسپارتات) تخصیص می‌دهند. گام دوم تعیین و شناسایی قطعات بلندتر با مقدار آبگریزی لازم برای توالی سیگنال انتهای N یا توالی توقف انتقال داخلی یا توالی‌های توقف انتقال و توالی‌های اتصال سیگنال است. برای انجام این کار، شاخص هیدروپاتی برای هر قطعه ساخته شده از ۲۰ اسیدآمینه پشت سر هم در طول کل پروتئین محاسبه می‌شود. نمودار این مقادیر محاسبه شده علیه موقعیت این اسیدهای‌آمینه در توالی، باعث به دست آمدن **پروفایل هیدروپاتی** می‌گردد.

شکل ۱۵ـ۱۳ پروفایل هیدروپاتی برای سه پروتئین غشایی مختلف را نشان می‌دهد. قله‌های شاخص در چنین نمودارهایی توالی‌های توپوژنیک و هم چنین موقعیت و طول تقریبی آنها را نشان می‌دهند. برای مثال، پروفایل هیدروپاتی گیرنده هورمون رشد انسان هم نشان‌دهنده حضور توالی سیگنال آبگریز در انتهای N پروتئین و توالی توقف انتقال آبگریز داخلی است. (شکل a ۱۵ـ۱۳). براساس این نقشه، ما می‌توانیم به درستی نتیجه بگیریم که گیرنده هورمون رشد انسان یک پروتئین پنتگرال غشایی نوع I است. پروفایل هیدروپاتی گیرنده آسیالوگلیکو پروتئین، (یک پروتئین سطح سلولی که حذف گلیکو پروتئین‌های خارج سلولی غیرطبیعی را میانجیگری می‌کند) یک توالی اتصال سیگنال آبگریز داخلی را نشان می‌دهد اما هیچ نشانه‌ای از توالی سیگنالی انتهای N نشان نمی‌دهد (شکل b ۱۵ـ۱۳). در نتیجه ما می‌توانیم حدس بزنیم گیرنده آسیالوگلیکو پروتئین یک پروتئین غشایی نوع II یا نوع III است. پراکندگی اسیدهای آمینه باردار در دو طرف توالی اتصال سیگنال اغلب می‌تواند بین این دو احتمال تمایز ایجاد کند، چون اسیدهای‌آمینه با بار مثبت که در کنار قطعه عبورکننده از غشاء واقع شده‌اند معمولاً به سمت سیتوزولی غشاء جهت‌گیری می‌کنند. به‌طور مثال، در مورد گیرنده آسیالوگلیکو پروتئین آزمایش اسیدهای آمینه مجاور توالی اتصال سیگنال نشان داد که این اسیدهای آمینه در سمت انتهای N دارای یک بار خالص مثبت هستند، بنابراین به درستی می‌توان حدس زد این پروتئین یک پروتئین نوع II است.

نقشه هیدروپاتی GLUT1 حامل گلوکز (یک پروتئین چند گذره)، نشان‌دهنده حضور قطعات زیادی است که به اندازه کافی آبگریز هستند تا بتواند مارپیچ‌های عبور کننده از غشاء را تشکیل دهند (شکل c ۱۵ـ۱۳). پیچیدگی این پروفایل بیان‌کننده وجود مشکل در شناسایی دقیق تمام قطعات عبورکننده از غشاء در یک پروتئین چند گذره و در پیشگویی توپولوژی هر کدام از توالی‌های اتصال سیگنال و توقف انتقال می‌باشد. الگوریتم‌های پیشرفته‌تر کامپیوتری قدرت محاسبه حضور اسیدهای‌آمینه با بار مثبت در مجاورت قطعات آبگریز داده و همچنین ما را قادر به محاسبه طول قطعات و فضای بین آن‌ها می‌کند. با استفاده از تمامی این اطلاعات، بهترین الگوریتم‌ها می‌توانند توپولوژی پیچیده یک پروتئین چند گذره را با دقت بیش از ۷۵ درصد، تخمین بزنند.

1- Hydropathic protile 2 Hydropathic Index

در نهایت، همولوژی توالی با یک پروتئین شناخته شده ممکن است به ما این امکان را بدهد که در مورد توپولوژی یک پروتئین چند گذره تازه کشف شده پیشگویی صحیحی انجام بدهیم. برای مثال، ژنوم موجودات زنده پر سلولی تعداد بسیار زیادی از پروتئین‌های چند گذره با هفت مارپیچ عبورکننده از غشاء را رمزدهی می‌کنند ـ شباهت‌ها بین توالی‌های این پروتئین‌ها با قدرت بیان می‌کند که همگی توپولوژی مشابه با گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین دارند، بطوریکه انتهای N به سمت اگزوپلاسمی غشاء و انتهای C به سمت سیتوزولی آن جهت‌گیری می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۳

ورود پروتئین‌ها به داخل غشاء ER

■ پروتئین‌های غشایی اینتگرال سنتزشده بر روی ER خشن به چهار کلاس توپولوژیکی و یک نوع متصل به غشاء تقسیم می‌شوند.

■ توالی‌های توپوژنیک (توالی‌های سیگنال انتهای N. توالی‌های داخلی اتصالی - توقف انتقال و توالی‌های داخلی اتصال سیگنال) ورود و جهت‌گیری پروتئین تازه سنتز شده را در غشاء ER هدایت می‌کنند. این جهت‌گیری در طی انتقال پروتئین غشایی کامل شده به مقصد نهایی خود، باقی می‌ماند.

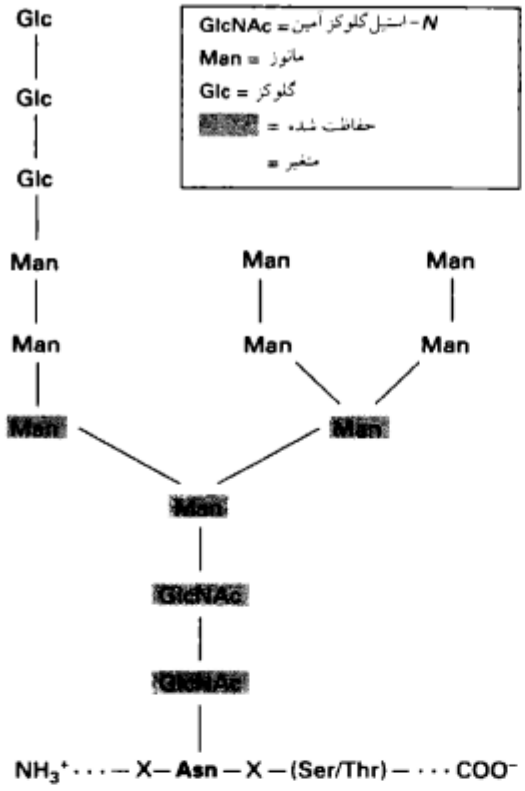
■ پروتئین‌های غشایی یک گذره حاوی یک یا دو توالی توپوژنیک هستند. در پروتئین‌های غشایی چند گذره، هر قطعه مارپیچ α بسته به موقعیت خود در زنجیره پلی‌پپتید و حضور اسیدهای آمینه با بار مثبت مجاور، به عنوان توالی توپوژنیک درونی عمل می‌نماید (شکل ۱۳-۱۳ راملاحظه کنید).

■ بعضی از پروتئین‌های سطح سلول در اول به صورت پروتئین‌های نوع I در ER سنتز و سپس بریده شده و با دُمین لومینال به روی GPI منتقل می‌شوند.

■ توپولوژی پروتئین‌های غشایی اغلب توسط برنامه‌های کامپیوتری به درستی پیش‌بینی می‌شوند. این برنامه‌های کامپیوتری قطعات توپوژنیک آبگریز را در درون توالی اسید آمینه‌ای شناسایی کرده و پروفایل هیدروپاتی را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۵-۱۳ را ملاحظه کنید).

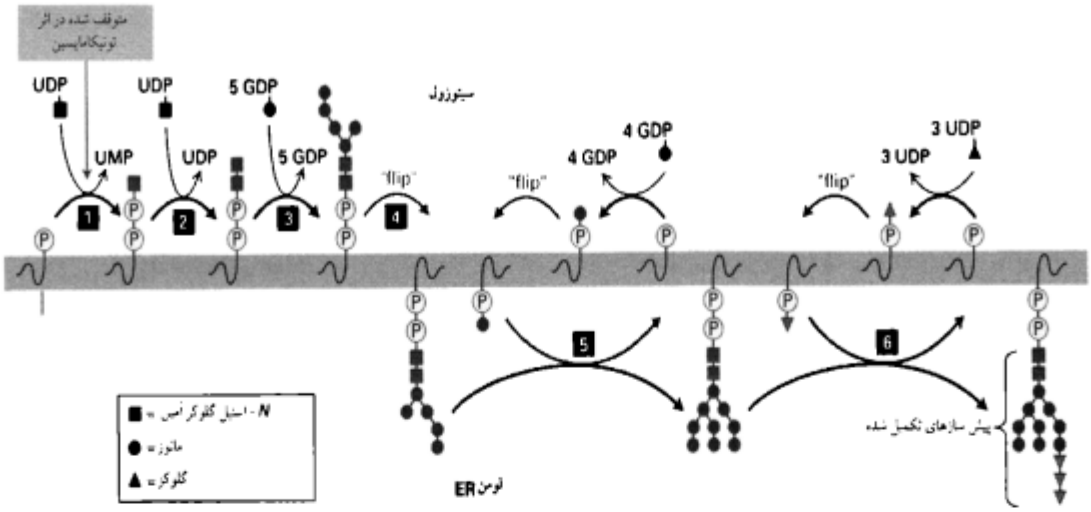
۱۳-۳ تغییرات، تاخوردن و کنترل کیفیت پروتئین در ER

غشاء و پروتئین‌های ترشحی محلول سنتز شده در ER خشن



▲ **شکل ۱۳-۱۶ (شکل رنگی) پیش‌ساز رایج در الیگوساکاریدهای متصل به ـ N.** این پیش‌ساز اتصال به N، الیگوساکاریدی با ۱۴ واحد تندی در شبکه آندوپلاسمی خشن به پروتئین جدید اضافه می‌شود. حذف و یا در مواردی اضافه شدن واحدهای قندی خاص در مراحل بعدی در ER و کمپلکس گلژی صورت می‌گیرد. هسته این الیگوساکارید، متشکل از پنج دنباله است که به رنگ ارغوانی نشان داده شده و در تمامی الیگوساکاریدهای متصل به N حفظ شده‌اند. پیش‌ساز می‌تواند تنها به اسید آمینه آسپاراژین (Asn) متصل شود که با یک اسید آمینه (X) از یک سرین (Ser) یا ترئونین (Thr) در سمت کربوکسیل، جدا شده است.

قبل از این که به مقصد نهایی خود برسند. چهار تغییر اساسی: (۱) اضافه شدن کووالان و پردازش کربوهیدرات‌ها (گلیکولیزه شدن) در ER و گلژی (۲) تشکیل پیوند دی‌سولفید در ER (۳) تاخوردن مناسب زنجیره‌های پلی‌پپتیدی و تجمع صحیح پروتئین‌های چند زیر واحدی در ER و (۴) برش‌های پروتئولیزی خاص در ER، گلژی و وزیکول‌های ترشحی را پشت سر می‌گذارند. به‌طور کلی گفته می‌شود، این تغییرات باعث تاخوردن پروتئین‌های ترشحی به ساختار طبیعی و هم چنین باعث پایداری ساختاری پروتئین‌های در معرض محیط خارج سلولی می‌گردد. تغییراتی همچون گلیکوزیله شدن، به سلول این اجازه را می‌دهد که آرایش‌های متنوعی از



▲ **شکل ۱۷-۱۳ بیوسنتز پیش‌ساز الیگوساکاریدی.** دولیکول فسفات یک چربی به شدت آبگریز است. حاوی ۹۵-۷۵ اتم کربن بوده و در غشاء ER جای گرفته است. دو N - استیل گلوکزآمین (GlcNAc) و پنج مانوز در یک مرحله به دولیکول فسفات، در سطح سیتوزولی از غشاء ER اضافه می‌شوند (مراحل ❸ و ❶). دهنده‌های نوکلئوتید - قند در این واکنش‌ها و واکنش‌های بعدی در سیتوزول سنتز می‌شوند. قابل ذکر است که اولین واحد قندی با پیوند پیروفسفاتی پر انرژی به دولیکول متصل می‌شود. تونیکاماسین که اولین آنزیم را در مسیر متوقف می‌کند، از سنتز الیگوساکاریدهای متصل به N در سلول ممانعت می‌کند. بعد از چرخش دولیکول پیروفسفریل با هفت واحد قندی به سمت لومن (مرحله ❹) چهار مانوز باقی مانده و تمام سه واحد گلوکزی یک باره به آن اضافه می‌شوند (مراحل ❻ و ❺). در واکنش‌های بعدی، قندی که باید اضافه شود در ابتدا از یک نوکلئوتید - قند به حامل دولیکول فسفات بر روی سطح سیتوزولی ER منتقل می‌شود؛ سپس حامل به سمت لومنی چرخیده و در آنجا قند به الیگوساکارید در حال سنتز منتقل می‌شود و پس از آن حامل «خالی» دوباره به سمت سیتوزولی بر می‌گردد.

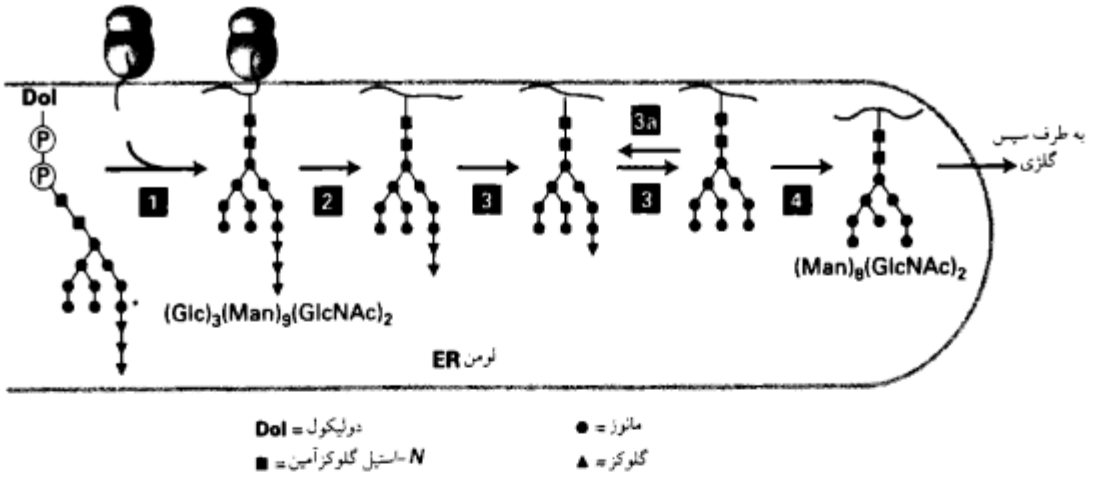
مولکول‌های متمایز از لحاظ شیمیایی را در سطح سلول تولید کنند که آنها پایه و اساس میانکنش‌های مولکولی ویژه در چسبندگی و ارتباطات سلول به سلول هستند.

یک یا چندین زنجیره کربوهیدرات به بسیاری از پروتئین‌هایی که در ER خشن سنتز می‌شوند اضافه می‌گردد؛ در واقع، گلیکوزیله شدن، تغییر شیمیایی اصلی اکثر این پروتئین‌هاست. پروتئین به همراه کربوهیدرات متصل را به عنوان **گلیکوپروتئین** می‌نامند. زنجیره کربوهیدراتی موجود درگلیکوپروتئین ممکن است که به گروه هیدروکسیل در اسید آمینه سرین و یا ترئونین و یا به نیتروژن‌آمید در آسپاراژین متصل شوند. این‌ها به ترتیب **الیگوساکاریدهای متصل به O**[1] **و الیگوساکاریدهای متصل به N**[2] نامیده می‌شوند. انواع مختلف الیگوساکاریدهای متصل به O شامل زنجیره‌های متصل به O نوع موسین (به خاطر فراوانی این نوع گلیکوپروتئین‌ها در موکوس) و تغییرات کربوهیدرات‌ها در پروتئوگلیکان‌ها است که در فصل ۱۹ توضیح داده شده است. زنجیره‌های متصل به O نوعاً یک تا چهار واحد قندی داشته و توسط آنزیم‌هایی به نام گلیکوزیل ترانسفراز که در لومن کمپلکس گلژی قرار دارند، به پروتئین اضافه می‌گردند. الیگوساکاریدهای متصل به N رایج‌تر، بزرگ‌تر و پیچیده‌تر بوده و در پستانداران به چندین شاخه تقسیم می‌شوند. در این قسمت بر روی الیگوساکاریدهای متصل به N صحبت می‌کنیم که سنتز ابتدایی آنها در ER صورت می‌گیرد. بعد از گلیکوزیله شدن ابتدایی در ER، زنجیر الیگوساکاریدی در ER معمولاً در گلژی تغییر می‌یابد.

تشکیل پیوند دی‌سولفید، تا خوردن پروتئین و تجمع پروتئین‌های چند زیر واحدی که فقط در ER خشن انجام می‌گیرد نیز در این قسمت توضیح داده می‌شود. فقط پروتئین‌های درست تاخورده و صحیح تجمع یافته از ER خشن به گلژی و در آخر به سطح سلول یا مقصد نهایی دیگر منتقل می‌شوند. پروتئین‌های تانخورده، بد تاخورده یا نیمه تاخورده و تجمع یافته نامناسب، به صورت انتخابی در ER خشن نگه داشته می‌شوند. در قسمت نهایی

1- O - linked oligosaccharides

2- N - linked oligosaccharides



▲ **شکل ۱۸ـ۱۳ اضافه شدن و پردازش ابتدایی الیگوساکاریدهای متصل به ـ N.** در ER خشن سلول‌های مهره‌داران، به محض ورود آسپاراژین مستعد به لومن ER، پیش‌ساز $(GlcNAc)_2$ و Glc_3Man از حامل دولیکول به روی آن در روی پروتئین در حال سنتز منتقل می‌شود، (مرحله ❶). در سه واکنش جداگانه، اول یک واحد گلوکز (مرحله ❷)، بعد دو واحد گلوکز (مرحله ❸)، و در نهایت یک واحد مانوز (مرحله ❹)، حذف می‌شوند. اضافه شدن دوباره یک واحد گلوکز (مرحله ❸a) در تا خوردگی صحیح خیلی از پروتئین‌ها در ER نقش بازی می‌کند، که به آن خواهیم پرداخت.

این بخش نیز در مورد «کنترل کیفیت» و برخی خصوصیات آن صحبت خواهیم کرد.

همان‌طور که پیش از این گفته شد، توالی‌های سیگنالی ER در انتهای N از پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های نوع I غشایی در ER برش داده می‌شوند. برخی پروتئین‌ها نیز در کمپلکس گلژی یا وزیکول‌های ترشحی متحمل برش‌های دیگری می‌شوند. ما در فصل بعد در مورد این برش‌ها و هم چنین تغییرات کربوهیدراتی که به صورت ابتدایی یا انحصاری در کمپلکس گلژی صورت می‌گیرد، بحث خواهیم کرد.

یک الیگوساکارید پیش ساخته متصل به N به خیلی از پروتئین‌ها در ER خشن اضافه می‌گردد

بیوسنتز تمامی الیگوساکاریدهای متصل به N در ER خشن با اضافه شدن یک پیش‌ساز الیگوساکاریدی حاوی ۱۴ واحد قندی شروع می‌شود (شکل ۱۶ـ۱۳). ساختار این پیش‌ساز در گیاهان، جانوران و یوکاریوت‌های تک سلولی یکسان بوده و یک الیگوساکارید شاخه‌دار حاوی سه گلوکز (Glc)، نه مانوز (Man)، و دو N ـ استیل گلوکز آمین $(GlcNAc)_2$ می‌باشد. وقتی این الیگوساکارید به پروتئین اضافه می‌شود، ساختار کربوهیدرات شاخه‌دار با حذف یا اضافه شدن مونوساکاریدها در ER و اجزاء گلژی، تغییر می‌یابد. تغییرات در زنجیره‌های متصل به N از یک گلیکوپروتئین به گلیکوپروتئین دیگر و از یک موجود به موجود دیگر متفاوت است، اما یک هسته ۵ تایی از ۱۴ واحد قندی در ساختار تمامی الیگوساکاریدها در پروتئین‌های ترشحی و غشایی حفظ شده است.

پیش از انتقال به زنجیره جدید در لومن ER، پیش‌ساز الیگوساکارید بر روی لنگر متصل به غشاء به نام **دولیکول فسفات**[1] که یک زنجیره طویل از لیپید پلی‌ایزوپرنوئید است، تجمع می‌یابد (فصل ۱۰). بعد از این که اولین قند (GlcNac) توسط پیوند پیروفسفات به دولیکول فسفات متصل شد، بقیه قندها با پیوندهای گلیکوزیدی اضافه می‌شوند، این پیوندها با یکسری واکنش‌های پیچیده کاتالیز شده با آنزیم‌های متصل به سطح لومنی یا سیتوزولی غشاء ER خشن انجام می‌شوند (شکل ۱۷ـ۱۳). آخرین دولیکول پیروفسفوریل الیگوساکارید به صورتی جهت‌گیری می‌کند که الیگوساکارید در سمت لومن ER قرار گیرد.

تمام ۱۴ ـ واحد قندی پیش‌ساز به موازات ظاهر شدن در سمت لومن ER، از حامل دولیکول به رزیدوی آسپاراژین بر روی زنجیره پلی‌پپتیدی جدید منتقل می‌شوند. (شکل ۱۸ـ۱۳، مرحله 1). فقط رزیدوی آسپاراژین در توالی سه پپتیدی Asn-X-Ser و Asn-X-Thr (که در آن X هر اسیدآمینه‌ای غیر از پرولین می‌تواند باشد) سوبسترای آنزیم کاتالیزکننده این واکنش یعنی **الیگوساکاریل ترانسفراز**[2] هستند. دو زیرواحد از سه زیرواحد این آنزیم، پروتئین‌های غشایی ER بواه و دُمین رو به سیتوزول آنها به ریبوزوم متصل شده و باعث می‌شود، زیر واحد سوم از ترانسفراز (زیر واحد

1- Dolichol phosphate

2- Oligosaccharyl transferase

کاتالیزوری) نزدیک زنجیره پلی‌پپتید در حال سنتز در لومن ER واقع شود. تمام توالی‌های Asn-X-Ser/Thr گلیکوزیله نمی‌شوند و ممکن نیست که بتوان تنها از روی توالی اسیدآمینه‌ای حدس زد کدام مناطق بالقوه متصل به ـ N، گلیکوزیله خواهند شد. برای مثال، تا خوردن سریع یک قطعه از پروتئین حاوی توالی Asn-X-Ser/Thr ممکن است مانع از انتقال پیش‌ساز الیگوساکاریدی به روی آن شود.

بلافاصله پس از این که پیش‌ساز، $(GlcNAc)_2$ و Glc_3Man)، به پلی‌پپتید جدید منتقل شد، سه آنزیم مختلف که گلیکوزیداز نامیده می‌شوند، سه گلوکز و یک مانوز خاص را حذف می‌کنند (شکل ۱۸ـ۱۳، مراحل ❹ و ❷). سه واحد گلوکزی (که آخرین واحدهای قندی که طی سنتز پیش‌ساز بر روی حامل دولیکول، به آن اضافه می‌شوند)، به نظر می‌رسد همانند سیگنالی عمل می‌کنند که این امر نشان می‌دهد الیگوساکارید کامل شده و آماده انتقال به پروتئین است.

زنجیره‌های جانبی الیگوساکاریدی ممکن است باعث تاخوردگی و پایداری گلیکوپروتئین گردند

گلیکوساکاریدهای متصل به گلیکوپروتئین‌ها، عملکردهای مختلفی دارند. برای مثال، برخی پروتئین‌ها به الیگوساکاریدهای متصل به N نیاز دارند تا به‌طور مناسب در ER تابخورند. این عملکرد در مطالعه با آنتی‌بیوتیک تونیکامایسین[1] اثبات شد. تونیکامایسین اولین مرحله تشکیل پیش‌ساز الیگوساکارید متصل به دولیکول را بلوکه کرده و در نتیجه سنتز تمام الیگوساکاریدهای متصل به N را در سلول مهار می‌کند. (شکل ۱۷ـ۱۳). در حضور تونیکامایسین، پپتید پیش‌ساز هماگلوتینین (HA_0) سنتز می‌شود، اما نمی‌تواند به خوبی تاخوردگی پیدا کند و یک تریمر طبیعی بسازد؛ در این حالت، پروتئین با تاخوردگی ناقص در ER خشن باقی می‌ماند. به علاوه جهش یک آسپاراژین خاص در توالی HA به گلوتامین، از اضافه شدن الیگوساکارید متصل به N به آن مکان جلوگیری نمود و باعث می‌شود پروتئین در حالت تانخورده در ER تجمع یابد.

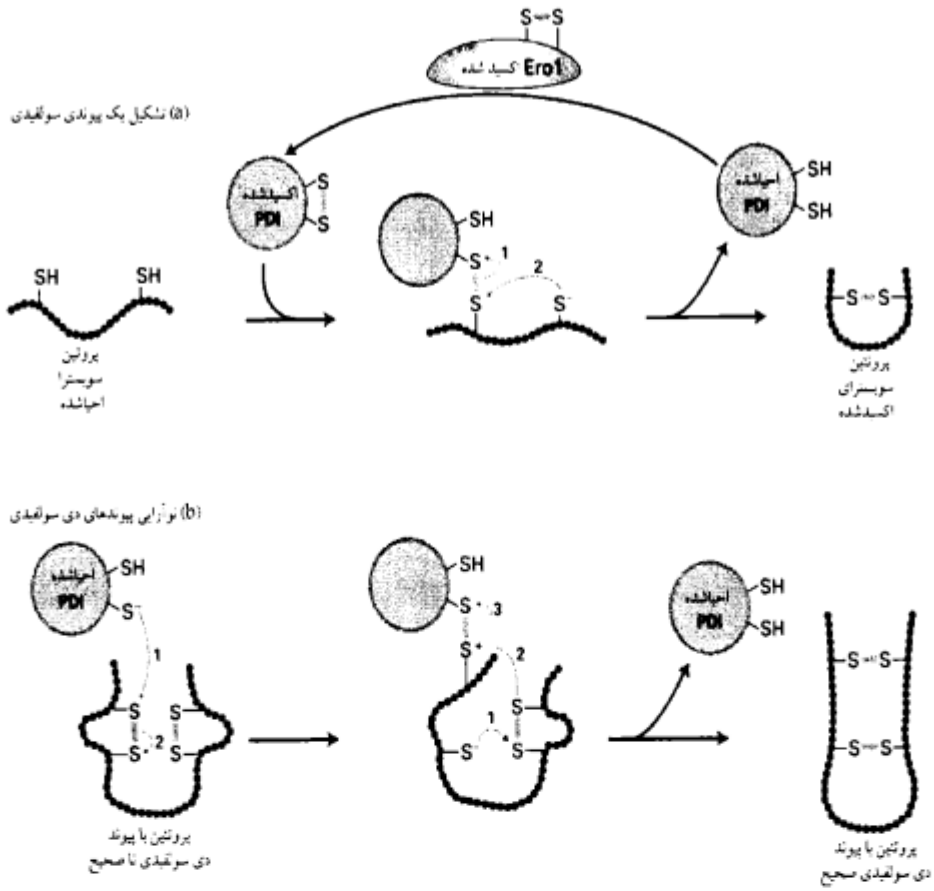
علاوه بر پیشبرد تاخوردگی صحیح، الیگوساکاریدهای متصل به N، هم چنین موجب ایجاد پایداری در خیلی از گلیکوپروتئین‌های ترشحی می‌شوند. حتی اگر اضافه شدن تمام الیگوساکاریدهای متصل به N برای مثال با تونیکامایسین متوقف شود خیلی از پروتئین‌های ترشحی به‌طور مناسب تا می‌خورند و به مقصد نهایی خود منتقل می‌شوند با این حال، چنین پروتئین‌های گلیکوزیله نشده‌ای کم‌تر از اشکال گلیکوزیله پایدار هستند. برای مثال، فیبرونکتین گلیکوزیله شده، یک ترکیب رایج ماتریکس خارج سلولی، خیلی آرام‌تر از فیبرونکتین گلیکوزیله نشده توسط پروتئاز بافتی تجزیه می‌شود.

الیگوساکاریدها همچنین در گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی در چسبندگی سلول ـ سلول نقش دارند. مثلاً غشاء پلاسمایی سلول‌های سفید خون (لوکوسیت‌ها) دارای مولکول‌های چسبنده سلولی (CAM) هستند که به میزان زیادی گلیکوزیله شده‌اند. الیگوساکاریدها در این مولکول‌ها با ناحیه متصل شونده به قند در تعدادی از CAMها که در سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی یافت می‌شوند، میانکنش می‌دهند. این میانکنش لوکوسیت‌ها را به اندوتلیوم پیوند داده و به حرکت آنها به بافت‌ها در طی پاسخ به یک عفونت حاد کمک می‌کند (شکل ۳۶ـ۱۹ را ملاحظه کنید). دیگر گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی دارای زنجیره جانبی گلیکوپروتئینی بوده و موجب القای پاسخ ایمنی می‌شوند. یک مثال متداول، آنتی‌ژن‌های گروه خونی A، B و O است که الیگوساکاریدهای متصل به ـ O هستند که به گلیکو پروتئین‌ها و گلیکوپپتیدها در سطح اریتروسیت‌ها و دیگر انواع سلول‌ها متصل می‌شوند (شکل ۲۰ـ۱۰ را ملاحظه کنید).

پیوندهای دی‌سولفیدی بوسیله پروتئین‌ها در لومن ER تشکیل و نوآرایی می‌شوند

در فصل سوم دیدیم **پیوندهای دی‌سولفید (-S-S-)** بین مولکولی و درون مولکولی باعث پایداری ساختار سوم و چهارم خیلی از پروتئین‌ها می‌شود. این پیوندهای کووالان با پیوند اکسیداتیو **گروه‌های سولفیدریل (-SH)** که به نام گروههای تیول نیز شناخته می‌شوند بین دو اسید آمینه سیستئین در یک زنجیره پلی‌پپتیدی یا زنجیرهٔ دیگر تشکیل می‌شوند. این واکنش زمانی می‌تواند به‌طور خود به‌خود صورت گیرد که اکسیدکننده مناسب حضور داشته باشد. در سلول‌های یوکاریوت، پیوندهای دی‌سولفیدی تنها در لومن ER خشن تشکیل می‌شوند؛ در سلول‌های باکتریایی پیوندهای دی‌سولفیدی در فضای پری‌پلاسمی و بین غشاهای داخلی و خارجی شکل می‌گیرد. در نتیجه پیوندهای دی‌سولفیدی تنها در پروتئین‌های ترشحی و در مناطق اگزوپلاسمی پروتئین‌های غشایی یافت می‌شوند.

1- Tunicamycin



▲ **شکل ۱۹ـ۱۳(شکل رنگی) عمل پروتئین دی‌سولفید ایزومراز (PDI).** PDI توسط یک جایگاه فعال با دو اسید آمینه سیستئین نزدیک به هم که به آسانی به دو فرم احیا شده دی‌تیول و فرم دی‌سولفیدی اکسید شده قابل تبدیل هستند، پیوندهای دی‌سولفیدی را تشکیل و نوآرایی می‌کند. پیکان‌های شماره‌دار رنگی توالی انتقالی الکترونی را نشان می‌دهد. خطوط زرد نشان‌دهنده پیوندهای دی‌سولفیدی هستند. (a) در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، فرم یونیزه شده (-S-) تیول سیستئین در پروتئین سوبسترا با پیوند (S-S) دی‌سولفید در PDI اکسید شده واکنش می‌دهد تا حد واسط سوبسترای پروتئین ـ PDI با پیوندهای دی‌سولفیدی را تشکیل دهد. سپس دومین تیول یونیزه در سوبسترا با حد واسط واکنش داده، یک پیوند دی‌سولفیدی در پروتئین سوبسترا را تشکیل داده و PDI احیا شده را آزاد می‌کند. PDI، در عوض، الکترون‌ها را به پیوند دی‌سولفیدی در پروتئین لومنی Ero1 منتقل می‌کند، و در نتیجه دوباره فرم اکسیده شده PDI تولید می‌شود. (b) PDI احیا شده می‌تواند نوآرایی پیوندهای نامناسب دی‌سولفیدی را با واکنش‌های انتقال تیول ـ دی‌سولفیدی مشابه، کاتالیز کند. در این حالت، PDI احیا شده هم آغازکننده واکنش است و هم در این مسیر واکنش دوباره تولید می‌شود. این واکنش‌ها آنقدر ادامه پیدا می‌کنند تا پروتئین به پایدارترین شکل فضایی مناسب خود برسد.

پروتئین‌های سیتوزولی و پروتئین‌های اندامکی که در ریبوزوم‌های آزاد سنتز می‌شوند فاقد پیوندهای دی‌سولفیدی بوده و پایداری ساختاری آنها به میانکنش‌های دیگر بستگی دارد.

تشکیل مؤثر پیوندهای دی‌سولفیدی در لومن ER به آنزیم **پروتئین دی‌سولفید ایزومراز**[1] (PDI) وابسته است، که در تمام سلول‌های یوکاریوت وجود دارد. این آنزیم به ویژه در ER سلول‌های ترشحی و در اندام‌هایی مثل کبد و پانکراس یافت می‌شوند در این اندام‌ها مقادیر زیادی از پروتئین‌های حاوی پیوندهای دی‌سولفیدی تولید می‌شوند. همان‌طور که در شکل a ۱۹ـ۱۳ نشان داده شده است، پیوند دی‌سولفیدی در جایگاه فعال PDI به راحتی می‌تواند با دو واکنش انتقالی متوالی تیول ـ دی‌سولفید به پروتئین منتقل گردد. PDI احیایی تولید شده در این واکنش با عمل پروتئین موجود در ER به نام Erol (که حامل یک پیوند دی‌سولفیدی بوده و این پیوند می‌تواند به PDI منتقل شود)، به حالت اکسید شده بر می‌گردد. خود Erol در اثر واکنش با اکسیژن مولکولی موجود در در ER اکسیده می‌شود.

1- Protein Disulfide Isomerase

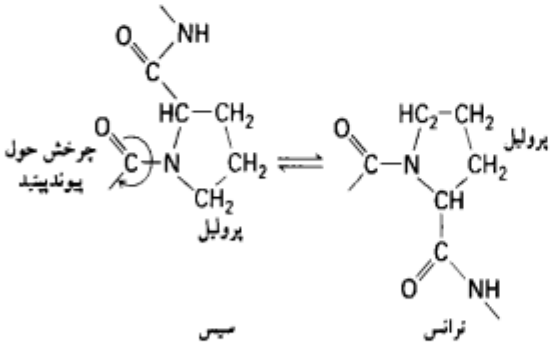
در پروتئین‌هایی که بیش از یک پیوند دی‌سولفیدی دارند، جفت شدن مناسب اسیدهای آمینه سیستئین برای ساختار و فعالیت مناسب، لازم هستند. پیوندهای دی‌سولفیدی معمولاً بین سیستئین‌های پشت سر هم در توالی اسیدآمینه‌ای و حین سنتز پلی‌پپتید در ریبوزوم تشکیل می‌شوند. اما گاهی اوقات این امر باعث ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی بین سیستئین‌های اشتباه می‌شود. برای مثال، پروانسولین، پیش ساز هورمون انسولین، سه پیوندی دی سولفیدی دارد که سیستئین‌های ۱ و ۴، ۲ و ۶، و ۳ و ۵ را به هم پیوند می‌دهد. در این حالت، پیوند دی سولفیدی که در ابتدا به صورت پشت سر هم در توالی تشکیل شده است (مثلاً بین سیستئین‌های ۲ و ۱) باید نوآرایی شود تا پروتئین ساختار فضایی مناسب خود را به دست آورد. در سلول‌ها، نوآرایی پیوندهای دی‌سولفیدی توسط PDI نیز تسهیل می‌شود. PDI بر روی مقدار زیادی از سوبستراهای پروتئینی عمل کرده و باعث می‌شود آنها به شکل فضایی پایدار خود از نظر ترمودینامیکی برسند (شکل b ۱۹ـ۱۳). پیوندهای دی‌سولفیدی معمولاً با یک نظم خاص شکل می‌گیرند. این پیوندها ابتدا نواحی کوچک پلی‌پپتید را پایدار ساخته و سپس باعث پایداری و ثبات میانکنش قطعات دورتر می‌شوند؛ این پدیده با تاخوردن پروتئین HA آنفلوانزا به تصویر کشیده شده و در قسمت بعدی مورد بحث قرار خواهد گرفت.

چاپرون‌ها و دیگر پروتئین‌های ER تاخوردگی و تجمع پروتئین‌ها را تسهیل می‌کنند

هر چند خیلی از پروتئین‌های دناتوره به صورت خودکار می‌توانند مجدداً تاخورده و در شرایط آزمایشگاهی به حالت طبیعی خود بازگردند، اما چنین تاخوردن‌های مجددی برای کامل شدن، معمولاً به ساعت‌ها وقت نیاز دارند. ولی در عین حال، پروتئین‌های جدید محلول و غشایی تولید شده در ER، عموماً در عرض چند دقیقه بعد از سنتز به شکل فضایی مناسب خود می‌رسند. تاخوردگی سریع این پروتئین‌های تازه سنتز شده در سلول به عمل پی در پی چندین پروتئین موجود در لومن ER بستگی دارد. ما به تازگی بیان کردیم که چگونه چاپرون مولکولی BiP با اتصال به پلی‌پپتیدهای سنتز شده در حال ورود به ER می‌تواند انتقال بعد از ترجمه را در مخمرها انجام دهد (شکل ۹ـ۱۳ را ملاحظه کنید).

BiP هم چنین می‌تواند به صورت موقت به زنجیره تازه‌ای که در حین ورود به ER از طریق انتقال همزمان با ترجمه است، متصل شود. BiP متصل شده به نظر می‌رسد از تاخوردگی اشتباه یا تشکیل تجمعات نامناسب جلوگیری کرده، و از این طریق به پیشبرد تاخودرگی مناسب کمک می‌کند، زیرا شکل سه بعدی در بسیای از پروتئین‌ها با پیوندهای دی‌سولفیدی تثبیت می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۲۰ـ۱۳ نشان داده شده دو پروتئین ER دیگر، یعنی **لکتین‌های هومولوگ** (پروتئین‌های متصل به کربوهیدرات) **کال‌نکسین و کال رتیکولین**، به صورت انتخابی به الیگوساکاریدهای خاصی در زنجیره‌های در حال رشد متصل می‌گردند. لیگاند برای این دو لکتین که شامل یک دنباله ساده گلوکز است، توسط یک گلیکوزیل ترانسفراز در لومن ER تولید می‌شود (شکل ۱۸ـ۱۳ مرحله a❸ را ملاحظه کنید). این آنزیم تنها روی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تانخورده و بد تاب‌خورده عمل می‌کند و از این نظر گلیکوزیل ترانسفراز به عنوان یکی از مکانیسم‌های نظارتی ابتدایی برای نظارت بر کنترل کیفیت پروتئین تاب خورده در ER عمل می‌کند. اتصال کال‌نکسین و کال‌رتیکولین به زنجیره جدید تانخورده و نشاندار شده با الیگوساکاریدهای متصل به N، مانع از تجمع نامناسب قطعات مجاور به هم در پروتئین، در حال سنتز در ER می‌شود. در نتیجه کال‌نکسین و کال‌رتیکولین همانند BiP به پروتیئن نارس کمک کرده و از تاخوردگی نادرست قطعات پروتئین تازه سنتز شده جلوگیری می‌کنند.



کاتالیزور مهم دیگر در تاخوردگی پروتئین در لومن ER، **پپتیدیل ـ پیرول ایزومرازها**[1] هستند، پپتیدل - پیرول ایزومراز خانواده‌ای از آنزیم‌ها می‌باشند که موجب تسهیل چرخش حول پیوند پپتیدیل ـ پیرول در اسید آمینه پرولین در قطعات تا نخورده یک پلی‌پپتید می‌شوند. چنین ایزومریزاسیون‌هایی گاهی اوقات در تاخوردن پروتئین، مرحله محدودکننده سرعت هستند. خیلی از پپتیدیل ـ پیرول ایزومرازها می‌توانند چرخش پیوندهای پپتیدیل ـ

1- Peptidyl - prolyl isomerases

پیرول در معرض را در پروتئین‌های زیادی کاتالیز کنند اما برخی از این آنزیم‌ها سوبستراهای پروتئینی خاصی دارند.

خیلی از پروتئین‌های مهم ترشحی و غشایی سنتز شده در ER از یک یا چند زیر واحد پلی‌پپتیدی ساخته شده‌اند. در تمام این موارد، تجمع زیر واحدهای تشکیل‌دهنده پروتئین چند زیرواحدی در ER صورت می‌گیرد. یک کلاس مهم از پروتئین‌های ترشحی چند زیرواحدی، ایمونوگلوبولین‌ها هستند که حاوی دو زنجیره سنگین (H) و دو زنجیره سبک (L) همگی بوده و با پیوندهای دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ای به هم متصل شده‌اند. هماگلوتینین (HA) یک پروتئین چند زیرواحدی دیگر است که به خوبی نشان‌دهنده تاخوردگی و تجمع زیر واحدها می‌باشد (شکل ۲۰ـ۱۳). این پروتئین تریمر، دسته‌هایی را تشکیل می‌دهد که از سطح ذره ویروس آنفلوانزا بیرون می‌آیند. تریمر HA درون ER سلول میزبان عفونی شده، از سه کپی از یک پیش ساز پروتئین به نام HAo ساخته می‌شود. این پیش ساز یک مارپیچ α عبورکننده از غشاء دارد. در کمپلکس گلژی، هر یک از سه پروتئین HA به دو پلی‌پپتید، HA_1 و HA_2 برش می‌خورند؛ بنابراین هر مولکول HA موجود در سطح ویروس شامل سه کپی از HA_1 و سه کپی از HA_2 است (شکل ۱۰ـ۳ را ملاحظه کنید). از طریق تریمر میانکنش‌های بین نواحی بزرگ اگزوپلاسمی سازنده پلی‌پپتید که به سمت لومن ER امتداد یافته‌اند، پایدار می‌شود؛ بعد از اینکه HA به سطح سلول منتقل شد، این نواحی در سمت فضای خارج سلولی قرار می‌گیرند. میانکنش‌های بین قسمت‌های کوچک‌تر سیتوزولی و قسمت عبورکننده از غشاء در زیر واحدهای HA نیز به پایدار شدن این تریمر پروتئینی کمک می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد تنها ۱۰ دقیقه زمان می‌برد تا پلی‌پپتیدهای HA تاخورده و تجمع یابند و شکل فضایی مناسب تریمری خود را به دست آورند.

پروتئین‌های تاخورده نامناسب در ER، بیان کاتالیزورهای تاخوردگی پروتئین را القا می‌کنند

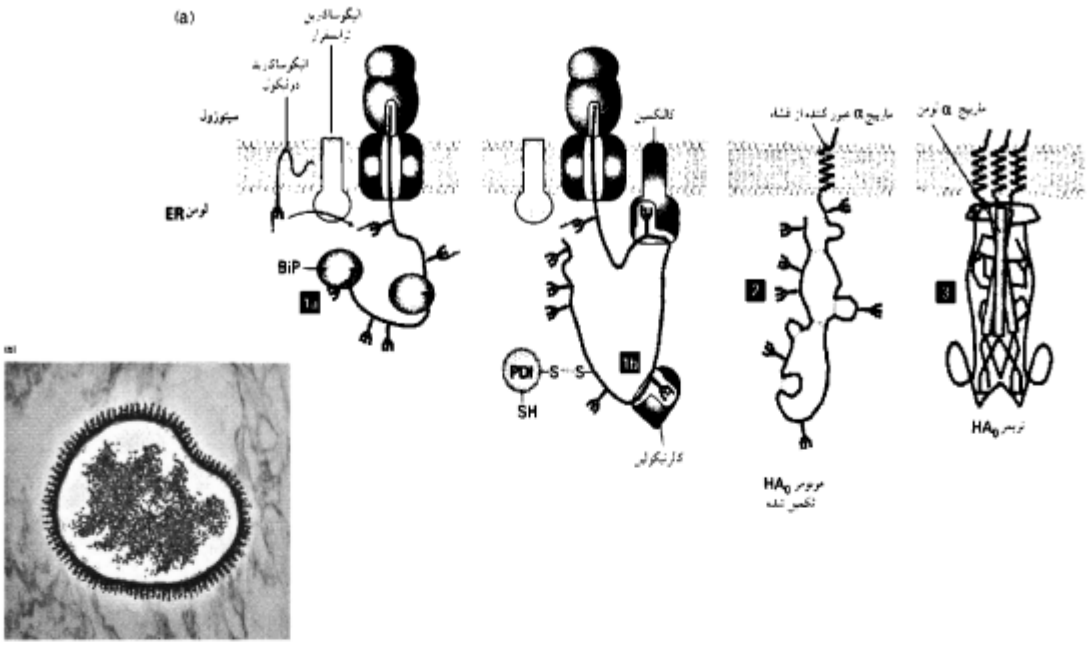
پروتئین‌های نوع وحشی سنتز شده بر روی ER خشن تا هنگامیکه بطور کامل به شکل فضایی خود در نیایند، نمی‌توانند ER را ترک کنند. هم چنین، تقریباً هر جهشی که مانع از تاخوردن مناسب پروتئین در ER، شود از حرکت پلی‌پپتید از لومن ER یا غشاء ER به طرف کمپلکس گلژی جلوگیری می‌کنند. مکانیسم‌های نگهداری پروتئین‌های تانخورده یا ناقص تاخورده درون ER احتمالاً کارایی کلی تاخوردن را با نگهداری اشکال واسطه در نزدیکی کاتالیزورهای تاخوردگی (که بیشتر در ER هستند) افزایش می‌دهد. پروتئین‌های بد تاخورده نگهداری شده در ER، عموماً به صورت متصل با چاپرون‌های شبکه آندوپلاسمی BiP و کال‌نکسین دیده می‌شوند، این کاتالیزورهای تاخوردگی لومنی دو عملکرد مرتبط یعنی کمک به تاخوردگی معمول پروتئین‌ها با جلوگیری از تجمع و توده‌ای شدن آنها و پیوند با پروتئین‌های بد تاب خورده غیرقابل برگشت، انجام می‌دهند.

هم سلول‌های پستانداران و هم مخمرها با افزایش رونویسی ژن‌های مختلف رمزدهی‌کننده چاپرون‌های ER و دیگر کاتالیزورهای تاخوردگی، به حضور پروتئین‌های تانخورده در ER پاسخ می‌دهند. یک پروتئین کلیدی در پاسخ **به پروتئین تانخورده**[1] Ire1 است که یک پروتئین غشایی ER بوده و به صورت دیمر و تریمر وجود دارد.

فرم دیمری، (و نه مونومری)، پیشبرنده تشکیل Hac1است، Hac1 یک فاکتور رونویسی در مخمرها بوده و در پاسخ به پروتئین تانخورده، بیان ژن‌ها را القا می‌کند. همان‌طور که در شکل ۲۱ـ۱۳ نشان داده شده، اتصال BiP به منطقه لومنی Ire1 مونومری از تشکیل دیمر Ire1 جلوگیری می‌کند. بنابراین مقدار BiP آزاد در لومن ER احتمالاً میزان نسبی Ire1 مونومر و دیمر را تعیین می‌کند. تجمع پروتئین‌های تانخورده در لومن ER، مولکول‌های BiP را از هم جدا و آنها را برای پیوند با Ire1 از دسترس خارج می‌سازند. در نتیجه مقدار Ire1 دیمری افزایش یافته و این خود موجب افزایش میزان Hac1 و تولید پروتئین‌هایی می‌شود که به تاخوردگی پروتئین‌ها کمک می‌کنند.

سلول‌های پستانداران دارای یک مسیر تنظیمی دیگر هستند که در پاسخ به پروتئین‌های تانخورده در ER عمل می‌کند. در این مسیر، تجمع پروتئین‌های تانخورده در ER باعث پروتئولیز ATF6 (یک پروتئین عبورکننده از غشاء در غشاء ER)، در درون قطعه عبورکننده از غشاء می‌شود. ناحیه سیتوزولی ATF6 در اثر پروتئولیز رها شده، به هسته رفته و در آن جا موجب تحریک رونویسی ژن‌های رمزدهی‌کننده چاپرون‌های ER می‌گردد. فعال شدن یک فاکتور رونویسی با چنین پروتئولیز درون غشایی تنظیم شده در مسیر سیگنالی نچ و طی فعال شدن فاکتور رونویسی پاسخ به کلسترول یعنی SREBP نیز صورت می‌گیرد (شکل ۳۶ـ۱۶ و ۳۸ـ۱۶ را ملاحظه کنید).

1- Unfolded-protein response



▲ **شکل ۲۰-۱۳ تاخوردن و تجمع هماتوگلوتینین.** (a) مکانیسم تجمع تریمر (HA_0). اتصال موقت چاپرون BiP (مرحله a ❶) به زنجیره جدید و به دو لکتین (کال‌نکسین و کال‌رتیکولین) در زنجیره‌های الیگوساکاریدی خاص (مرحله b ❶) باعث پیشبرد تاخوردگی مناسب قطعات مجاور می‌شود. تمام هفت الیگوساکارید متصل به N به بخش لومنی زنجیره جدید در طی انتقال همزمان با ترجمه اضافه شده، و PDI تشکیل شش پیوند دی‌سولفیدی در هر مونومر را کاتالیز می‌کند. مونومرهای HA_0 تکمیل شده از طریق یک مارپیچ a عبورکننده از غشاء با انتهای ـ N در لومن، به غشاء متصل می‌شوند (مرحله ❷). میانکنش بین سه زنجیره HA_0 با یکدیگر و در ابتدا بامارپیچ α عبورکننده از غشاء، ظاهراً باعث تشکیل یک ساقه طویل حاوییک مارپیچ α در قسمت لومنی هر پلی‌پپتید HA_0 می‌شود. در نهایت، میانکنش‌های بین سه رأس گلبولار ایجاد شده و باعث تولید یک تریمر HA_0 پایدار می‌گردد (مرحله ❸). (b) تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک ویریون آنفلوانزا کامل که نشان‌دهنده پروتئین HA بوده و به شکل دسته‌هایی از سطح غشاء ویروس بیرون آمده‌اند.

فرم ارثی آمفیزم بیان‌کننده تأثیرات زیان‌آوری است که می‌تواند از تاخوردگی‌های اشتباه پروتئین‌ها در ER حاصل شود. این بیماری در اثر یک جهش نقطه‌ای در α_1 ـ آنتی‌تریپسین ایجاد می‌شود. α_1 آنتی تریپسین که به‌طور معمول توسط هپاتوسیت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود فرم طبیعی پروتئین به تریپسین و هم چنین پروتئاز خون (الاستاز) متصل شده و آنها را مهار می‌کند. در غیاب α_1 - آنتی‌تریپسین، الاستاز بافت‌های ظریف شش را که در جذب اکسیژن شرکت دارند تجزیه کرده و در نهایت باعث به وجود آمدن علائم آمفیزم می‌شود.

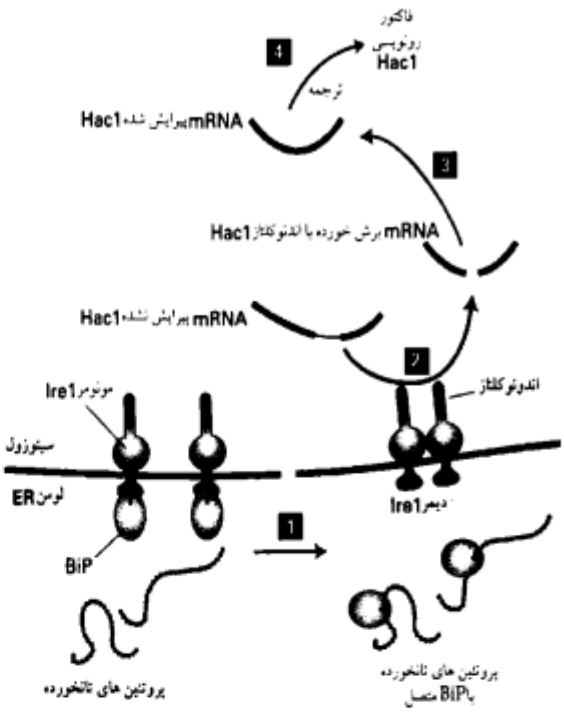
با این که α_1- آنتی‌تریپسین جهش یافته در ER خشن سنتز می‌شود، به خوبی تانخورده و یک توده شبه کریستالی را تشکیل می‌دهد که از ER خارج نمی‌شود. در هپاتوسیت‌ها، ترشح پروتئین‌های دیگر به دلیل پر شدن ER خشن از α_1- آنتی‌تریپسین‌های تجمع یافته مختل می‌شود.

پروتئین‌های تجمع نیافته یا بد تاخورده در ER اغلب برای تجزیه شدن به سیتوزول منتقل می‌شوند

پروتئین‌های بدتاخورده غشایی و ترشحی، همانند زیر واحدهای پروتئین‌های چند زیرواحدی تجمع نیافته، اغلب در یک یا دو ساعت بعد از سنتز شدن در ER خشن، تجزیه می‌شوند. طی سال‌های متمادی، محققان فکر می‌کردند که آنزیم‌های پروتئولیزی در لومن ER پلی‌پپتیدهای تجمع نیافته یا بدتاخورده را برای تجزیه کاتالیز می‌کنند، اما چنین پروتئازهایی هیچ وقت پیدا نشدند. مطالعات بیشتری که اخیراً صورت گرفت نشان داد پروتئین‌های ترشحی و غشایی بدتاخورده از طریق فرآیندی که با عنوان **جابه‌جا شدن**[1] یا **انتقال معکوس**[2] شناخته می‌شود. توسط پروتئین‌های غشایی ER خاصی شناسایی و برای انتقال از لومن ER به سیتوزول جهت دهی می‌شوند.

جابجا شدن پروتئین‌های بد تاخورده به خارج از ER به

1- Dislocation 2 - Retrotranslocation



▲ **شکل ۲۱-۱۳ پاسخ به پروتئین تانخورده.** Ire1، یک پروتئین عبورکننده از غشاء در ER بوده و در ناحیهٔ لومنی خود جایگاه اتصالی برای BiP دارد؛ ناحیه سیتوزولی دارای یک RNA اندونوکلئاز خاص است. مرحله 1: جمع شدن پروتئین‌های تانخورده در لومن ER در اثر اتصال به مولکول‌های BiP، مولکول‌های BiP را از Ire1 رها می‌کنند. مراحل 2 و 3: mRNA پیش ساز و پیرایش نیافته رمزکننده فاکتور رونویسی Hac1 توسط دیمر Ire1 بریده شده و دو اگزون به هم متصل می‌شوند تا mRNA عملکردی Hac1 را تشکیل دهند. شواهد کنونی مشخص می‌کند با این‌که پردازش mRNA اولیه عموماً در هسته اتفاق می‌افتد. این فرآیند در سیتوزول رخ می‌دهد. مرحله 4: Hac1 به پروتئین Hac1 ترجمه شده، و سپس به هسته گشته و رونویسی ژن‌های رمزدهی‌کننده چندین کاتالیزور تاخوردگی پروتئین را فعال می‌کنند.

مجموعه‌ای از پروتئین‌های قرار گرفته در غشاء ER و در سیتوزول بستگی دارد و این پروتئین‌ها سه عمل اساسی انجام می‌دهند. اولین عملکرد شناسایی و تشخیص پروتئین‌های بد تاخورده است که سوبسترای واکنش جابجا شدن محسوب می‌شوند. تشخیص در لومن ER اتفاق می‌افتد و در برخی موارد نیز می‌تواند شامل اتصال BiP به پروتئین تانخورده نیز باشد. با این حال، جزئیات چگونگی تشخیص پروتئین‌های بد تاخورده هنوز به خوبی روشن نشده است. به ویژه مشخص نیست چگونه پروتئین‌هایی که نمی‌توانند به خوبی تا بخورند، سوبسترای اصلی برای جابجا شدن محسوب شده و از پروتئین‌های طبیعی که حالات تاخوردگی نسبی دارند، تشخیص داده می‌شوند.

وقتی پروتئین بد تاخورده شناسایی شد، برای جابجایی از طریق غشاء ER جهت دهی می‌گردد. انواعی از کانال‌ها باید برای جابجا شدن پروتئین بد تاخورده از بین غشاء ER وجود داشته باشند. ترانسلوکون Sec61 به نظر می‌رسید در واکنش جابجایی مشارکت داشته باشد، اما مشاهدات کنونی بیان می‌کند پلی‌پپتیدهای جابجا شده به واقع، از طریق کانال کمپلکس Sec61 به سمت عقب عبور نمی‌کند. هنگامی که قطعات پلی‌پپتید جابه‌جا شده معکوس در معرض سیتوزول قرار می‌گیرند،با آنزیم‌های سیتوزولی مواجه می‌شوند که باعث انتقال معکوس می‌شوند. یکی از این آنزیم‌ها یک ATP آز به نام P97 بوده و یکی از اعضای خانواده پروتئینی که **خانواده ATP ـ آزهای AAA** خوانده می‌شوند، می‌باشد. دیگراعضای این خانواده به عنوان ATP آزهایی شناخته می‌شوند که انرژی هیدرولیز ATP را با خردکردن کمپلکس‌های پروتئینی جفت می‌کنند، برای مثال در فصل ۱۴ با یکی از اعضای خانواده ATP آزهای AAA به نام NSF که یکی از اجزای مهم مسیر ترشحی است، مواجه خواهیم.شد NFS از انرژی هیدرولیز ATP جهت خرد کردن کمپلکس‌های پروتئینی تولید شده در طول جوانه‌زنی و جوش خوردن، وزیکول‌ها، استفاده می‌کند. (شکل ۱۰ـ۱۴ را ملاحظه کنید) در انتقال معکوس، هیدرولیز ATP توسط P97 ممکن است نیروی محرکه جهت هل دادن پروتئین‌های بد تاخورده از غشاء ER به سیتوزول را تأمین کند. در هنگامی که پروتئین‌های بد تاخورده دوباره وارد سیتوزول می‌شوند، آنزیم‌های یوبی‌کوئیتین لیگاز خاص، رزیدوی یوبی‌کوئیتین به پپتید جابه‌جا شده اضافه می‌کنند. همانند عمل P97، واکنش یوبی‌کوئیتینه شدن با واکنش هیدرولیز ATP جفت می‌شود. این آزاد شدن انرژی در اثر هیدرولیز ATP احتمالاً در به دام انداختن پروتئین‌ها در سیتوزول نیز شرکت می‌کند. پلی‌پپتیدهای پلی‌یوبی کوئیتینه شده حاصل، اکنون به‌طور کامل در سیتوزول هستند، و با تجزیه در پروتئوزوم‌ها به‌طور کامل از سلول حذف می‌شوند (شکل ۲۹ـ۳ را ملاحظه کنید).

نکات کلیدی بخش ۳-۱۳

تغییر، تاخوردن و کنترل کیفیت پروتئین در ER

■ همه الیگوساکاریدهای متصل به N (که به اسیدهای آمینه آسپارژین متصل می‌شوند) حاوی یک هسته متشکل از سه مانوز و دو N – استیل گلوکز آمین بوده و معمولاً شاخه‌های

زیادی دارند (شکل ۱۶-۱۳ را ملاحظه کنید) الیگوساکاریدهای متصل به O (که به رزیدوهای ترئونین یا سرین متصل می‌شوند) معمولاً کوتاه بوده و اغلب حاوی یک یا چهار واحد قندی می‌باشند.

■ تشکیل همه الیگوساکاریدهای متصل به N با تجمع یک پیش‌ساز بر روی دومولکول شروع می‌شود. این پیش‌ساز ۱۴ با واحد قندی، حاوی مانوز زیادی است (شکل ۱۷-۱۳ را ملاحظه کنید). بعد از اینکه الیگوساکارید تشکیل شد، به اسیدهای آمینه آسپارژین خاص روی زنجیره‌های پلی‌پپتید در حال سنتز در لومن ER منتقل شده و سه واحد گلوکز و یک واحد مانوز برداشته می‌شوند (شکل ۱۸-۱۳ را ملاحظه کنید).

■ زنجیره‌های جانبی الیگوساکارید ممکن است در تاخوردن صحیح گلیکوپروتئین‌ها، کمک به حفاظت پروتئین‌های بالغ در برابر پروتئولیز و در چسبندگی بین سلول‌ها نقش داشته و همچنین به عنوان آنتی ژن عمل کنند.

■ پیوندهای دی‌سولفیدی به اغلب پروتئین‌های ترشحی و دُمین اگزوپلاسمی پروتئین‌های غشاء در ER افزوده می‌شود. پروتئین دی سولفید ایزومراز (PDI) در لومن ER موجود بوده و تشکیل و نوآرایی پیوندهای دی سولفیدی را کاتالیز می‌کنند (شکل ۱۹-۱۳ را ملاحظه کنید).

■ چاپرون BiP لکتین‌های کال نکسین و کال رتیکولین و پپتیدیل - پرولیل ایزومراز با همدیگر عمل نموده و تا خوردن صحیح پروتئین‌های غشایی و ترشحی تازه ساخته شده در ER را تضمین می‌نمایند. زیرواحدهای پروتئین‌های چند زیرواحدی نیز در ER تجمع می‌یابند.

■ فقط پروتئین‌های تاخورده صحیح و زیرواحدهای تجمع یافته از ER خشن به کمپلکس‌های گلژی در وزیکول‌ها منتقل می‌شود.

■ تجمع پروتئین‌های تاخورده غیرطبیعی و زیرواحدهای تجمع نیافته در ER، می‌تواند بیان زیاد کاتالیز و تاخوردن پروتئین را در ER از طریق پاسخ به پروتئین تانخورده، القاء کند (شکل ۲۱-۱۳ را ملاحظه کنید).

■ پروتئین‌های تجمع نیافته یا بدتاخورده در ER اغلب به طرف سیتوزول برگشته و در آنجا در مسیر یوبی کوئیتین / پروتئوزوم تجزیه می‌شوند.

۱۳-۴ ارسال پروتئین‌ها به میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها

در ادامه این فصل به این مسأله می‌پردازیم که چگونه پروتئین‌های سنتز شده در ریبوزوم‌های سیتوزولی به میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها، پراکسیزوم‌ها و هسته‌ها می‌روند (شکل ۱-۱۳ را ملاحظه کنید). هم میتوکندری و هم کلروپلاست دارای یک لومن داخلی به نام **ماتریکس** بوده و با یک غشاء دو لایه احاطه می‌شود و اجزای داخلی این اندامک‌ها نیز درون ماتریکس قرار می‌گیرند. در مقابل، پراکسیزوم‌ها دارای یک غشای ساده بوده و یک جزء ماتریکس لومنی دارند. به دلیل این تفاوت و تفاوت‌های دیگر، پراکسیزوم‌ها را در قسمت بعدی مورد مطالعه قرار خواهیم داد. به همین صورت مکانیسم انتقال پروتئین به داخل و خارج از هسته‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای با انتقال آنها به میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها متفاوت است؛ این مبحث نیز در آخر فصل بررسی می‌شود.

میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها علاوه بر احاطه بودن با دو غشاء، پروتئین‌های انتقال الکترون مشابهی داشته و از ATP آزهای کلاس F برای سنتز ATP استفاده می‌کنند (شکل ۳-۱۲ را ملاحظه کنید). جالب اینکه باکتری‌های گرم منفی نیز چنین ویژگی‌هایی را از خود نشان می‌دهند. هم چنین مشابه به - سلول‌های باکتریایی، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها خود دارای DNA هستند که rRNAها، tRNAها و برخی پروتئین‌های دیگر اندامک را رمزدهی می‌کنند (فصل ۶). علاوه بر این، رشد و تقسیم میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها به همراه تقسیم هسته‌ای صورت نمی‌گیرد. این اندامک‌ها اغلب با مشارکت پروتئین‌ها و لیپیدهای سلولی رشدکرده و اندامک‌های جدید از تقسیم اندامک‌های پیشین به وجود می‌آیند. شباهت زیاد سلول‌های باکتریایی آزادزی با میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها باعث هدایت دانشمندان به ارائه این فرضیه شد که این اندامک‌ها از مشارکت باکتری‌ها در اجداد سلول‌های یوکاریوت و تشکیل اندامک‌های درون همزیست به وجود آمده‌اند (شکل ۲۰-۶ را ملاحظه کنید). شباهت توالی خیلی از پروتئین‌های انتقال غشایی مشترک بین میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و باکتری‌ها دلایل شاخصی را در مورد این رابطه تکاملی اجدای ارائه داد. در این بخش ما این پروتئین‌های انتقال غشایی را بیشتر مورد بررسی قرار خواهیم داد.

پروتئین‌های رمزدهی شده توسط DNA میتوکندریایی یا کلروپلاستی توسط ریبوزوم‌های درون اندامک‌ها سنتز شده و بلافاصله پس از سنتز به سمت اجزای اندامک‌ها هدایت می‌شوند. با

جدول ۱ـ۱۳ توالی‌های هدف‌یابی که پروتئین‌ها را از سیتوزول به اندامک‌ها هدایت می‌کنند

اندامک هدف	موقعیت توالی در پروتئین	حذف توالی	ماهیت توالی
شبکه آندوپلاسمی (لومن)	انتهای N	بلی	هسته‌ای از ۱۲ـ۶ اسیدآمینه آبگریز که قبل از آنها یک یا چند اسیدآمینه بازی قرار دارند (Arg,Lys)
میتوکندری (ماتریکس)	انتهای N	بلی	مارپیچ آمفی‌پاتیک، طول ۲۵ـ۲۰ اسید آمینه با اسید آمینه Lys یا Arg در یک سمت و اسید آمینه آبگریز در سمت دیگر.
کلروپلاست (استروما)	انتهای N	بلی	موقیف معمولی نداشته و عموماً غنی از Ser، Thr و رزیدوهای کوچک آبگریز و فقیر از Glu و Asp سیگنال PTS1 (Ser-Lys-Leu) در انتهای ـ C، سیگنال PTS2 در انتهای ـ N
پراکسیزوم (ماتریکس)	انتهای C (اغلب پروتئین‌ها)؛ انتهای N (برخی پروتئین‌ها)	خیر	انواع مختلف متفاوت، یک موقیف معمول شامل یک قطعه کوتاه غنی از Lys و Arg
هسته (نوکلئوپلاسم)	متفاوت	خیر	

* توالی‌های دیگر یا متفاوت پروتئین‌ها را به غشاهای اندامک و زیر اجزای اندامک‌ها هدف‌دهی می‌کنند.

وجود این بسیاری از پروتئین‌های واقع در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها توسط ژن‌های هسته‌ای رمزدهی و بعد از سنتز در سیتوزول به اندامک‌ها وارد می‌شوند. ظاهراً، در طول قرن‌های متمادی از تکامل، بیشتر اطلاعات ژنتیکی از DNA باکتریایی در این اندامک‌های درون همزیست به وسیله یک مکانیسم ناشناخته به هسته منتقل شده‌اند. پیش‌سازهای پروتئینی سنتز شده در سیتوزول که برای ماتریکس میتوکندری‌ها یا فضای مشابه آن در کلروپلاست‌ها یعنی استروما مقدر شده‌اند، معمولاً حاوی توالی‌های خاص هدف‌یابی جذب در انتهای N هستند که برای پیوند به پروتئین‌های گیرنده بر روی سطح اندامک‌ها اختصاصی هستند. عموماً این توالی وقتی که به ماتریکس یا استروما می‌رسد، برش می‌خورد. واضح است که توالی‌های هدف‌یابی جذب[1] از نظر موقعیت و عملکرد کلی، مشابه توالی‌های سیگنالی بوده و پروتئین‌های جدید را به سمت لومن ER هدایت می‌کنند. با وجود این که هر سه نوع سیگنال خصوصیات مشترک توالی دارند، توالی خاص آنها همان‌طوری که در جدول ۱ـ۱۳ خلاصه شده است به‌طور قابل توجهی متفاوت است.

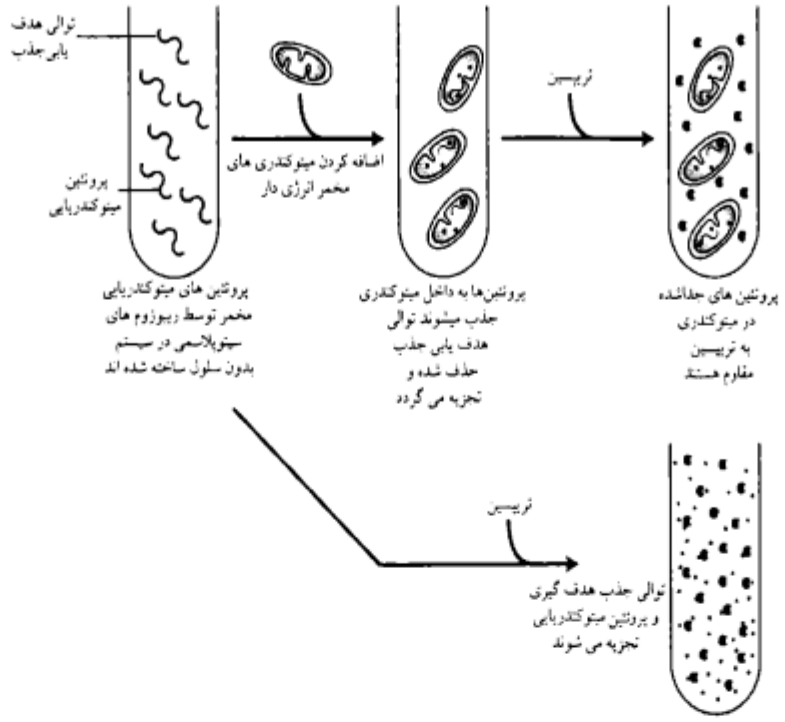
وارد کردن پروتئین هم در کلروپلاست و هم در میتوکندری نیاز به انرژی دارد و در نقطه‌ای اتفاق می‌افتد که غشاهای داخلی و خارجی اندامک در تماس نزدیک به هم می‌باشند. چون میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها دارای غشای چندگانه و فضاهای محدود بین غشایی هستند، ارسال خیلی از پروتئین‌ها به موقعیت مناسب در آنها اغلب نیازمند عمل متوالی دو توالی هدف‌یابی و دو سیستم انتقال متصل به غشاء است که یکی برای جهت‌دهی پروتئین به اندامک و دیگری برای هدایت به غشاء یا جزء اندامکی می‌باشد. همان‌طوری که خواهیم دید، مکانیسم ارسال پروتئین‌های مختلف به میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها با برخی از مکانیسم‌هایی که در گذشته گفته شد، مرتبط است.

توالی‌های آمفی‌پاتیک سیگنالی انتهای N، پروتئین‌ها را به سمت ماتریکس میتوکندریایی هدایت می‌کنند

تمامی پروتئین‌هایی که از سیتوزول به مقصد میتوکندریایی عزیمت می‌کنند دارای سیگنال‌های هدف‌یابی بوده و دارای موتیف‌های مشترک و مشابهی هستند. با این حال توالی‌های سیگنالی در کل یکسان نیستند. بنابراین گیرنده‌هایی که چنین سیگنالی‌هایی را تشخیص می‌دهند قادر هستند که با تعدادی از توالی‌های مختلف اما مرتبط اتصال یابند. توالی‌هایی که بیشترین مطالعات در مورد موقعیت‌یابی پروتئین‌ها در میتوکندری صورت گرفته، **توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس**[2] هستند. این توالی‌ها در انتهای N واقع شده و معمولاً ۵۰ـ۲۰ اسیدآمینه طول دارند. آنها غنی از اسیدهای‌آمینه آبگریز، اسیدهای‌آمینه بازی با بار مثبت (آرژنین و

1- Uptake-targeting Sequences

2- Matrix - torgeting sequences



▲ **شکل ۱۳ـ۲۲ ورود پروتئین‌های پیش‌ساز میتوکندریایی در یک سیستم بدون سلول سنجیده می‌شود.** درون میتوکندری، پروتئین‌ها از عمل پروتئازهایی مانند تریپسین در امان هستند. وقتی که هیچ میتوکندری وجود ندارد، پروتئین‌های میتوکندریایی سنتز شده در سیتوزول با اضافه کردن پروتئاز تجزیه می‌شوند. جذب پروتئین فقط در میتوکندری‌های تنفسی (انرژی‌زا) صورت می‌گیرد که یک شیب الکترومکانیکی پروتون (نیروی محرکه پروتون) در میان غشاء داخلی خود دارند. پروتئین وارد شده باید شامل توالی هدف‌یابی جذب باشد. جذب، هم چنین به ATP و عصاره سیتوزولی حاوی پروتئین‌های چاپرون نیاز دارد. چاپرون‌ها پروتئین‌های جدید را در فرم تانخورده نگه می‌دارند. از این آزمایش برای مطالعه توالی‌های هدف‌یابی و دیگر خصوصیات روند انتقال استفاده می‌شود.

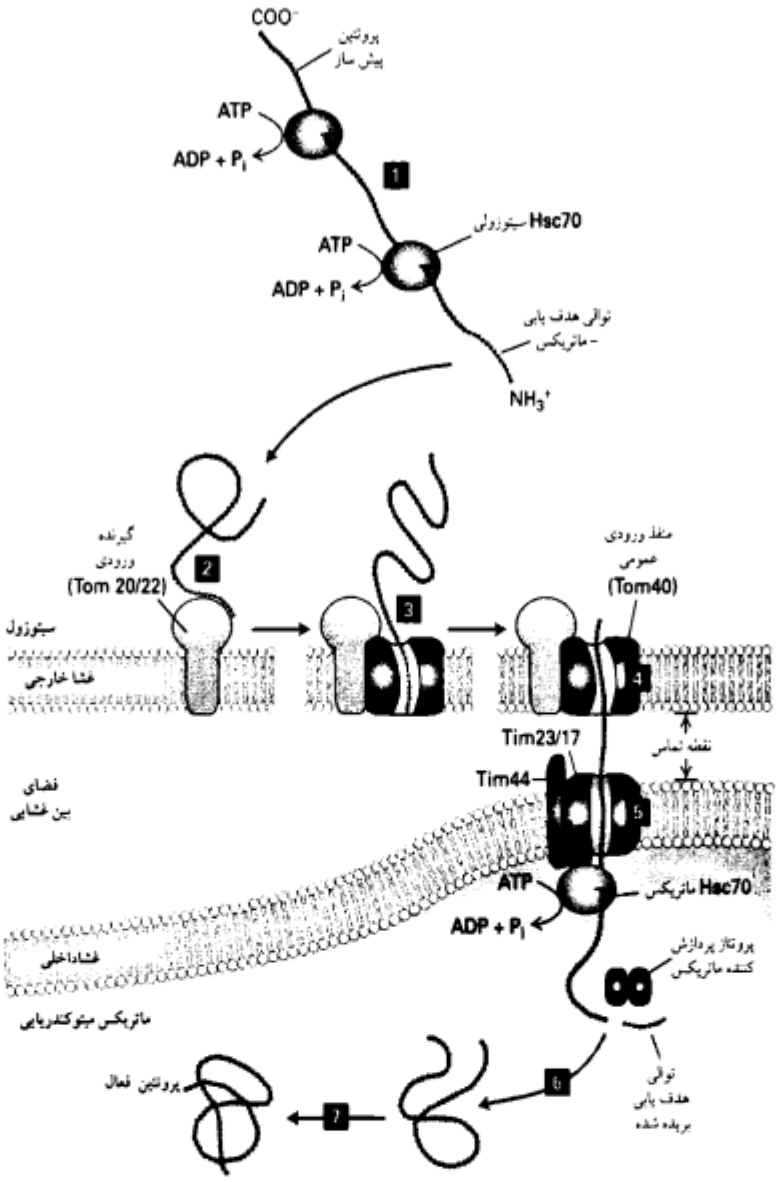
لیزین) و اسیدهای‌آمینه هیدروکسیله (سرین و ترئونین) بوده ولی تمایل دارند که فاقد اسیدهای آمینه اسیدی با بارمنفی (آسپارتات و گلوتامات) باشند.

توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس میتوکندریایی بدین‌گونه در نظر گرفته می‌شوند که حاوی یک ساختار فضایی مارپیچ α بوده و اسیدهای‌آمینه با بار مثبت در یک سمت مارپیچ و اسیدهای‌آمینه آبگریز در سمت دیگر واقع می‌شوند. توالی‌هایی همانند این که هم شامل مناطق آبگریز و هم شامل نواحی آبدوست هستند را **آمفی‌پاتیک** می‌خوانند. جهش‌هایی که این خصوصیت آمفی‌پاتیک را تخریب می‌کند، معمولاً هدف‌یابی به ماتریکس را نیز مختل می‌کند، اما جابه‌جایی خیلی از اسیدهای‌آمینه دیگر هدف‌یابی به ماتریکس را مختل نمی‌کند. این یافته‌ها مشخص می‌کند که آمفی‌پاتیک بودن توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس برای عملکرد آنها ضروری هستند.

آزمایش در سیستم بدون سلول که در شکل ۱۳ـ۲۲ نشان داده شده، به‌طور وسیعی برای مطالعه در مورد ورود پیش‌سازهای پروتئینی میتوکندریایی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این سیستم، تنفس (انرژی‌زا) میتوکندری‌های خارج شده از سلول می‌توانند در حمل توالی‌های هدف‌یابی جذب که در غیاب میتوکندری‌ها سنتز شده‌اند به پیش‌سازهای پروتئینی کمک و مشارکت کنند. ورود موفقیت‌آمیز پیش‌ساز به اندامک را می‌توان به دو روش سنجید. با مقاومت به هضم شدن با اضافه کردن پروتئازی مانند تریپسین و یا در بیشتر موارد، با برش انتهای N توالی‌های هدف‌یابی با پروتئازهای میتوکندریایی ویژه. جذب پیش‌سازهای پروتئینی میتوکندریایی کاملاً از پیش‌ساخته توسط اندامک در این سیستم با انتقال همزمان با ترجمه در سیستم بدون سلول پروتئین‌های ترشحی به ER متفاوت بوده و عموماً هنگامی رخ می‌دهد که غشاهای میکروزومی (مشتق شده از ER) در طول سنتز حضور داشته باشند.

ورود پروتئین میتوکندریایی نیازمند گیرنده‌های غشای خارجی و ترانسلوکون‌ها در هر دو غشاء است

شکل ۱۳ـ۲۳ نمای کلی وارد شدن پروتئین از سیتوزول به ماتریکس میتوکندریایی، مسیری که به میتوکندری می‌رود و توسط



▲ **شکل ۲۳-۱۳ ورود پروتئین به ماتریکس میتوکندریایی.** پروتئین پیش‌ساز سنتز شده در ریبوزوم‌های سیتوزولی در اثر اتصال به چاپرون‌هایی مثل Hsc70، به صورت تانخورده یا نسبتاً تاخورده باقی می‌مانند (مرحله ❶). بعد از این که پروتئین پیش‌ساز به گیرنده ورودی در نزدیکی مکان تماس با غشاء داخلی متصل شد (مرحله ❷) به منفذ ورودی عمومی منتقل می‌شود (مرحله ❸). سپس پروتئین در حال انتقال از طریق این کانال و کانال مجاور در غشاء حرکت می‌کند، (مرحله ❹ و ❺). توجه نمائید انتقال در «جایگاههای تماس» رخ می‌دهد که در آنجا به نظر می‌رسد غشاهای داخلی و خارجی با هم تماس دارند. برقراری پیوند بین پروتئین در حال انتقال با چاپرون‌های Hsc70 ماتریکس و سپس هیدرولیز ATP به ورود به ماتریکس کمک می‌کند. وقتی که توالی هدف‌یابی جذب به وسیله پروتئازهای ماتریکس حذف می‌شود و Hsc70 از پروتئین تازه وارد شده رها می‌گردد (مرحله ❻) در ماتریکس به صورت شکل فضایی بالغ و فعال تا می‌خورد (مرحله ❼). تاخوردگی برخی از پروتئین‌ها به چاپرونین‌های ماتریکس بستگی دارد.

بیشتر پروتئین‌های ورودی دنبال می‌شود. ما به صورت جزئی در مورد هر یک از مراحل انتقال پروتئین به ماتریکس‌بحث خواهیم کرد و سپس بررسی خواهیم کرد که چگونه برخی پروتئین‌ها متعاقباً به سمت اجزای دیگر میتوکندری هدف‌یابی می‌شوند. پیش سازهای قابل حل پروتئین‌های میتوکندریایی (شامل پروتئین‌های اینتگرال غشایی آبگریز) بعد از سنتز در سیتوزول مستقیماً با غشاء میتوکندریایی میانکنش می‌دهند. به‌طور کلی، فقط پروتئین‌های تانخورده می‌توانند وارد میتوکندری شوند. پروتئین‌های چاپرون مانند Hsc70 سیتوزولی، پروتئین‌های نوساز و نوظهور را در حالت تانخورده نگه می‌دارند تا بتواند بعداً توسط میتوکندری‌ها جذب گردند.

این فرآیند نیازمند هیدرولیز ATP است. وارد شدن یک پیش ساز میتوکندریایی تانخورده، با اتصال توالی هدف‌یابی میتوکندریایی به **گیرنده ورود** در غشاء خارجی میتوکندری آغاز می‌گردد. این گیرنده‌ها برای اوّلین بار آزمایش‌هایی که نشان می‌داد آنتی‌بادی‌ها بر علیه پروتئین‌های خاصی از غشاء خارجی میتوکندری، مانع ورود پروتئین به میتوکندری‌های ایزوله شده می‌کردند مشخص شدند. در آزمایشات ژنتیکی بعدی، که در آن ژن‌های پروتئین‌های غشای خارجی میتوکندری جهش یافته بودند، نشان داده‌اید که پروتئین‌های گیرندهٔ ویژه‌ای مسئول ورود کلاس‌های مختلفی از پروتئین‌های میتوکندریایی هستند. برای مثال، توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس انتهای N به وسیله Tom20 و Tom22 شناسایی می‌شوند. (پروتئین‌هایی که در غشاء خارجی میتوکندری در هدف‌یابی و ورود مشارکت می‌کنند پروتئین‌های تخصص یافته Tom بوده و مخفف **ترانسلوکون غشاء خارجی**[1] است).

سپس گیرنده‌های ورود، پروتئین‌های پیش‌ساز را به کانال ورودی در غشاء خارجی منتقل می‌کنند. این کانال که غالباً از پروتئین Tom40 ساخته شده است، به عنوان **منفذ ورودی عمومی** شناخته می‌شود زیرا تمام پروتئین‌های پیش‌ساز از طریق این کانال به اجزای داخلی میتوکندری دسترسی پیدا می‌کنند. وقتی Tom40 تخلیص شده و وارد لیپوزوم گردید، تشکیل یک کانال عبورکننده از غشاء را می‌دهد. قطر منفذ به اندازه کافی عریض است که زنجیره پلی‌پپتید تانخورده در آن قرار می‌گیرد.

حفره ورودی عمومی یک کانال منفعل را در غشاء خارجی میتوکندری تشکیل می‌دهد و نیروی محرک برای انتقال یک‌طرفه به میتوکندری‌ها از درون میتوکندری حاصل می‌شود. در مورد پیش‌سازهایی که برای ماتریکس میتوکندریایی در نظر گرفته شده‌اند، انتقال از میان غشاء خارجی همزمان با انتقال از کانال غشاء داخلی متشکل از پروتئین‌های Tim23 و Tim17 صورت می‌گیرد. (Tim مخفف ترانسلوکون غشاء داخلی[2] است.) بنابراین انتقال به ماتریکس در «نقاط تماس» صورت می‌گیرد، جایی که غشاهای داخلی و خارجی در فاصله بسیار نزدیکی نسبت به هم قرار گرفته‌اند.

به محض ورود انتهای N توالی هدف‌یابی ـ ماتریکس پروتئین به ماتریکس میتوکندریایی، این انتها توسط پروتئازهای موجود در ماتریکس حذف می‌شود. پروتئین ورودی هم چنین به Hsc70 متصل می‌شود. Hsc70 چاپرونی است که در غشاء داخلی میتوکندری و در نزدیکی کانال انتقالی قرار گرفته و با پروتئین عبورکننده غشاء Tim44 میانکنش می‌دهد. این میانکنش هیدرولیز ATP توسط Hsc70 ماتریکس را تحریک کرده و به نظر می‌رسد این دو پروتئین با هم موجب انتقال پروتئین به ماتریکس می‌شوند.

برخی از پروتئین‌های وارد شده بی هیچ کمکی می‌توانند به فرم نهایی و کنفورماسیون فعال خود درآیند. با وجود این تاخوردگی نهایی بسیاری از پروتئین‌های ماتریکس نیازمند یک **چاپرونین** است. همان‌طور که در فصل ۳ بحث شد، پروتئین‌های چاپرونین به صورت فعال تاخوردگی پروتئین‌ها را طی مسیری که وابسته به ATP است، تسهیل می‌کنند. به عنوان مثال، مخمرهای جهش یافته و ناقص از نظر Hsc60 (که یک چاپروتئین در ماتریکس میتوکندری است) می‌توانند پروتئین‌های ماتریکس را وارد کرده و توالی هدف‌یابی جذب آنها را به‌طور معمول برش دهند، اما پلی‌پپتیدهای وارد شده نمی‌توانند تاخورده و به ساختارهای طبیعی سوم و چهارم خود در بیایند.

مطالعات با پروتئین‌های کایمری، ویژگی‌های مهمی از ورود میتوکندریایی را توضیح داد

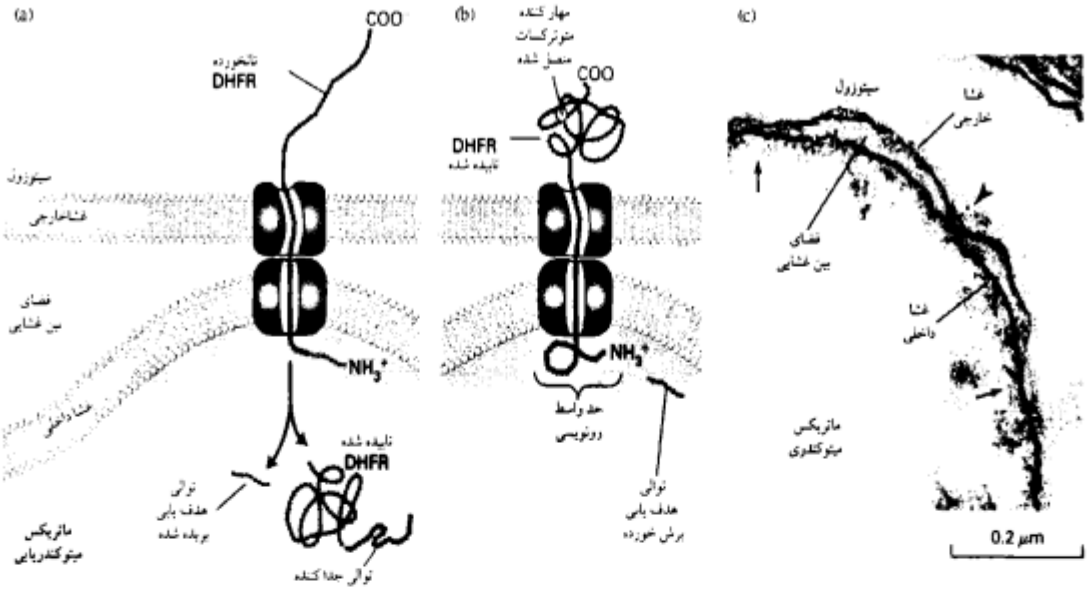
شواهد جالبی مبنی بر قابلیت توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس میتوکندریایی در هدایت ورود از پروتئین‌های کایمری تولید شده توسط تکنیک‌های DNA نوترکیب، به دست آمد. مثلاً، توالی هدف‌یابی ماتریکس الکل دهیدروژناز می‌تواند به انتهای N دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR)، که به‌طور معمول در سیتوزول قرار دارد، جوش بخورد. در حضور چاپرون‌ها، که از تا خوردن قطعه انتهای DHFR C در سیتوزول جلوگیری می‌کنند، آزمایشات انتقال در سیستم فاقد سلول نشان داد که پروتئین‌های کایمری به ماتریکس منتقل شده‌اند (شکل a ۱۳ـ۲۴). مهارکننده متوترکسات[3] که با قدرت به جایگاه فعال DHFR متصل شده و کنفورماسیون تاخورده آنها را به شدت پایدار می‌سازد، پروتئین‌های کایمری را در مقابل چاپرون‌های سیتوزولی به باز کننده تاخوردگی مقاوم می‌سازد. هنگامی که آزمایشات انتقالی در حضور متوترکسات صورت گرفت، پروتئین کایمری به‌طور کامل وارد ماتریکس نشد. این یافته ثابت کرد که یک پیش‌ساز باید به برای عبور از منافذ ورودی در غشاهای میتوکندریایی، به حالت تانخورده در بیاید.

مطالعات بیشتر نشان داد که اگر یک توالی بلند جداکننده با طول

1- Translocon of the outermembrane

2- Translocon of the inner membrane

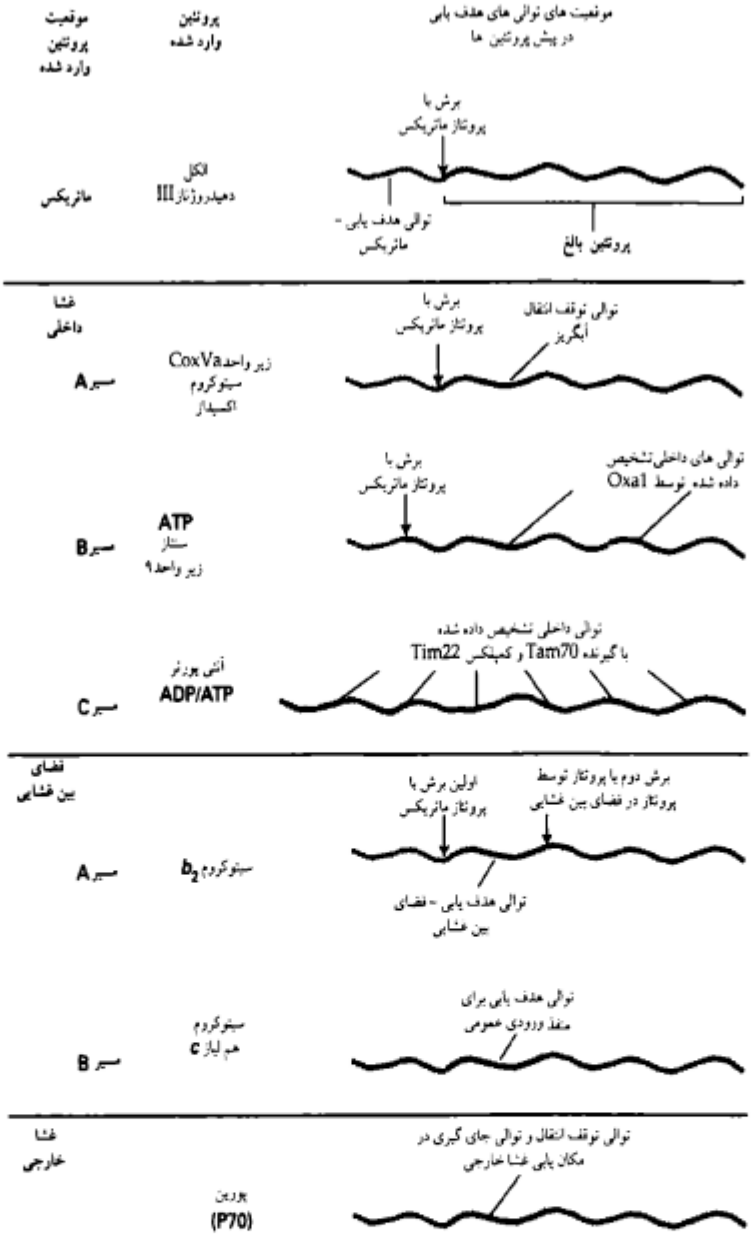
3- Methotrexate



▲ **شکل ۲۴ـ۱۳(شکل رنگی) آزمایشات بر روی پروتئین‌های کایمری نحوه ورود پروتئین‌های میتوکندری را مشخص کرد.** این آزمایشات نشان می‌دهد یک توالی هدف‌یابی ماتریکس به تنهایی پروتئین را به ماتریکس میتوکندریایی هدایت کرده و فقط پروتئین‌های تانخورده از بین دو غشاء عبور می‌کنند. پروتئین کایمری در این آزمایشات دارای یک سیگنال هدف‌یابی ماتریکس در انتهای N خود بوده (قرمز)، و به دنبال آن یک توالی جداکننده که عملکرد خاصی ندارد (سیاه) و دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR)، (آنزیمی که به‌طور معمول در سیتوزول موجود است) قرار می‌گیرد a) وقتی تاخوردگی قطعه DHFR باز شد، پروتئین کایمری از بین دو غشاء به ماتریکس میتوکندری حرکت کرده و سپس سیگنال هدف‌یابی ماتریکس حذف می‌شود. (b) وقتی انتهای C پروتیئن کایمری در اثر پیوند با متوترکسات در حالت تاخورده قفل می‌شود، جابه‌جایی متوقف می‌شود. اگر توالی جداکننده به اندازه کافی طویل باشد که از بین دو کانال عبور کند، در حضور متوترکسات یک حد واسط پایدار انتقال، با توالی هدف‌یابی بریده شده، تولید گردد. (c) انتهای C حد واسط انتقال در ترانسلوکون (d) را می‌توان با انکو به عنوان میتوکندری با آنتی‌بادی‌هایی که به قطعه DHFR متصل می‌شوند و سپس با استفاده از ذرات طلا پوشیده با پروتئین A باکتریایی (که با مولکول‌های آنتی‌بادی غیراختصاصی پیوند می‌شوند) ردیابی کرد (شکل ۹۱ـ۲ را ملاحظه کنید). تصویر میکروسکوپی الکترونی یک نمونه برش خورده نشان‌دهنده ذرات طلا (پیکان‌های قرمز) متصل به حد واسط انتقال در جایگاه تماس بین غشاهای داخلی و خارجی است. جایگاه تماس دیگر (پیکان‌های سیاه) نیز مشهود هستند.

مناسب توالی هدف‌یابی ماتریکس انتهای N و بخش DHFR پروتئین کایمری را جدا کند، اگر پلی‌پپتید اندازه کافی به ماتریکس نفوذ کرده باشد تا جلوی برداشت زنجیره پلی‌پپتیدی به سمت سیتوزول را بگیرد، در حضور متوترکسات اگر پلی ببیند به اندازه کافی در ماتریکس نفوذ کرده باشد تا جلوی برگشت زنجیره پلی پپتیدی را به سمت سیتوزول بگیرد یک حد واسط انتقال که از دو غشاء در حال عبور است می‌تواند به دام بیافتد. این حد واسط بوسیله Hsc70 ماتریکس پایدار می‌شود (شکل b ۲۴ـ۱۳). برای تشکیل چنین حد واسطهای پایدار انتقال، توالی جداکننده باید به اندازه کافی طویل باشد تا از دو غشاء عبور کند؛ یک جداکننده ۵۰ اسیدآمینه‌ای با حداکثر طول خود برای این عمل کافی است. اگر کایمر حاوی یک جداکننده کوتاهتر (۳۵ اسیدآمینه) باشد، حد واسط انتقال پایدار به دست نمی‌آید زیرا این فاصله نمی‌تواند از دو غشاء عبور کند. این مشاهدات شواهد بیشتری بر این شد که پروتئین‌های منتقل شده می‌توانند بصورت تانخورده از غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری عبور کنند.

مطالعات میکروسکوپی بر روی حدواسطهای پایدار انتقال نشان داد آنها در مناطقی جمع می‌شوند که غشاهای داخلی و خارجی میتوکندریایی به هم نزدیک شده‌اند و بیانگر این است که پروتئین‌های پیش‌ساز فقط در چنین مناطقی وارد می‌شوند (شکل c ۲۴-۱۳). فاصله از سمت سیتوزولی غشاء خارجی تا سمت ماتریکس غشاء داخلی در مناطق تماس، با طول مورد نیاز از توالی جداکننده در حالت تانخورده، برای تشکیل حد واسط پایدار انتقال مطابقت دارد. به

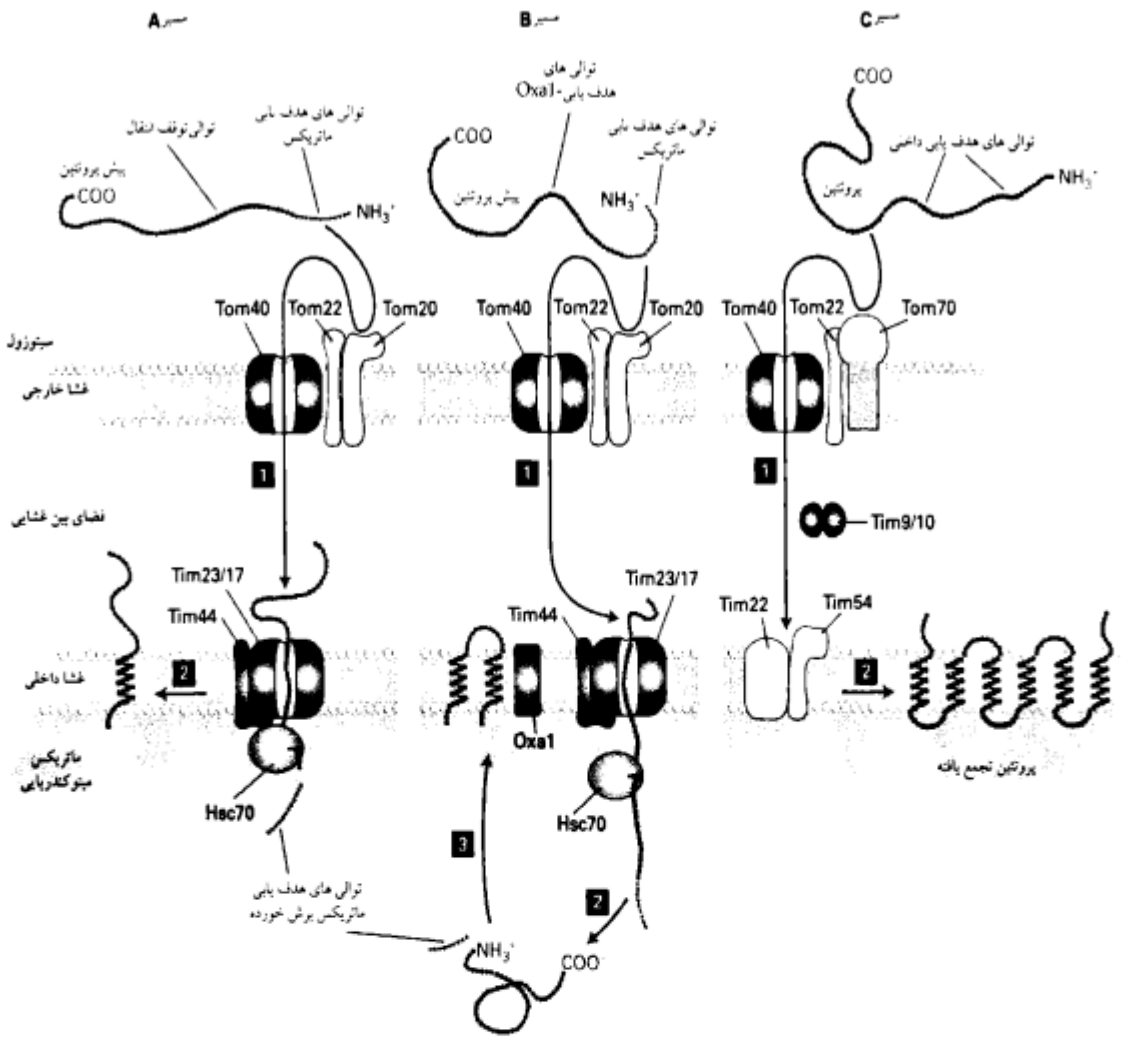


▲ **شکل ۱۳ـ۲۵(شکل رنگی)توالی‌های هدف‌یابی در پروتئین‌های میتوکندریایی وارد شده.** اکثر پروتئین‌های میتوکندریایی دارای یک توالی هدف‌یابی ماتریکس در انتهای N هستند (صورتی) که در پروتئین‌های مختلف مشابه بوده و اما یکسان نیستند. پروتئین‌های تعیین شده برای غشای داخلی، (فضای بین غشایی)، یا غشای خارجی یک یا چند توالی هدف‌یابی دارند از طریق چندین مسیر متفاوت پروتئین‌ها را به این موقعیت‌ها هدایت می‌کنند. نامگذاری مسیرها براساس شکل‌های ۱۳ـ۲۶ و ۱۳ـ۲۷ صورت گرفته است.

علاوه حد واسط‌های پایدار انتقال می‌توانند با زیر واحدهای پروتئینی تشکیل‌دهنده کانال‌های انتقال در غشاهای داخلی و خارجی پیوند شیمیایی برقرار کنند. این یافته ثابت می‌کند پروتئین‌های انتقال یافته می‌توانند به صورت همزمان کانال‌های غشای داخلی و خارجی میتوکندری را هم چنان که در شکل ۱۳ـ۲۳ نشان داده شده است، مشغول کنند. از آن جایی که حدود ۱۰۰۰ پروتئین کایمری را می‌توان در یک میتوکندری مخمر مشاهده کرد، عقیده بر این است که در میتوکندری تقریباً ۱۰۰۰ منفذ ورود عمومی برای جذب پروتئین‌های میتوکندریایی وجود دارد.

سه ورودی انرژی برای وارد کردن پروتئین‌ها به میتوکندری‌ها مورد نیاز است

همان‌طور که قبلاً گفته شد و در شکل ۱۳ـ۲۳ مشخص گردید، هیدرولیز ATP توسط پروتئین‌های چاپرونی Hsc70 در سیتوزول



▲ **شکل ۲۶-۱۳ سه مسیر جهت ورود پروتئین به غشاء داخلی میتوکندریایی از سیتوزول.** پروتئین‌ها با توالی‌های هدف‌یابی مختلف از مسیرهای مختلف به غشای داخلی هدایت می‌شوند. در تمام سه مسیر، پروتئین‌ها از طریق منفذ ورودی عمومی Tom40 از غشاء خارجی عبور می‌کنند. پروتئین‌های تحویل شده از طریق مسیرهای A و B شامل یک توالی هدف‌یابی ماتریکس در انتهای N بوده و توسط گیرنده ورودی Tom20/22 در غشای خارجی شناسایی می‌شود. با این که هر دو مسیر از کانال غشای داخلی Tim23/14 استفاده می‌کنند، از این جهت متفاوتند که در مسیر B کل پیش‌ساز پروتئین وارد ماتریکس می‌شود و سپس دوباره به سمت غشای داخلی هدایت می‌شود. Hsc70 ماتریکس، نقشی مشابه نقش خود در ورود پروتئین‌های محلول ماتریکس بازی می‌کند (شکل ۲۳-۱۳ را ملاحظه کنید). پروتئین‌هایی که از طریق مسیر C تحویل می‌شوند شامل توالی‌های داخلی بوده و توسط گیرنده ورودی Tom70/Tom22 تشخیص داده می‌شوند؛ یک کانال انتقال متفاوت در غشای داخلی (Tim22/54) در این مسیر استفاده می‌شود. دو پروتئین از غشای (Tim10 و Tim9) انتقال بین کانال‌های داخلی و خارجی را تسهیل می‌کنند. برای توضیح بیشتر به متن مراجعه کنید.

و ماتریکس میتوکندری برای وارد کردن پروتئین‌های میتوکندریایی لازم است. Hsc70 سیتوزولی انرژی مصرف می‌کند تا به پیش‌سازهای پروتئینی در حالت تانخورده که آماده ورود به ماتریکس هستند، متصل باقی بماند. اهمیت ATP برای این عمل در مطالعاتی مشخص شد که در آن پروتئین پیش‌ساز میتوکندریایی تخلیص و سپس در اثر اوره دناتوره شد. وقتی در سیستم انتقال میتوکندریایی بدون سلول آزمایش انجام گرفت، پروتئین دناتوره شده در غیاب ATP به ماتریکس وارد شد. در مقابل، وارد شدن پروتئین تاخورده برای عمل طبیعی چاپرون‌های سیتوزولی به ATP نیازمند است. چاپرون‌های سیتوزولی پروتئین تاخورده را باز می‌نمایند.

اتصال یافتن و آزاد شدن و وابسته به ATP چندین مولکول Hsc70 ماتریکس برای جابجایی پروتئین ممکن است به سادگی

پروتئین تانخورده در ماتریکس به دام اندازد. همچنین، Hsc70 ماتریکس، که توسط پروتئین Tim44 به غشاء متصل شده است، می‌تواند به عنوان موتور مولکولی عمل کند تا پروتئین را به سمت ماتریکس هل دهد (شکل ۲۳ـ۱۳ را ملاحظه کنید). در این حالت، عملکردهای Hsc70 ماتریکس و Tim44 به ترتیب شبیه به چاپرون‌های BiP و کمپلکس Sec63 در انتقال پس از ترجمه در لومن ER است. (شکل ۹ـ۱۳ را ملاحظه کنید).

سومین ورودی انرژی که برای وارد شدن پروتئین لازم است، شیب الکتروشیمیایی H^+ یا **نیروی محرکه پروتون**[1] از غشاء داخلی است. از فصل ۱۲ به یاد بیاورید در طول انتقال الکترون پروتون‌ها از ماتریکس به فضای بین دو غشاء پمپ شده و در غشاء داخلی باعث تولید پتانسیل غشایی شوند. در کل تنها میتوکندری‌هایی که از لحاظ تنفس فعال بوده و بنابراین نیروی محرکه پروتون را در غشاء داخلی تولید می‌نمایند، قادر به انتقال پروتئین‌های پیش‌ساز از سیتوزول به ماتریکس میتوکندری می‌باشند. تیمار میتوکندری با مهارکننده‌ها یا جدا کننده‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو، مثل سیانید، دی‌نیتروفنل، این نیروی محرکه پروتون را به هم می‌ریزد. با این که پیش‌سازهای پروتئینی هنوز می‌توانند در این میتوکندری‌های مسموم با قدرت به گیرنده‌ها متصل شوند، اما پروتئین‌ها در سلول‌های دست نخورده یا در سیستم‌های بدون سلول، حتی در حضور ATP و چاپرون‌های پروتئینی نمی‌توانند وارد شوند. دانشمندان هنوز به خوبی متوجه نشده‌اند که نیروی محرکه پروتون چگونه ورود پروتئین را به ماتریکس تسهیل می‌کند. هنگامی که یک پروتئین به‌طور نسبی وارد غشاء داخلی شد، در معرض پتانسیل بین غشایی ۲۰۰ mV قرار می‌گیرد (فضای منفی ماتریکس)، این اختلاف پتانسیل به ظاهر کوچک، وقتی در بین هسته خیلی باریک آبگریز دو لایه لیپیدی قرار می‌گیرد، شیب الکتریکی فراوانی برابر با حدود ۴۰۰/۰۰۰ V/cm تولید می‌کند. یک نظریه این است که بارهای مثبت در توالی هدف‌یابی ماتریکس آمفی‌پاتیک می‌توانند به سادگی توسط پتانسیل الکتریکی منفی درون غشایی، به فضای ماتریکس هل داده (الکتروفورز) شوند.

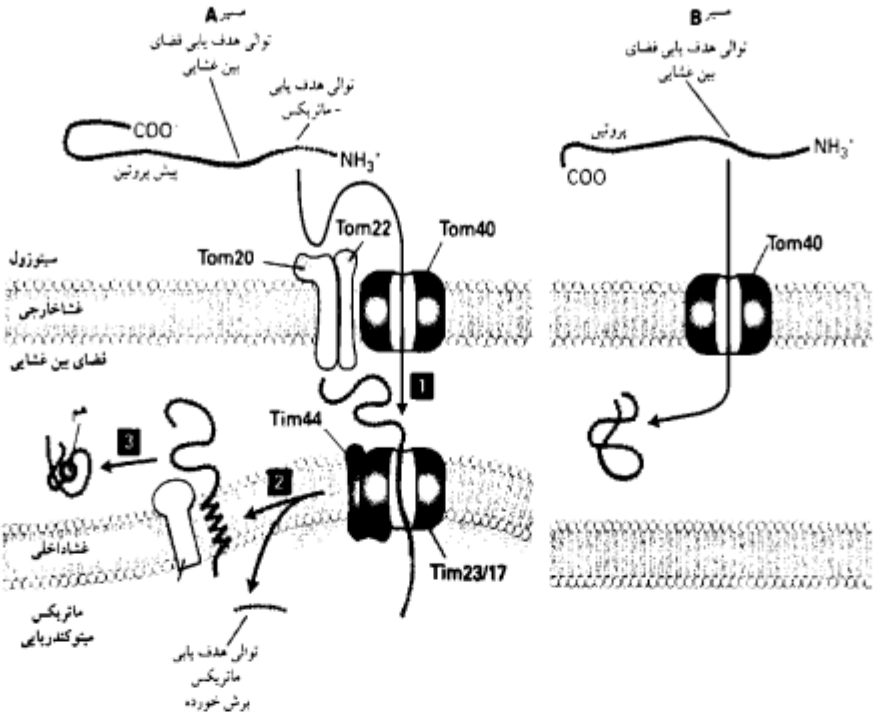
سیگنال‌ها و مسیرهای چندگانه پروتئین‌ها را به زیر اجزای درون میتوکندریایی هدف‌دهی می‌کنند

بر خلاف هدف‌یابی به ماتریکس، هدف‌یابی پروتئین‌ها به فضای بین غشایی، غشای داخلی و غشای خارجی میتوکندری معمولاً به بیش از یک توالی هدف‌یابی نیاز داشته و توسط یکی از چند مسیر صورت می‌گیرد. در شکل ۲۵ـ۱۳ خلاصه‌ای از سازماندهی توالی‌های هدف در پروتئین‌هایی که قرار است به نقاط مختلف میتوکندری بروند، آورده شده است.

پروتئین‌های غشای داخلی. سه مسیر جداگانه شناخته شده است که از طریق آن پروتئین به غشاء داخلی میتوکندری هدف‌یابی می‌شود. یکی از این مسیرها از همان امکاناتی که برای هدف‌یابی پروتئین‌های ماتریکس به کار می‌رود استفاده می‌کند (شکل ۲۶ـ۱۳ مسیر A). زیر واحد سیتوکروم اکسیداز به نام CoxVa یک پروتئین است که از طریق این مسیر انتقال داده می‌شود. فرم پیش‌ساز CoxVa، شامل یک توالی هدف‌یابی ماتریکس در انتهای N بوده و توسط گیرنده ورودی Tom20/22 تشخیص داده شده و از طریق منفذ ورودی عمومی غشاء خارجی و کمپلکس انتقال Tim23/17 از غشاء داخلی، منتقل می‌شود. علاوه بر توالی هدف‌یابی ماتریکس، که در طول وارد شدن بریده می‌شود، CoxVa شامل یک توالی توقف انتقال آبگریز هم هست. در حین عبور پروتئین از کانال Tim23/17 توالی توقف انتقال از انتقال انتهای ـ C از غشاء داخلی جلوگیری می‌کند. سپس حد واسط متصل به غشاء مثل ورود پروتئین‌های سرتاسری نوع I در غشاء ER به صورت جانبی به غشاء داخلی منتقل می‌شود. (شکل ۱۱ـ۱۳).

دومین مسیر برای ورود به غشاء داخلی توسط پروتئین‌هایی (مثلاً زیر واحد ۹ از ATP سنتاز) است که پیش‌سازهای آنها هم دارای توالی هدف‌یابی ماتریکس بوده و هم نواحی آبگریز داخلی دارند که توسط پروتئین غشاء داخلی به نام **Oxa1** شناسایی می‌شوند. به نظر می‌رسد در این مسیر حداقل قسمتی از پیش‌ساز از طریق کانال‌های Tom40 و Tim23/17، به ماتریکس منتقل می‌شود. بعد از برش توالی هدف‌یابی ماتریکس، پروتئین از طریق فرآیندی که نیازمند میانکنش با Oxa1 و شاید دیگر پروتئین‌های غشای داخلی باشد، به غشاء داخلی وارد می‌شود (شکل ۲۶ـ۱۳، مسیر B). Oxa1 با یک پروتئین باکتریایی درگیر در وارد کردن برخی پروتئین‌های غشاء داخلی در باکتری مرتبط است. این همبستگی و ارتباط بیان می‌کند که Oxa1 احتمالاً از ماشین انتقال در باکتری درون همزیستی حاصل شده باشد که در نهایت تبدیل به میتوکندری شده است. به هر حال، پروتئین‌های تشکیل‌دهنده کانال‌های غشاء

1- Proton - Motive force



▲ **شکل ۲۷-۱۳ دو مسیر برای ورود به فضای بین غشایی میتوکندری.** مسیر A، مسیر اصلی برای تحویل پروتئین‌ها از سیتوزول به فضای بین غشایی بوده و مشابه مسیر A برای تحویل به غشای داخلی است (شکل ۲۶-۱۳ را ملاحظه کنید). تفاوت اصلی این است که توالی هدف‌یابی داخلی در پروتئین‌هایی مثل سیتوکروم b_2، که مقصدشان فضای بین غشایی است، توسط پروتئاز غشای داخلی شناخته شده و پروتئین را در سمت فضای بین غشایی، غشاء برش می‌زند. سپس پروتئین رها شده در فضای بین غشایی، تاخورده و به کوفاکتور هم متصل می‌شود. مسیر B شامل تحویل مستقیم به فضای بین غشایی از طریق منفذ ورودی عمومی Tom40 در غشای خارجی است.

داخلی در میتوکندری‌ها با پروتئین‌های ترانسلوکون‌های باکتریایی مرتبط نیستند. Oxa1 هم چنین در ورود به غشاء داخلی پروتئین‌های خاصی (مثلاً زیر واحد II سیتوکروم اکسیداز) که توسط DNA میتوکندریایی رمزدهی شده و در ماتریکس توسط ریبوزوم‌های میتوکندریایی سنتز می‌شوند نیز شرکت می‌کند.

مسیر نهایی برای ورود به غشاء داخلی میتوکندریایی توسط پروتئین‌های چند گذره صورت می‌گیرد که مثل آنتی‌پورتر ADP/ATP شامل ۶ ناحیه عبورکننده از غشاء هستند. این پروتئین‌ها فاقد توالی معمول انتهای N بوده و حاوی چندین توالی داخلی هدف‌یابی میتوکندریایی هستند. بعد از این که توالی‌های داخلی توسط دومین گیرنده ورود متشکل از، Tom70 و Tom22 شناسایی شد، پروتئین وارد شده از غشاء خارجی از طریق منفذ ورودی عمومی عبور می‌کند (شکل ۲۶-۱۳، مسیر C). پروتئین سپس به دومین کمپلکس انتقال در غشاء داخلی متشکل از پروتئین Tim22 و Tim54 می‌رود. انتقال به کمپلکس Tim22/54 به یک کمپلکس چند زیرواحدی از دو پروتئین کوچک، (Tim9 و Tim10) که در فضای بین غشایی جای می‌گیرد، بستگی دارد.

به نظر می‌رسد پروتئین‌های Tim کوچک، مانند چاپرون‌ها عمل کرده و پیش‌سازهای پروتئینی وارد شده از منفذ ورودی عمومی را به کمپلکس Tim22/54 در غشاء داخلی هدایت نموده و از طریق برقراری پیوند با نواحی آبگریز آنها، از تشکیل توده‌های نامحلول در محیط آبی فضای بین غشایی ممانعت می‌کنند. در نهایت کمپلکس Tim22/54 مسئول وارد نمودن چندین قطعه آبگریز و در پروتئین‌های ورودی، به غشاء داخلی است.

پروتئین‌های فضای بین غشایی. دو مسیر، پروتئین‌های سیتوزولی را به فضای موجود در بین دو غشاء داخلی و خارجی میتوکندری تحویل می‌دهند. در مسیر اصلی که توسط پروتئین‌ها انجام می‌شود (مثل، سیتوکروم b_2) پیش‌سازها دو توالی مختلف هدف‌یابی انتهای N دارند، که هر دوی آنها در نهایت بریده می‌شوند. اغلب در انتهای N هر دو توالی یک توالی هدف‌یابی ماتریکس است که توسط پروتئاز ماتریکس حذف می‌شود. توالی دوم هدف‌یابی یک قطعه آبگریز بوده

و انتقال کامل پروتئین از غشاء داخلی را متوقف می‌کند (شکل ۲۷ـ۱۳، مسیر A). بعد از این‌که حد واسط حاصل جای گرفته در غشاء به صورت جانبی از کانال انتقالی Tim23/17 انتشار یافت، یک پروتئاز در غشاء پروتئین را در نزدیکی قطعه آبگریز عبورکننده از غشاء برش زده و پروتئین بالغ را به شکل محلول در فضای بین غشایی رها می‌کند. به استثنای برش پروتئولیزی دوم، این مسیر مشابه پروتئین‌های غشای داخلی همچون CoxVa است (شکل ۲۶ـ۱۳، مسیر A را ملاحظه کنید).

سیتوکروم C هم لیاز، آنزیم مسئول اتصال کووالانت هم به سیتوکروم C، بیانگر دومین مسیر هدف‌یابی به فضای بین غشایی است. در این مسیر، پروتئین وارد شده دارای توالی هدف‌یابی ماتریکس در انتهای N نبوده و مستقیماً از طریق منفذ ورودی عمومی بدون دخالت فاکتورهای انتقال غشای درونی به فضای بین غشایی هدایت می‌شود (شکل ۲۷ـ۱۳، مسیر B). چون انتقال از طریق منفذ ورودی عمومی Tom40 با هیچ فرآیندی انرژی‌زایی نظیر هیدرولیز ATP یا GTP همراه نشده، مکانیسمی که باعث انتقال یک‌طرفه از طریق غشاء خارجی می‌شود، شناخته نشده است. یک احتمال این است که سیتوکروم C هم لیاز از طریق غشاء خارجی انتشار یافته و سپس با پیوند به یک پروتئین دیگر که از طریق یکی از مکانیسم‌های شرح داده شده به فضای بین غشایی آمده است، در فضای بین غشایی به دام می‌افتد.

پروتئین‌های غشای خارجی. بسیاری از پروتئین‌هایی جای گرفته در غشای خارجی میتوکندری همچون خود حفره Tom40 و پورین میتوکندریایی، دارای ساختار بشکه β بوده و در آن رشته‌های آنتی‌پارالل که کانال مرکزی را احاطه می‌کنند، قطعات آبگریز عبور کننده از غشاء را شکل می‌دهند چنین پروتئین‌هایی از طریق اولین میانکنش با منفذ ورودی عمومی Tom40 به غشاء خارجی وارد شده و سپس به کمپلکسی به اسم SAM (**ماشین چینش و تجمع**[1]) منتقل می‌شود، SAM حداقل از سه پروتئین غشاء خارجی تشکیل شده است. احتمالاً ماهیت خیلی پایدار آبگریز پروتئین‌های بشکه β در نهایت باعث می‌شود که آنها بصورت پایدار در غشاء خارجی قرار گیرند، اما این که دقیقاً چگونه کمپلکس SAM باعث تسهیل این فرآیند می‌شود، شناخته نشده است.

هدف‌یابی پروتئین‌ها به استرومای کلروپلاست مشابه وارد شدن پروتئین‌های ماتریکس میتوکندری است

در میان پروتئین‌هایی که در استرومای کلروپلاست یافت می‌شوند، آنزیم‌های چرخهٔ کالوین مشاهده می‌شوند، که عملکرد آنها تثبیت دی‌اکسیدکربن به صورت کربوهیدرات در طول فتوسنتز است (فصل ۱۲). زیر واحد بزرگ (L) ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز (Rubisco، روبیسکو) توسط DNA کلروپلاستی رمزدهی می‌شود و در ریبوزوم‌های فضای استرومای کلروپلاستی سنتز می‌گردد. زیر واحد کوچک (S) روبیسکو و آنزیم‌های دیگر چرخه کالوین توسط ژن‌های هسته‌ای رمزدهی شده و بعد از سنتز در سیتوزول به کلروپلاست منتقل می‌شوند. فرم پیش‌ساز این پروتئین‌های استرومایی حاوی یک **توالی ورود به استروما**[2] است (جدول ۱۱ـ۱۳).

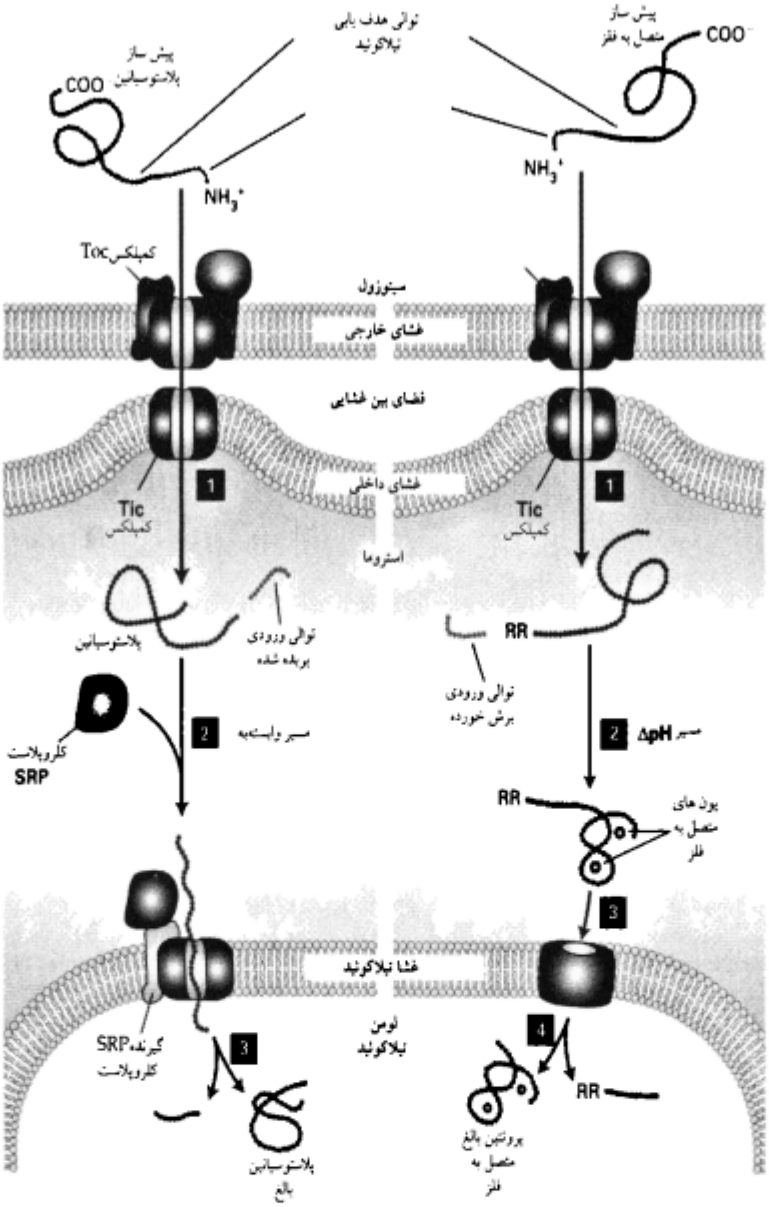
آزمایشات بر روی کلروپلاست‌های جدا شده، همانند آزمایشات بر روی میتوکندری‌ها در شکل ۲۲ـ۱۳ نشان داده شده که بیان کرد که آنها می‌توانند پیش‌ساز زیر واحد S را بعد از سنتز وارد کنند. بعد از این که پیش‌ساز تانخورده وارد فضای استرومایی شد، به صورت ناپایدار و گذرا با چاپرون Hsc70 استرومایی اتصال یافته و توالی انتهای N بریده می‌شود. در واکنش‌هایی که چاپرونین‌های Hsc60 موجود در فضای استروما، تسهیل‌کننده آنها هستند، هشت زیر واحد S با هشت زیر واحد L تجمع یافته و آنزیم فعال روبیسکو تولید می‌شود.

فرآیند کلی ورود استرومایی به نظر خیلی مشابه وارد شدن پروتئین‌ها به ماتریکس میتوکندریایی است (شکل ۲۳ـ۱۳ را مطالعه کنید.). حداقل سه پروتئین غشاء خارجی کلروپلاست، شامل یک گیرنده که به توالی ورود به استرما متصل می‌شود و، یک کانال انتقال پروتئین و پنج پروتئین غشاء داخلی شناخته شده‌اند که برای هدایت پروتئین‌ها به سمت استروما ضروری هستند. این پروتئین‌ها از نظر عملکردی با گیرنده‌ها و کانال‌های پروتئینی در غشاء میتوکندری مشابه هستند اما از نظر ساختاری همولوگ نمی‌باشد. فقدان توالی‌های مشابه بین این پروتئین‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی بیان می‌کند که آنها احتمالاً در طول زمان به‌طور مستقل تکامل یافته‌اند.

شواهد موجود بیان می‌کند که پروتئین‌های استرومایی کلروپلاست، مشابه پروتئین‌های ماتریکس میتوکندریایی در حالت تانخورده وارد می‌شوند. وارد شدن به استروما به هیدرولیز ATP وابسته بوده و توسط چاپرون Hsc70 استرومایی که عمل آن مشابه Hsc70 در ماتریکس میتوکندری و BiP در لومن ER است کاتالیز می‌شود.

1- Sorting assembly Machinery

2- Stroma - Import sequences



▲ **شکل ۱۳.۲۸ انتقال پروتئین‌ها به تیلاکوئیدهای کلروپلاست.** در این‌جا دو مسیر از چهار مسیر انتقال پروتئین‌ها از سیتوزول به لومن تیلاکوئیدها نشان داده شده است. در این مسیرها پیش‌سازهای تاخورده از طریق همان پروتئین‌های خارجی که پروتئین‌های واقع در استروما را وارد می‌کنند، به استروما تحویل داده می‌شوند. برش توالی انتهای N ورود به استروما در مرحله بعدی توسط پروتئاز استرومایی توالی هدف‌یابی تیلاکوئید را آشکار می‌کند (مرحله ❶). از این‌جا دو مسیر از هم جدا می‌شوند. در مسیر وابسته به SRP (چپ)، پلاستوسیانین و پروتئین‌های مشابه توسط یک سری چاپرون‌ها (در تصویر نشان داده نشده) در فضای استرومایی در حالت تاخورده نگهداری می‌شده، و توسط توالی هدف‌یابی تیلاکوئید هدایت می‌شوند. این توالی به پروتئین‌هایی متصل می‌شود که در ارتباط نزدیکی با SRP باکتریایی، گیرنده SRP و ترانسلوکون SecY، بوده و میانجی حرکت به لومن هستند (مرحله ❷). بعد از بریده شدن توالی هدف‌یابی تیلاکوئید توسط یک اندوپروتئاز جداگانه در لومن تیلاکوئید، پروتئین به شکل فضایی بالغ خود در می‌آید (مرحله ❸). در مسیر وابسته به pH (راست)، پروتئین‌های متصل به فلز در استروما تاخورده و کوفاکتورهای ردوکس (Redox) به کمپلکس اضافه می‌شوند. (مرحله ❷). دو اسید آمینه آرژنین (RR) در انتهای N توالی هدف‌یابی تیلاکوئید و شیب pH در عرض غشاء داخلی برای انتقال پروتئین تاخورده به لومن تیلاکوئید لازم هستند (مرحله ❸). ترانسلوکون در غشاء تیلاکوئید حداقل از چهار پروتئین مرتبط با پروتئین‌های غشای داخلی باکتریایی تشکیل شده است. توالی هدف‌یابی تیلاکوئید، حاوی دو اسید آمینه آرژنین، در لومن تیلاکوئید بریده می‌شود (مرحله ❹).

بر خلاف میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها شیب الکتروشیمیایی (نیروی محرکه پروتون) در غشای داخلی خود تولید نمی‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد وارد شدن پروتئین به استروما فقط در اثر نیروی هیدرولیز ATP صورت می‌گیرد.

پروتئین‌ها از طریق مکانیسم‌های مرتبط با انتقال از میان غشاء داخلی باکتریایی، به تیلاکوئیدها هدف‌یابی می‌شوند

کلروپلاست‌ها علاوه بر غشای دو لایه‌ای که آنها را احاطه کرده، دارای یک سری کیسه‌های غشایی داخلی مرتبط با هم به نام **تیلاکوئیدها**[1] (شکل ۲۹ـ۱۲ را ملاحظه کنید) هستند. پروتئین‌های واقع در غشاء تیلاکوئید یا لومن، فتوسنتز را به راه می‌اندازند. خیلی از این پروتئین‌ها در سیتوزول به صورت پیش‌سازهایی با چند توالی هدف‌یابی سنتز می‌شوند. برای مثال، پلاستوسیانین و دیگر پروتئین‌های معین شده برای لومن تیلاکوئید نیاز به عمل متوالی دو توالی هدف‌یابی جذب دارند. اولی توالی ورود به استروما در انتهای N است که پروتئین را از همان مسیری ورود زیر واحد S روبیسکو به استروما هدایت می‌کند، توالی دوم پروتئین را از استروما به لومن تیلاکوئید هدف‌دهی می‌کند. نقش این توالی‌های هدف‌یابی با آزمایشاتی مشخص شد که میزان جذب پروتئین‌های جهش یافته از طریق تکنیک‌های DNA نوترکیب را در کلروپلاست‌های جدا شده، اندازه‌گیری می‌کرد. برای مثال، پلاستوسیانین جهش یافته که توالی هدف‌یابی تیلاکوئید نداشته اما دارای توالی ورود استروما می‌باشد، در استروما تجمع یافته و به لومن تیلاکوئید منتقل نمی‌شوند.

چهار مسیر مختلف برای انتقال پروتئین‌ها از استروما به تیلاکوئید، شناخته شده است. تمامی این چهار مسیر ارتباط نزدیکی با مکانیسم انتقال مشابه در باکتری‌ها دارد که این امر بیان‌کننده ارتباط تکاملی نزدیک بین غشای استرومایی و غشاء داخلی باکتریایی است. انتقال پلاستوسیانین و پروتئین‌های مرتبط به لومن تیلاکوئید از استروما توسط مسیر وابسته به SRP کلروپلاستی صورت می‌گیرد که از ترانسلوکونی مشابه SecY (نسخه باکتریایی کمپلکس Sec61) استفاده می‌کند (شکل ۲۸ـ۱۳، چپ). دومین مسیر برای انتقال پروتئین‌ها به لومن تیلاکوئید، شامل یک پروتئین مرتبط با پروتئین باکتریایی SecA است که از انرژی هیدرولیز ATP استفاده می‌کند تا انتقال از طریق ترانسلوکون SecY را انجام دهد. سومین مسیر، در هدف‌یابی پروتئین‌ها به سمت غشاء تیلاکوئید به یک پروتئین مرتبط با پروتئین Oxa1 میتوکندریایی و پروتئین باکتریایی همولوگ آن وابسته است. (شکل ۲۶ـ۱۳، مسیر B را ملاحظه کنید).

برخی از پروتئین‌های رمزدهی شده با DNA کلروپلاستی و سنتز شده در استروما یا منتقل شده از سیتوزول به استروما، از این طریق وارد غشاء تیلاکوئید می‌شوند.

در نهایت، پروتئین‌های تیلاکوئید که به کوفاکتورهای حاوی فلز متصل هستند، از طریق مسیر دیگری به لومن تیلاکوئید وارد می‌شوند (شکل ۲۸ـ۱۳، راست). پیش‌سازهای تاخورده این پروتئین‌ها اول به استروما جهت‌دهی شده و در آنجا توالی انتهای N ورود به استروما بریده شد و سپس پروتئین تاخورده به کوفاکتور متصل می‌شود. مجموعه‌ای از پروتئین‌های غشایی تیلاکوئید به انتقال پروتئین تاخورده و کوفاکتور متصل به لومن تیلاکوئید (فرآیندی که نیروی آن از شیب pH معمول در غشاء تیلاکوئید تأمین می‌شود) کمک می‌کنند. توالی هدف‌یابی تیلاکوئید که پروتئین را به مسیر وابسته به pH هدایت می‌کند شامل دو اسید آمینه آرژنین نزدیک به هم است که برای شناسایی ضروری هستند. سلول‌های باکتریایی نیز دارای مکانیسم برای انتقال پروتئین تاخورده از میان غشاء داخلی، با توالی دارای آرژنین مشابهی هستند. مکانیسم مولکولی که این پروتئین‌های تاخورده کروی از طریق آن وارد غشاء تیلاکوئید می‌شوند، هم‌اکنون تحت مطالعات زیادی قرار دارد.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۳

ارسال پروتئین‌ها به میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها

- اغلب پروتئین‌های میتوکندریایی و کلروپلاستی بوسیله ژن‌های هسته‌ای رمزدهی و بر روی ریبوزوم‌های سیتوزولی سنتز شده و به صورت پس ترجمه‌ای به داخل اندامک‌ها وارد می‌شوند.
- همه اطلاعات مورد نیاز برای هدف‌یابی پروتئین پیش‌ساز از سیتوزول به ماتریکس میتوکندری یا استرومای کلروپلاست در درون توالی هدف‌یابی جذب در انتهای N آن وجود دارد. بعد از ورود پروتئین توالی هدف‌یابی جذب بوسیله پروتئازهای درون ماتریکس یا استروما برداشته می‌شود.
- چاپرون‌های سیتوزولی پیش‌سازهای میتوکندریایی و کلروپلاستی، پروتئین‌ها را در حالت تانخورده نگه می‌دارند. فقط پروتئین‌های تانخورده می‌توانند به داخل اندامک‌ها وارد شوند. انتقال در میتوکندری در جایگاه‌هایی اتفاق می‌افتد که غشاءهای داخلی و خارجی اندامک در نزدیکی هم قرار می‌گیرند.

1- Thylaoids

■ پروتئین‌های مشخص شده برای ماتریکس میتوکندری به گیرنده‌های روی غشاء بیرونی میتوکندری متصل و سپس به منفذ ورودی عمومی در غشاء بیرونی (Tom40) منتقل می‌شوند. انرژی انتقال همزمان از غشاء خارجی و داخلی از نیروی محرکه پروتون در غشاء داخلی و هیدرولیز ATP بوسیله ATP از Hsc70 در ماتریکس حاصل می‌شود (شکل ۲۳-۱۳ راملاحظه کنید).

■ پروتئین‌های ارسال شده به مقاصد میتوکندریایی غیر از ماتریکس معمولاً حاوی دو یا چند توالی هدف‌یابی هستند که یکی از آنها احتمالاً توالی انتهای N هدف‌یابی ماتریکس است (شکل ۲۵-۱۳ راملاحظه کنید).

■ بعضی پروتئین‌های میتوکندری که مقصدشان فضای بین‌دو غشاء یا غشاء داخلی است اول به ماتریکس واردشده و سپس به غشاء داخلی و یا فضای بین غشاء برمی‌گردند. پروتئین‌های دیگر به ماتریکس وارد نشده و مستقیماً به جایگاه نهایی خود می‌روند.

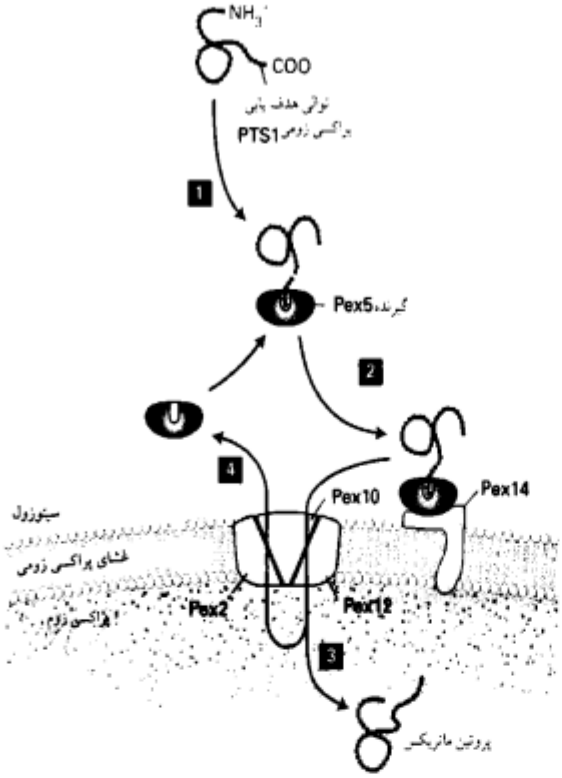
■ ورود پروتئین به درون استرومای کلروپلاست از طریق کانال‌های انتقال غشاء داخلی و غشاء خارجی انجام می‌شود. این کانال‌ها از لحاظ عملکرد شبیه به کانال‌های میتوکندری بوده اما از پروتئین‌های تشکیل شده‌اند که توالی مشابهی با پروتئین‌های مرتبط در میتوکندری ندارند.

■ پروتئین‌های با مقصد تیلاکوئید دارای توالی هدف‌یابی ثانویه هستند. بعد از ورود این پروتئین‌ها به استروما، بریده‌شدن توالی‌های هدف‌یابی استروما توالی‌های هدف‌یابی به تیلاکوئیدها را آشکار می‌سازد.

■ چهار مسیر شناخته‌شده در حرکت پروتئین‌ها از استرومای کلروپلاست به تیلاکوئید شباهت نزدیکی به انتقال از غشاء داخل باکتری دارد (شکل ۲۸-۱۳ را ملاحظه کنید). یکی از این سیستم‌ها می‌تواند پروتئین‌های تاخورده را منتقل نماید.

۱۳-۵ ارسال پروتئین‌های پراکسیزومی

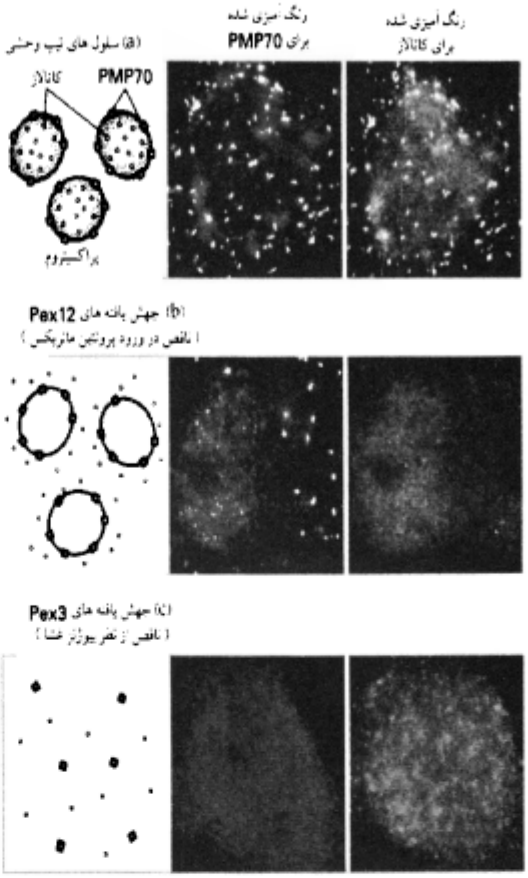
پراکسیزوم‌ها اندامک‌های کوچکی هستند که با یک غشاء احاطه می‌شوند. بر خلاف میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، پراکسیزوم‌ها فاقد DNA و ریبوزوم هستند. در نتیجه تمام پروتئین‌های پراکسیزومی توسط ژن‌های هسته‌ای رمزدهی می‌شوند و بر روی ریبوزوم‌های سیتوزولی سنتز می‌شوند و سپس در ترکیب پرواکسی‌زوم‌های از قبل موجود یا تازه تولید شده شرکت می‌کنند. همان‌طور که در مورد



▲ **شکل ۲۹-۱۳ ورود هدایت شده پروتئین ماتریکس پراکسیزومی.** مرحله (❶): کاتالاز و اغلب پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی، حاوی توالی هدف‌یابی جذب PTS1 در انتهای C (قرمز) بوده و گیرنده سیتوزولی Pex5 متصل می‌شوند. مرحله (❷): Pex5 به همراه پروتئین ماتریکسی، با گیرنده Pex14 واقع در غشاء پراکسیزوم میانکنش می‌دهد. مرحله (❸): سپس کمپلکس پروتئین ـ Pex5 ماتریکس به مجموعه‌ای از پروتئین‌های غشایی منتقل می‌شود (Pex10، Pex12 و Pex2) که برای انتقال به ماتریکس پراکسیزومی از طریق یک مکانیسم ناشناخته ضروری است. مرحله (❹): در برخی نقاط، چه در حین انتقال و چه در لومن، Pex از پروتئین ماتریکس جدا شده و به سیتوزول بر می‌گردد، این فرآیند شامل کمپلکس Pex2/10/12 و پروتئین‌های غشایی و سیتوزولی دیگر بوده و نشان داده نشده است. به یاد داشته باشید که پروتئین‌های تاخورده می‌توانند به پراکسیزوم‌ها منتقل شوند و همچنین توالی هدف‌یابی در ماتریکس حذف نمی‌شود.

میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها رخ می‌دهد، وقتی پرواکسی‌زوم‌ها در اثر اضافه شدن پروتئین (و لیپید) بزرگ می‌شوند، در نهایت تقسیم شده، و اندامک جدید را تشکیل می‌دهند.

اندازه و ترکیب آنزیمی پراکسیزوم‌ها به نسبت انواع مختلف سلول تفاوت قابل توجهی می‌کند. با این حال، تمامی پراکسیزوم‌ها



▲ **شکل ۱۳ـ۳۰ مطالعات وجود مسیرهایی متفاوت برای داخل شدن پروتئین‌های** غشایی و ماتریکس پراکسیزومی نشان می‌دهد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های فلورسانت برای PMP70 در (پروتئین غشاء پراکسیزوم)، و یا با آنتی‌بادی‌های فلورسانت برای کاتالاز، (پروتئین ماتریکس پراکسیزوم) رنگ‌آمیزی شده و سپس در میکروسکوپ فلورسانت مشاهده شدند. (a) در سلول‌های نوع وحشی، هم پروتئین‌های غشایی و هم ماتریکس پراکسیزوم به صورت نقاط واضح قابل رؤیت است. (b) در سلول‌های بیماران دارای Pex12 ناقص، کاتالاز به صورت یکسان در سیتوزول پراکنده است، در حالی که PMP70 به صورت طبیعی در اجسام پراکسیزومی قرار می‌گیرد. (c) در سلول بیماران دارای Pex3 ناقص، غشاهای پراکسیزومی نمی‌توانند تجمع یافته و در نتیجه اجسام پراکسیزومی شکل نمی‌گیرند. بنابراین کاتالاز و PMP70 به صورت غیرمعمول در سیتوزول جای می‌گیرند.

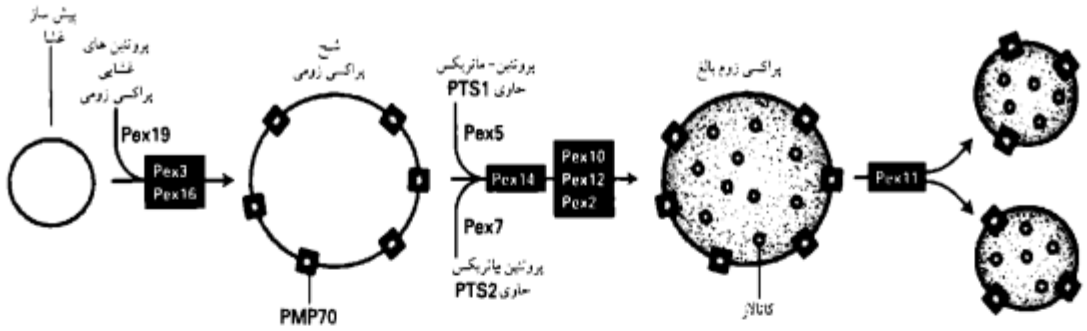
شامل آنزیم‌هایی هستند که از اکسیژن مولکولی برای اکسید کردن سوبستراهای مختلف مثل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب استفاده کرده، و آنها را به اجزای کوچک‌تر خرد نموده و برای استفاده در مسیرهای بیوسنتزی آماده می‌کنند.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید شده در این واکنش‌های اکسیداسیون به شدت فعال بوده و برای اجزای سلولی مضر است؛ پراکسیزوم هم چنین آنزیم‌هایی مثل کاتالاز، دارد که H_2O_2 را به H_2O تبدیل می‌کنند. در پستانداران، پراکسیزوم‌ها به فراوانی در سلول‌های کبد یافت شده و ۱ تا ۲ درصد از حجم سلولی را تشکیل می‌دهند.

گیرنده سیتوزولی پروتئین‌های با توالی SKL در انتهای C را به ماتریکس پراکسیزومی هدف‌دهی می‌کند

وارد شدن کاتالاز و دیگر پروتئین‌ها به پراکسیزوم‌های کبد موش آزمایشگاهی را می‌توان مثل بررسی ورود پروتئین‌های میتوکندریایی (شکل ۱۳ـ۲۲ را ملاحظه کنید در سیستم‌های بدون سلول بررسی کرد. با بررسی پروتئین‌های کاتالاز جهش یافته مختلف در این سیستم، محققان به این نتیجه رسیدند که توالی Ser-Lys-Leu (SKL) یا یک توالی مرتبط در انتهای C برای هدف‌یابی پروتئین لازم است. به علاوه، در سلول‌های کشت داده شده، اضافه کردن توالی SKL به انتهای C پروتئین‌های معمول سیتوزولی باعث هدایت آنها برای جذب در پراکسیزوم‌ها می‌شود. تمامی پروتئین‌های مختلف ماتریکس پراکسیزوم، به جز تعداد کمی، دارای این نوع توالی بوده که به نام توالی هدف‌یابی پراکسیزومی ۱ [1] و یا به‌طور خلاصه PTS1 خوانده می‌شود. مسیر ورود کاتالاز و دیگر پروتئین‌های دارای PTS1 به ماتریکس پراکسیزومی در شکل ۱۳ـ۲۹ نشان داده شده است. PTS1 به پروتئین حامل محلولی در سیتوزول (Pex5) متصل می‌شود، که در طرف مقابل گیرنده‌ای در غشاء پراکسیزوم (Pex14) متصل می‌گردد. به نظر می‌رسد گیرنده ورودی پراکسیزوم که محلول و در ارتباط با غشاء است به جز عملکرد پس ترجمه‌ای پروتئین محلول متصل شونده به PTS1 عملکردی مشابه با SRP و گیرنده SRP در هدف‌یابی به لومن ER دارد. پروتئینی که وارد می‌شود، سپس از طریق کانال انتقالی چند زیرواحدی در حالی که هنوز متصل به Pex5 است (این خصوصیت آن را از ورود پروتئین به لومن ER متمایز می‌سازد) حرکت می‌کند. در یک مرحله و در حین یا بعد از ورود به ماتریکس، Pex5 از پروتئین ماتریکس پراکسیزوم جدا شده و به سیتوپلاسم بر می‌گردد و بازیافت می‌شود. بر خلاف توالی‌های انتهای N هدف‌یابی جذب در پروتئین‌های لومن ER، ماتریکس میتوکندری و استرومای

1- Proxisomal - targeting sequence



▲ **شکل ۱۳ـ۳۱ مدل بیوژنز و تقسیم پراکسیزومی.** اولین مرحله تشکیل از نو و جدید پراکسیزوم‌ها، ترکیب پروتئین‌های غشایی پراکسیزومی با پیش‌ساز غشاهای مشتق شده از ER است. Pex19 به عنوان گیرنده برای توالی‌های هدف‌یابی غشاء عمل می‌کند. Pex3 و Pex16 برای ورود مناسب پروتئین‌ها به غشاهای در حال تشکیل پراکسیزومی مورد نیاز هستند. ورود تمامی پروتئین‌های غشایی پراکسیزوم یک شبح پراکسیزومی را تولید می‌کند که قادر به وارد کردن پروتئین‌های هدف‌یابی شده به ماتریکس است. مسیرهای ورود پروتئین‌های ماتریکس حاوی ـ PTS1 و ـ PTS2 تنها از جهت مشابهت گیرنده سیتوزولی (به ترتیب Pex5 و Pex7) که به توالی هدف‌یابی متصل می‌شود (شکل a ۲ـ۱۳ را ملاحظه کنید) تفاوت دارند. ترکیب کامل پروتئین‌های ماتریکس موجب تولید یک پراکسیزوم بالغ می‌شود. تکثیر پراکسیزوم‌ها نیازمند تقسیم پراکسیزوم‌های بالغ است، این فرآیند به پروتئین Pex11 وابسته می‌باشد.

کلروپلاست، توالی PTS1 بعد از ورود به پراکسیزوم، از پروتئین بریده نمی‌شود. وارد شدن پروتئین‌ها به پراکسیزوم نیازمند هیدرولیز ATP است، اما هنوز مشخص نیست که چگونه انرژی آزاد شده از ATP برای انتقال یک‌طرفه از بین غشاء پراکسیزومی استفاده می‌شود.

ماشین ورودی پراکسیزوم، بر خلاف بیشتر سیستم‌هایی میانجی ورود پروتئین به ER، میتوکندری و کلروپلاست، می‌تواند پروتئین‌های تاخورده را از غشاء منتقل کند. برای مثال، کاتالاز قبل از اتصال به غشاء پراکسیزوم، در سیتوپلاسم تاخورده و به گروه هم متصل می‌شود. مطالعات در سیستم بدون سلول نشان داد ماشین ورود پراکسیزوم می‌تواند ذرات ماکرومولکولی بزرگ، همچون ذرات طلا به قطر حدود ۹ نانومتر را تا زمانی که دنباله PTS1 به آن متصل شده است، منتقل کند. با این حال، غشاهای پراکسیزومی به نظر نمی‌آید همچون منافذ هسته‌ای که در فصل آینده توصیف خواهند شد، ساختارهای منفذی پایدار بزرگ داشته باشند. مکانیسم اساسی انتقال پروتئین ماتریکس پراکسیزومی هنوز به خوبی شناخته نشده‌است اما بطور وسیع در حال بررسی است. برخی از مکانیسم‌های تحت بررسی شامل این ایده هستند که پروتئین‌های غشایی پراکسیزوم Pex10، Pex12 و Pex2 امکان دارد تجمع یافته و یک کانال عبورکننده غشاء، نسبتاً بزرگ را تشکیل دهند که دهانه آن حدود ۱۵ـ۱۰ نانومتر است (برای مقایسه، کانالی که توسط کمپلکس Sec61 تشکیل می‌شود دهانه با حداکثر ۲nm قطر دارد). همچنین Pex5 متصل به مولکول‌های محموله حاوی PTS1 ممکن است کمپلکس‌های الیگومر جای گرفته در غشاء پراکسیزوم تشکیل دهد.

براساس این ایده، خرد شدن وابسته به ـ ATP در کمپلکس، ممکن است مولکول‌های محموله را به ماتریکس پراکسیزوم رها کرده و Pex5 به سیتوزول آزاد شود تا دور دیگری از ورود محموله را تکمیل کند.

تعداد کمی از پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی همانند تیولاز به عنوان پیش‌سازهایی با توالی هدف‌یابی جذب به نام PTS2 سنتز می‌شوند. این پروتئین‌ها به پروتئین‌های گیرنده سیتوزولی مختلفی متصل می‌شوند، اما به نظر می‌رسد وارد شدن آنها توسط مکانیسمی مشابه با پروتئین‌های حاوی PTS1 صورت می‌گیرد.

پروتئین‌های غشاء و ماتریکسی پراکسیزومی از طریق مسیرهای مختلفی وارد غشاء می‌شوند.

جهش‌های اتوزومی مغلوب که باعث تجمع ناقص پراکسیزوم‌ها می‌شود، به صورت طبیعی در جمعیت‌های انسانی رخ می‌دهد. چنین نقصان‌هایی می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های تکوینی مرتبط با ناهنجاری جمجمه‌ای شود. به عنوان مثال در **سندرم زلویگر**[1] و ناهنجاری‌های مرتبط، انتقال اغلب پروتئین‌ها به ماتریکس پراکسیزومی مختل شده و آنزیم‌های پراکسیزومی تازه سنتز شده در سیتوزول باقی مانده و در نهایت تجزیه می‌شوند. بررسی ژنتیکی سلول‌های کشت داده شده از بیماران زلویگر و از سلول‌های مخمر حاوی جهش‌های مشابه، بیش از ۲۰ ژن را مشخص ساخت که برای بیوژنز پراکسیزوم لازم هستند.

1- Zellweger syndrome

مطالعات بر روی جهش یافته‌های تجمع پراکسیزوم نشان داد، در مقایسه با ورود پروتئین‌ها به غشاء پراکسیزوم، مسیرهای مختلفی برای ورود پروتئین‌ها به ماتریکس پراکسیزوم استفاده می‌شود. برای مثال، بررسی سلول‌های بیماران زلویگر موجب شناسایی ژن‌هایی رمزدهی‌کننده پروتئین‌های کانال انتقالی Pex10، Pex12 و Pex2 شد. سلول‌های ناقص در هر کدام از این پروتئین‌ها، نمی‌توانند پروتئین‌های ماتریکس را به پراکسیزوم‌ها وارد نمایند؛ با وجود این، سلول‌ها حاوی پراکسیزوم‌های خالی بوده و دسته‌ای طبیعی از پروتئین‌ها غشاء پراکسیزومی را دارند (شکل b ۳۰ـ۱۳).

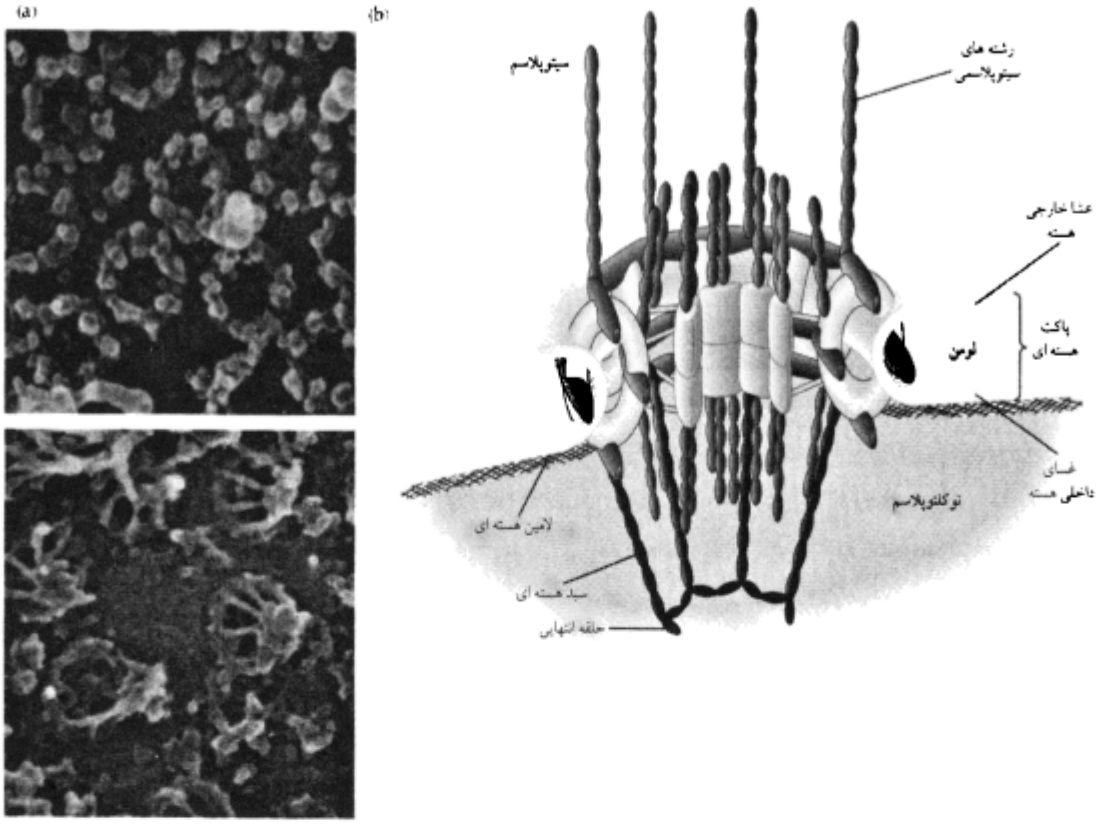
جهش‌ها در هر کدام از سه ژن دیگر همانند پروتئین‌های ماتریکس باعث توقف ورود پروتئین‌های غشایی پراکسیزوم می‌شود (شکل c ۳۰ـ۱۳). این یافته‌ها ثابت می‌کند که یک سری از پروتئین‌ها، پروتئین‌های محلول را به ماتریکس پراکسیزومی منتقل می‌کند اما سری متفاوتی از پروتئین‌ها برای انتقال به غشاء پراکسیزوم لازم است. این وضعیت با وضعیت مشاهده شده در ER، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، بطور چشمگیری متفاوت است. در مورد آنها (ER، میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها) همان‌طور که دیدیم، پروتئین‌های غشایی و محلول در خیلی از اجزای مسیر برای ورود بر این اندامک‌ها مشابه هستند.

با این‌که اکثر پراکسیزوم‌ها از تقسیم اندامک‌های قبلی ایجاد می‌شوند، اما این اندامک‌ها نیز می‌توانند به صورت خود ساخته طی سه مرحله نشان داده شده در شکل ۳۱ـ۱۳ تولید شوند. در این حالت، تجمع پراکسیزوم در ER آغاز می‌گردد. حداقل دو پروتئین غشایی پراکسیزوم یعنی، Pex3، Pex16، از طریق مکانیسمی که در بخش ۲ـ۱۳ نشان داده شد، به غشاء ER وارد می‌شوند. Pex3 و Pex16 پروتئین‌های پراکسیزوم دیگری را همچون Pex19، به کار گرفته و یک ناحیه ویژه در غشاء ER را تشکیل می‌دهند که می‌تواند از ER جوانه زده، جدا شده و غشاء پیش‌ساز پراکسیزومی را تشکیل دهد. بررسی و آنالیز سلول‌های جهش یافته بیان می‌کند که Pex19 پروتئین گیرندهٔ مسئول هدف‌یابی پروتئین‌های غشاء پراکسیزومی است، در حالی که Pex3 و Pex19 برای ورود مناسب آنها به غشاء ضروری هستند. این سه پروتئین به نظر می‌رسد مسئول تجمع پروتئین‌های غشاء پراکسیزومی در پراکسیزوم بالغ و تشکیل از نو پراکسیزوم‌های جدید باشند. وارد شدن پروتئین‌های غشاء پراکسیزومی باعث ایجاد غشایی می‌شود که تمامی اجزای لازم برای ورود پروتئین‌های ماتریکس را داشته و موجب تشکیل پراکسیزوم‌های بالغ و عملکردی می‌شود. تقسیم پراکسیزوم‌های بالغ، (که به میزان وسیعی تعیین‌کننده تعداد پراکسیزوم‌ها در سلول است)، به پروتئین دیگری به نام Pex11 بستگی دارد. بیان زیاد پروتئین Pex11 موجب افزایش زیاد تعداد پراکسیزوم‌ها می‌شود که بیان می‌کند این پروتئین میزان تقسیم پراکسیزوم‌ها را کنترل می‌کند. پراکسیزوم‌های کوچک تولید شده در اثر تقسیم، می‌توانند از طریق مسیرهای ذکر شده، با ورود سایر پروتئین‌هایی غشایی و ماتریکس دیگری، بزرگ شوند.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۳

ارسال پروتئین‌های پراکسیزومی

- همه پروتئین‌های پراکسیزومی روی ریبوزوم‌های سیتوزولی سنتزشده و بعد از ترجمه به داخل اندامک منتقل می‌شوند.
- اغلب پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزوم حاوی توالی هدف‌یابی PTS1 در انتهای C هستند. مقدار کمی از پروتئین‌های ماتریکس نیز حاوی توالی هدف‌یابی PST2 در انتهای N هستند. هیچ‌یک از این توالی‌های هدف‌یابی بعد از ورود بریده نمی‌شوند.
- همه پروتئین‌ها به مقصد ماتریکس پراکسیزوم به یک پروتئین حامل سیتوزولی متصل شده (این حامل بین پروتئین‌های حاوی PTS1 و PST2 تمایز قائل می‌شود) و سپس به طرف گیرنده ورود معمول و ماشین انتقال در روی غشاء پراکسیزوم هدایت می‌شوند (شکل ۲۹-۱۳ را ملاحظه کنید).
- انتقال پروتئین‌های ماتریکس از غشاء پراکسیزومی به هیدرولیز ATP وابسته است. اغلب پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزوم در سیتوزول تاخورده و با ساختمان‌فضایی تاخورده از غشاء، عبور می‌کند. این نوع انتقال متفاوت از ورود پروتئین‌ها به داخل اندامک‌هایی همچون ER، میتوکندری و کلروپلاست می‌باشد.
- پروتئین‌ها با مقصد غشاء پراکسیزوم توالی‌های هدف‌یابی متفاوتی نسبت به پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزوم داشته و از طریق مسیر متفاوتی وارد می‌شوند.
- برخلاف میتوکندری و کلروپلاست‌ها، پراکسیزوم‌ها می‌توانند از غشاءهای پیش‌سازی که احتمالاً از ER مشتق شده‌اند و همچنین تقسیم اندامک‌های (پراکسیزوم‌ها) از پیش موجود می‌باشد، ساخته شوند (به شکل ۳۱-۱۳ را ملاحظه کنید).



▲ **شکل ۱۳-۳۲ کمپلکس منفذ هسته‌ای.** (a) پاکت‌های هسته‌ای از هسته‌های بزرگ اووسیت‌های زنوپوس جدا شده، و توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره با لنز انتشاری مشاهده شدند، بالا: نمایی از سمت سیتوپلاسمی که بیان‌کننده شکل هشت وجهی بخش جای‌گرفته در غشاء کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای است. پایین: نمایی سمت نوکلئوپلاسمی نشان‌دهنده سبد هسته‌ای است که از بخش غشایی گسترده شده است. (b) مدل تقاطعی کمپلکس منفذ.

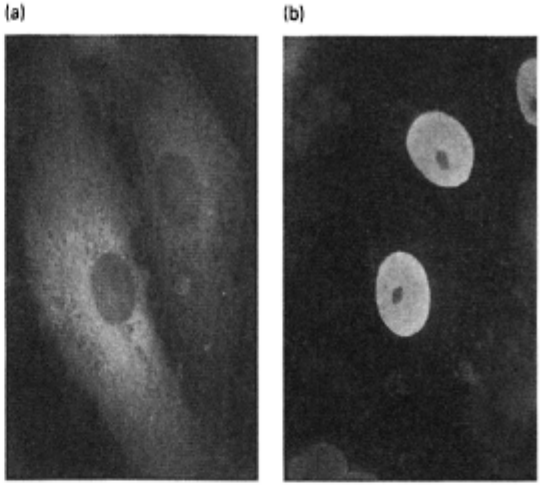
۱۳-۶ انتقال به داخل و خارج از هسته

هسته از سیتوپلاسم به وسیلهٔ دو غشایی که **پاکت هسته‌ای**[1] را تشکیل می‌دهند جدا شده است (شکل ۱-۹ را ملاحظه کنید). پاکت هسته‌ای تا ER ادامه پیدا کرده و بخشی از آن را تشکیل می‌دهد. انتقال پروتئین‌ها از سیتوپلاسم به هسته و حرکت ماکرومولکول‌هایی همچون mRNAها، tRNAها و زیر واحدهای ریبوزومی، به خارج از هسته از طریق **منافذ هسته‌ای** صورت می‌گیرد که در دو غشاء پاکت هسته‌ای قرار می‌گیرند. وارد شدن پروتئین‌ها به هسته از چندین جهت با ورود پروتئین‌ها به دیگر اندامک‌ها مشترک است. مثلاً، پروتئین‌ها هسته‌ای وارد شده، دارای توالی هدف‌یابی ویژه‌ای به نام توالی‌های مکان‌یابی هسته‌ای[2] یا NLSها هستند. پروتئین‌ها بصورت تاخورده وارد هسته می‌شوند و بنابراین ورود هسته‌ای اساساً با انتقال پروتئین از طریق غشاهای ER، میتوکندری و کلروپلاست متفاوت است زیرا در آنها پروتئین‌ها در طول انتقال به حالت باز شده و تانخورده در می‌آیند. در این قسمت ما در مورد مکانیسم‌های اصلی بحث خواهیم کرد که از طریق آن پروتئین‌ها و برخی ریبونوکلئوپروتئین‌ها نظیر ریبوزوم‌ها وارد هسته شده و از آن خارج می‌شوند. ما هم چنین بررسی خواهیم کرد که چگونه mRNAها و دیگر کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئینی از طریق فرآیندی که از نظر مکانیسم با ورود پروتئین‌های هسته‌ای متفاوت است، از هسته خارج می‌شوند.

مولکول‌های کوچک و بزرگ از طریق کمپلکس منافذ هسته‌ای وارد هسته شده و آن را ترک می‌کنند

منافذ بی‌شماری، پاکت هسته‌ای تمام سلول‌های یوکاریوت را منفذدار می‌کنند. هر منفذ هسته‌ای از **ساختار پیچیده‌ای به نام کمپلکس منفذ هسته‌ای**[3] (NPC) ساخته شده که یکی از بزرگ‌ترین تجمعات پروتئینی در سلول است. جرم کل ساختار منفذ در مهره‌داران ۸۰-۶۰ میلیون دالتون بوده و حدود ۱۶ برابر بزرگ‌تر از ریبوزوم است. یک NPC از کپی‌های زیادی از ۳۰ پروتئین مختلف

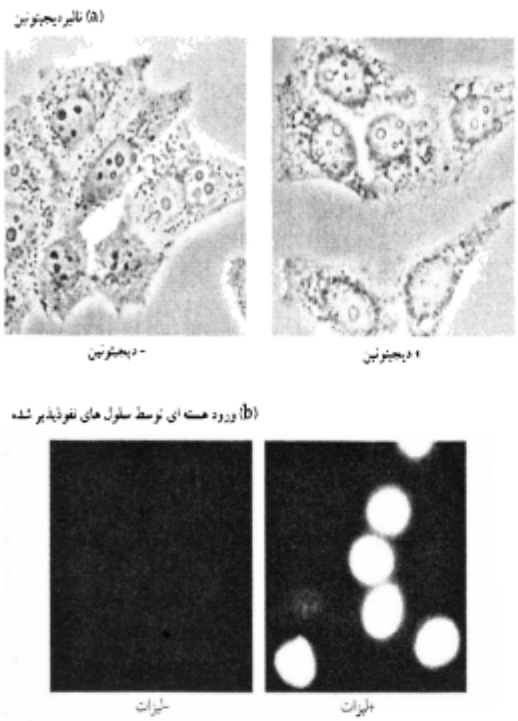
1- Nuclear envelope
2 Nuclear localization sequences
3- Nuclear pore Complex



▲ **شکل تجربی ۳۳-۱۳ سیگنال مکان‌یابی - هسته‌ای (NLS) پروتئین‌ها را به سمت هسته سلولی هدایت می‌کند.** پروتئین‌های سیتوپلاسمی وقتی که به سیگنال مکان‌یابی - هسته‌ای متصل می‌شوند، می‌توانند در هسته جای گیرند. (a) پیروات کیناز طبیعی، بعد از تیمار سلول‌های کشت داده شده با یک آنتی‌بادی خاص (زرد) توسط ایمونوفلورسانس دیده می‌شود که در سیتوپلاسم جای گرفته‌اند. این پروتئین خیلی بزرگ سیتوزولی در متابولیسم کربوهیدرات عمل می‌کند. (b) وقتی پروتئین پیروات کیناز کایمری شامل NLS از SV40 در انتهای - N در سلول بیان می‌شد، در هسته جای می‌گیرد. پروتئین کایمری از یک ژن مهندسی شده بیان می‌شود که در اثر جوش دادن قطعه ژن ویروسی رمزدهی کننده NLS از SV40 به ژن پیروان کیناز تولید شده است.

به نام **نوکلئوپورین‌ها**[1] ساخته شده است. عکس‌های الکترونی از کمپلکس‌های منافذ هسته‌ای بیان‌کننده ساختار تقریباً ۸ وجهی جای گرفته در غشاء است که از آن هشت رشته تقریباً ۱۰۰ نانومتری به سمت نوکلئوپلاسم امتداد یافته‌اند (شکل ۳۲-۱۳). انتهای دور این رشته‌ها توسط حلقه انتهایی به هم متصل شده و ساختاری به نام **سبد هسته‌ای**[2] را تشکیل می‌دهند. بخش جای‌گرفته در غشاء NPC هم چنین مستقیماً به **لامین هسته‌ای**[3] متصل شده است. شبکه‌ای از رشته‌های حد واسط لامین که یک توری را تشکیل می‌دهد در سطح داخلی پاکت هسته‌ای گسترده است (شکل ۱۶-۲۰ را ملاحظه کنید). رشته‌های سیتوپلاسمی از طرف سیتوپلاسمی NPC به سمت سیتوزول کشیده شده‌اند.

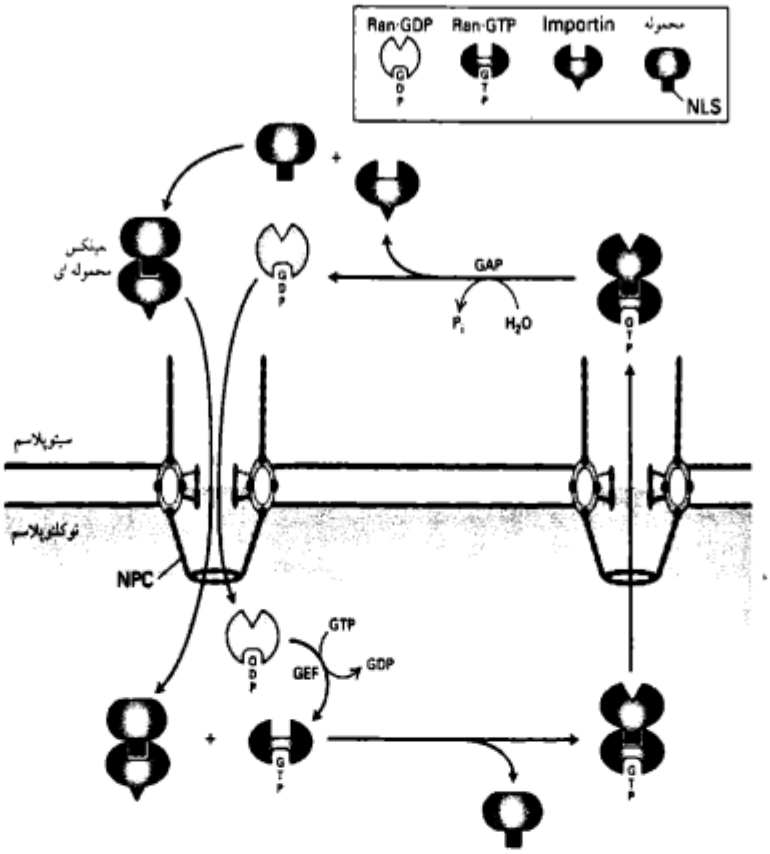
یون‌ها، متابولیت‌های کوچک و پروتئین‌های کروی تا kDa ۴۰-۲۰ می‌توانند به صورت غیرفعال از طریق ناحیه مرکزی آبی کمپلکس منفذ هسته‌ای انتشار یابند. با این حال، پروتئین‌های بزرگ و کمپلکس‌های ریبونوکئوپروتئین نمی‌توانند به داخل و خارج هسته



▲ **شکل تجربی ۳۴-۱۳ پروتئین‌های سیتوزولی برای انتقال هسته‌ای لازم هستند.** ناتوانی انتقال در سلول‌های کشت داده شده نفوذپذیر شده در غیاب لیزات (Lysatc) ثابت‌کننده درگیری اجزای محلول سیتوزولی در این فرآیند است. (a) تصاویر فاز - کنتراست از سلول‌های هلای تیمار نشده و نفوذپذیر شده در اثر دیجیتونین. تیمار یک لایه از سلول‌های کشت داده شده با دترجنت ملایم و تک یونی دیجیتونین غشاء پلاسمایی را چنان نفوذپذیر می‌کند که اجزای سیتوزولی به بیرون نشت می‌کنند اما پاکت هسته‌ای و NPCها دست نخورده و سالم باقی می‌مانند. (b) میکروگراف‌های فلورسانت از سلول‌های نفوذپذیر شده با دیجیتونین در هلا انکوبه شده با پروتئین فلورسانتی جفت شده شیمیایی با پپتید NLS آنتی‌ژن - T از SV40 در حضور و غیاب سیتوزول (لیزات). تجمع این سوبسترای انتقال در هسته فقط زمانی رخ می‌دهد که سیتوزول در محیط انکوباسیون وجود داشته باشد (راست).

انتشار یابند در عوض این ماکرومولکول‌ها به صورت فعال و باکمک پروتئین‌های ناقل محلول که به ماکرومولکول‌ها متصل شده و با نوکلئوپروتئین‌ها نیز میانکنش می‌دهند، از طریق NPC منتقل می‌شوند.

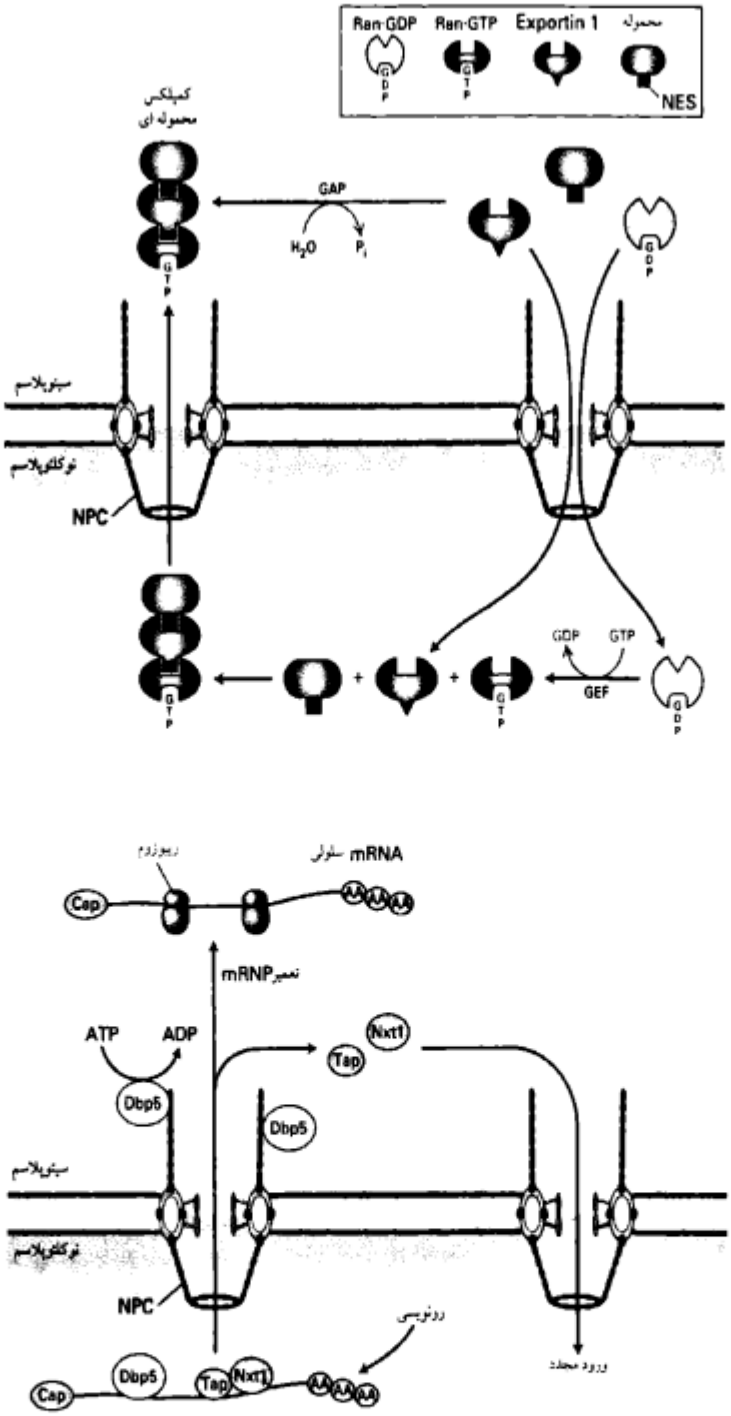
1- Nucloporins
2 - Nuclear basket
3 - Nuclear lamina



▲ **شکل ۳۵ـ۱۳ ورود هسته‌ای.** مکانیسم ورود هسته‌ای پروتئین‌های «محموله‌ای» در سیتوپلاسم (پایین). یک ایمپورتین آزاد به NLS یک پروتئین محموله‌ای، متصل شده و یک کمپلکس محموله‌ای دو مولکولی تشکیل می‌دهد. در مورد NLS بازی، پروتئین تعدیل‌کننده ایمپورتین α پلی بین NLS و ایمپورتین β برقرار کرده و موجب تشکیل یک کمپلکس محموله‌ای سه مولکولی می‌شود (در شکل نشان داده نشده). کمپلکس محموله‌ای از طریق NPC و میانکنش با نوکلئوپروتئین‌های FG متوالی، انتشار می‌یابد. در نوکلئوپلاسم، میانکنش بین Ran. GTP با ایمپورتین باعث تغییر ساختاری سه‌بعدی می‌شود که تمایل ایمپورتین را به NLS کاهش داده و موجب رهاسازی محموله می‌شود. برای انجام چرخه ورودی دیگر، کمپلکس Ran. GTP به سیتوپلاسم باز می‌گردد. یک پروتئین سرعت دهنده GTP از (GAP) مرتبط با رشته‌های سیتوپلاسمی NPC، موجب تحریک Ran به هیدرولیز GTP متصل، می‌شود. این امر موجب تغییر شکل سه‌بعدی و در نتیجه جدا شدن ایمپورتین شده و بدین ترتیب ایمپورتین می‌تواند دور دیگری از ورود را آغاز کند. Ran. GDP به نوکلئوپلاسم جایی که فاکتور تعویض‌کننده نوکلئوتید گوانین بر می‌گردد. در آنجا که فاکتور تعویض‌کننده نوکلئوتید گوانین موجب رها شدن GTP و اتصال دوباره GTP می‌گردد.

ایمپورتین‌ها پروتئین‌های حاوی سیگنال‌های مکان‌یابی ـ هسته‌ای را به هسته انتقال می‌دهند

تمامی پروتئین‌هایی که در هسته یافت می‌شوند (نظیر هیستون‌ها، فاکتورهای رونویسی، و RNA-DNA پلی‌مرازها) در سیتوپلاسم سنتز می‌شوند و از طریق کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای وارد هسته می‌شوند، چنین پروتئین‌هایی حاوی یک **سیگنال مکان‌یابی ـ هسته‌ای (NLS)** هستند که انتقال انتخابی آنها را به هسته هدایت می‌کند. NLSها در ابتدا توسط مطالعه بر روی ویروس سیمیان ۴۰ (SV40) که فرم غیرطبیعی از پروتئین ویروسی به نام آنتی‌ژن ـ T بزرگ را تولید می‌کرد، کشف شدند. نوع وحشی این پروتئین در هسته سلول‌های آلوده شده قرار دارد، در حالی که در برخی اشکال جهش یافته آنتی‌ژن ـ T بزرگ در سیتوپلاسم جمع می‌شود. جهش‌های مسئول در این تغییر در مکان‌یابی سلولی در یک توالی خاص هفت اسید آمینه‌ای رخ می‌دهد که غنی از اسیدهای آمینه بازی در نزدیکی انتهای C پروتئین است: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. آزمایشات با پروتئین‌های هیبرید مهندسی شده که در آنها این توالی به یک پروتئین سیتوزولی جوش خورده بود ثابت کرد این توالی انتقال را به



▲ **شکل ۱۳ـ۳۶ خروج هسته‌ای وابسته به و غیروابسته به Ran.** (a) مکانیسم وابسته به Ran برای خروج پروتئین‌های محموله‌ای حاوی یک سیگنال خروجی ـ هسته‌ای غنی از لوسین (NES). در نوکلئوپلاسم، پروتئین اسکپورتین ۱ به NES از پروتئین محموله‌ای، که قرار است منتقل شود، و به Ran-GTP متصل می‌شود. بعد از این‌که کمپلکس محموله‌ای حاصله از طریق یک NPC و توسط میانکنش‌هایی با تکرارهای FG در نوکلئوپورین‌های FG منتشر شد، Ran. GAP مرتبط با NPC رشته‌های سیتوپلاسمی، تبدیل Ran. GTP به Ran. GDP را تحریک می‌کند. تغییرات کنفورماسیونی در Ran موجب گسستگی کمپلکس می‌گردد. پروتئین محموله‌ای حاوی NES، به درون سیتوزول رها می‌گردد، در حالی که از اکسپورتین ۱ و Ran. GDP از طریق NPCها به هسته بر می‌گردند. سپس Ran-GEF، در نوکلئوپلاسم تبدیل Ran-GDP را به Ran-GTP تحریک می‌کند. (b) خروج غیروابسته به Ran در مورد mRNAها. کمپلکس TAP/Nxt1 هترودیمر به کمپلکس‌های پروتئین ـ (mRNA mRNPها) در هسته متصل می‌شود. ارتباط TAP/Nxt با اجزای NPC، mRNP مرتبط را به کانال مرکزی منفذ هدایت می‌کند. یک RNA هیلکاز (Dbp5)، قرار گرفته در سمت سیتوپلاسمی NPC، به نظر می‌رسد که نیروی محرکه برای حرکت mRNA از طریق سنتز را در اثر هیدرولیز فراهم می‌کند. هلیکاز هم چنین mRNA را از پروتئین‌های TAP و Nxt1 جدا می‌کند، که این پروتئین‌ها چنانچه در شکل ۱۳ـ۳۵ نشان داده شد توسط فرآیند ورودی وابسته به Ran به هسته بر می‌گردند.

سمت هسته هدایت کرده و در نتیجه به عنوان یک NLS عمل می‌کند (شکل ۳۳ـ۱۳). سپس توالی‌های NLS در خیلی از پروتئین‌های وارد شده به هسته شناسایی شد. خیلی از این‌ها مشابه NLS پایه در آنتی‌ژن ـ T بزرگ SV40 هستند، در حالی که بقیه NLSها کاملاً از نظر شیمیایی متفاوت هستند. به عنوان مثال، NLS در پروتئین متصل شوند. به RNA در hnRNPAi آبگریز است. بنابراین مکانیسم‌های مختلفی باید برای تشخیص این توالی‌های بسیار متفاوت وجود داشته باشد.

کارهای ابتدایی بر روی مکانیسم ورود هسته‌ای بر روی پروتئین‌های حاوی NLS بازی مشابه با آنتی‌ژن ـ T بزرگ SV40 متمرکز شد. یک سیستم سلولی نفوذپذیر شده با دیجیتونین[1] آزمایشی را در شرایط آزمایشگاهی برای بررسی اجزای سیتوزولی محلول مورد نیاز به ورود هسته‌ای فراهم ساخت (شکل ۳۴ـ۱۳). دیجیتونین شوینده‌ای است که غشاء پلاسمایی را نفوذپذیر می‌کند، تا در حالیکه پاکت هسته‌ای و NPCها سالم و دست نخورده هستند اجزای سیتوپلاسمی از سلول به بیرون نشت کنند. با استفاده از این سیستم آزمایشی، دانشمندان سه پروتئین مورد نیاز را تخلیص کردند: Ram، ایمپورتین α و ایمپورتین β، Ran یک G **پروتئین** مونومری بوده و به فرم‌های متصل به GTP یا GDP یافت می‌شود (شکل ۳۲ـ۳ ملاحظه کنید).

دو **ایمپورتین**[2] می‌توانند یک **گیرنده ورود ـ هسته‌ای** هترودیمری تشکیل دهد: زیر واحد α به NLS بازی در پروتئین «محموله» که به هسته منتقل می‌شود، متصل می‌شود، در حالی که زیر واحد β با پروتئین‌های منفذ هسته‌ای پیوند برقرار می‌کند تا پروتئین محموله از طریق آن رفت و آمد کند. زیر واحد ایمپورتین β هم چنین می‌تواند مستقیماً به توالی‌های NLS خاصی متصل شده و بنابراین به تنهایی به عنوان یک گیرنده ورود هسته‌ای برای این پروتئین‌ها عمل نماید.

مکانیسم ورود پروتئین‌های محموله‌ای سیتوپلاسمی توسط ایمپورتین در شکل ۳۵ـ۱۳ نشان داده شده (مکانیسم کلی برای ایمپورتین‌های مونومری یا دیمری یکسان است). های آزاد در ایمپورتین‌سیتوپلاسم به NLS هم‌جنس خود در پروتئین محموله‌ای متصل شده و یک **کمپلکس محموله‌ای دو مولکولی** را تشکیل می‌دهند. کمپلکس محموله‌ای سپس به موازات میانکنش زیر واحد ایمپورتین β با یک کلاس از نوکلئوپروتئین‌ها به نام FG ـ نوکلئوپروتئین‌ها می‌تواند از طریق کانال NPC جابه‌جا شود. این نوکلئوپروتئین‌ها که در کانال کمپلکس منفذ هسته‌ای و هم چنین در سبد هسته‌ای و رشته‌های سیتوپلاسمی نیز یافت می‌شوند، حاوی‌تکرارهای چندگانه‌ای از توالی‌های آبگریز کوتاه غنی از اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین (F) و گلیسین (G) (تکراری FG) هستند. عقیده بر این است که تکرارهای آبگریز FG بصورت نواحی در غشاء گسترده بوده در حالی که زنجیره پلی‌پپتید آبدوست، مرکز کانال انتقالی را پر می‌کنند، و در برخی مسیرها به کمپلکس‌های ایمپورتین نسبتاً آبگریز اجازه می‌دهد که از طریق کانال عبور کنند، در حالیکه پروتئین‌های آبدوست بزرگ‌تر از ۲۰ تا ۴۰ کیلودالتون که با چاپرون‌ها پوشیده نشده‌اند وارد آن نمی‌شوند.

وقتی که کمپلکس محموله‌ای به نوکلئوپلاسم می‌رسد، ایمپورتین با Ran. GTP میانکنش داده و باعث تغییر شکل سه‌بعدی در ایمپورتین شده و تمایل آن را به NLS کاهش داده و پروتئین محموله‌ای را به نوکلئوپلاسم رها می‌کند. کمپلکس ـ ایمپورتین Ran. GTP، وقتی به سمت سیتوپلاسمی NPC رسید، Ran با یک **پروتئین فعال‌کننده ـ GTP** آز (Ran-GAP)[3] که جزیی از رشته‌های سیتوپلاسمی NPC است، میانکنش می‌دهد این عمل، Ran را تحریک می‌کند تا GTP متصل به خود را به GDP هیدرولیز کند، در این حالت Ran کنفورماسیونی به خود می‌گیرد که تمایل کمی به ایمپورتین دارد به طوری که ایمپورتین آزاد در سیتوپلاسم رها شده و در آنجا می‌تواند در چرخه دیگری از ورود پروتئین به هسته شرکت کند. Ran. GDP از طریق منفذ به نوکلئوپلاسم برگشته و در آن جا با یک فاکتور تعویض نوکلئوتید گوآنین ولی اختصاصی مواجه می‌شود (Ran-GEF) که موجب می‌شود که Ran،GDP متصل به خود را با GTP مبادله کند. نتیجه خالص این مجموعه از واکنش‌ها، جفت شدن هیدرولیز GTP با انتقال پروتئین حاوی ـ NLS از سیتوپلاسم به داخل هسته است، بنابراین بدین وسیله نیروی پیشبرنده انتقال هسته‌ای فراهم می‌شود.

کمپلکس ورودی از طریق منفذ به روش انتشار (یک فرآیند اتفاقی) منتقل می‌شود. هنوز انتقال یک‌طرفه است. جهت انتقال تابعی از گسستن سریع کمپلکس ورود در هنگام رسیدن به نوکلئوپلاسم است. در نتیجه، یک شیب غلظت از کمپلکس ایمپوتین ـ محموله در NPC به وجود می‌آید: غلظت در سیتوپلاسم زیاد (جایی که کمپلکس تشکیل می‌شود) و در نوکلئوپلاسم کم (جایی که از هم گسسته می‌شود) است. این شیب غلظت مسئول ماهیت یک‌طرفه

1- Digitonin 2- Importin

3 GTPae-activating protein

ورود هسته‌ای است. شیب غلظت مشابهی مسئول حرکت در هسته و بازگشت آن به سوی سیتوپلاسم می‌باشد. غلظت کمپلکس Ran.-GTP ایمپورتین در نوکلئوپلاسم (جایی که با هم مجتمع می‌شوند) نسبت سمت سیتوپلاسمی NPC (جایی که از هم جدا می‌شوند) بیشتر است.

در نهایت، جهت فرآیند به توزیع نامتقارن Ran-GEF و Ran-GAP بستگی دارد. Ran-GEF در نوکلئوپلاسم، Ran را در حالت Ran. GTP نگه می‌دارد. که در آنجا موجب شروع گسستگی کمپلکس محموله‌ای می‌شود. Ran. GAP در سمت سیتوپلاسمی NPC، Ran. GTP را به Ran. GDP تبدیل کرده و موجب گسستگی کمپلکس Ran-GTP-ایمپورتین و رهاسازی ایمپورتین آزاد به سیتوزول می‌شود.

ایمپورتین‌ها پروتئین‌های حاوی سیگنال‌های خروج از - هسته را به خارج از هسته منتقل می‌کنند

مکانیسم خیلی مشابهی برای خارج کردن پروتئین‌ها، tRNAها و زیر واحدهای ریبوزومی از هسته به سیتوپلاسم به کار برده می‌شود. این مکانیسم در ابتدا از مطالعه بر روی کمپلکس‌های پروتئینی ریبونوکلئازی که بین هسته و سیتوپلاسم «رفت و آمد» می‌کنند حاصل شد. چنین پروتئین‌های «شاتل» علاوه بر این NLS که موجب جذب آنها به هسته می‌گردد. حاوی یک سیگنال خروج از هسته[1] (NES) بوده و خروج آنها از هسته به سیتوپلاسم از طریق منافذ هسته‌ای انجام می‌گیرد. آزمایش با ژن‌های هیبرید مهندسی شده، رمزدهی‌کننده یک پروتئین محدود به هسته متصل شده به قطعات مختلفی از یک پروتئین که به داخل و خارج از هسته رفت و آمد می‌کند، باعث تشخیص حداقل سه کلاس مختلف از NESها شد: توالی غنی از لوسین یافت شده در PKI (مهارکننده پروتئین کیناز A) و در پروتئین Rev از ویروس HIV، هم چنین دو توالی شناخته شده در دو ذره ریبونوکلئوپروتئین ناهمگن (hnRNPها) شناخته شده است.

مکانیسمی که از طریق آن پروتئین‌های شاتل (رفت و آمدی) از هسته خارج می‌شوند، در مورد آنهایی که حاوی NES غنی از لوسین هستند، به خوبی شناخته شده است. براساس مدل کنونی نمایش داده شده در شکل a ۱۶-۱۳، یک اکسپورتین خاص، یا **گیرنده خروج از - هسته**[2] در هسته به نام اکسپورتین ۱، در ابتدا با Ran. GTP و سپس با پیوند به NES در پروتئین محموله‌ای تشکیل یک کمپلکس را می‌دهد. اتصال اکسپورتین ۱ به Ran. GTP موجب تغییر اکسپوتین ۱ ماسیونی در شده و تمایل آن را برای NES افزایش می‌دهد به طوریکه **کمپلکس محموله‌ای سه مولکولی**[3] تشکیل می‌شود. مشابه ایمپورتین‌ها، اکسپورتین ۱ به صورت موقتی و گذرا با تکرارهای - FG در نوکلئوپورین‌های FG، پیوند یافته و از طریق NPC منتشر می‌شود. کمپلکس محموله‌ای وقتی با Ran. GAP در NPC رشته‌های سیتوپلاسمی مواجه گردد، از هم جدا شده و این امر Ran را تحریک می‌کند تا GTP متصل را هیدرولیز کرده، و آن را در نتیجه ساختمان فضایی Ran به صورتی در می‌آید که تمایل کمی به اکسپورتین ۱ دارد. اکسپورتین ۱ رها شده به ک.نفورماسیونی تغییر پیدا می‌کند که تمایل کمی به NES داشته و مولکول محموله را به سیتوزول رها می‌کند. جهت و سمت فرآیند توسط گسسته شدن محموله از اکسپورتین ۱ در سیتوپلاسم تعیین شده و موجب ایجاد شیب غلظت کمپلکس محموله‌ای در NPC می‌شود. در این حالت غلظت کمپلکس محموله‌ای در نوکلئوپلاسم زیاد و در سیتوپلاسم پایین است. اکسپورتین ۱ و Ran. GDP بعد از این از طریق NPC به هسته باز می‌گردند.

با مقایسه این مدل برای خروج از هسته‌ای در شکل ۱۳-۳۵ با ورود به هسته، می‌توانیم یک تفاوت واضح را مشاهده کنیم: GDP Ran. یکی از بخش‌های کمپلکس محموله در طول خروج است و در ورود نقش ندارد. جدای از این تفاوت، دو فرآیند ورود و خروج به طرز چشم‌گیری مشابه هم هستند. در هر دو مورد، فرآیند تجمع گیرنده سیگنال انتقال با Ran. GTP در نوکلئوپلاسم موجب تغییر در کنفودرماسیون شده که تمایل آن را برای سیگنال انتقالی تحت تأثیر قرار می‌دهد. در طول ورود، میانکنش موجب رهاسازی محموله می‌شود، در حالیکه در طی خروج، میانکنش موجب شروع تجمع با محموله می‌گردد. هم در ورود و هم در خروج، تحریک هیدرولیز Ran. GTP در سیتوپلاسم توسط Ran. GAP موجب تغییر ک.نفورماسیون در Ran شده و باعث رها شدن گیرنده سیگنال انتقال می‌شود. در طول خروج هسته‌ای، محموله نیز رها می‌شود. به نظر می‌رسد ایمپورتین‌ها و اکسپورتین‌ها از طریق کانال NPC و با میانکنش‌های متوالی با تکرارهای - FG در نوکلئوپروتئین‌های FG، منتشر می‌شوند. مکان‌یابی Ran-GAP و Ran GEF - به ترتیب در سیتوپلاسم و هسته، اساس انتقال یک‌طرفه پروتئین‌های محموله‌ای در NPC است.

---

1 Nuclear-export signal

2- Nuclear - export receptor

3- Tri - Molecular Cargo Complex

در کنار مشابهت عملکردی ایمپورتین و اکسپورتین‌ها، این دو نوع پروتئین انتقالی از نظر توالی و ساختار خیلی همولوگ و مشابه هستند. کل این خانواده را خانواده ایمپورتین β یا **کاریوفرین**[۱] می‌نامند. ۱۴ کاریوفرین در مخمر و در سلول‌های پستانداران بیش از ۲۰ عدد از آنها وجود دارد. NESها و NLSها که به آنها متصل می‌شوند برای کسری از آنها تعیین شده‌اند. جالب اینکه برخی از کاریوفرین‌ها هم به عنوان ایمپورتین و هم اکسپورتین عمل می‌کنند.

مکانیسم شاتلی مشابهی برای خارج کردن محموله‌های دیگر از هسته نشان داده شده است. به عنوان مثال، اکسپورتین در خارج کردن tRNA عمل می‌کند. اکسپورتین به کمپلکس‌های tRna کاملاً پردازش شده در یک کمپلکس با Ran. GTP متصل می‌شود که از طریق NPCها انتشار یافته و هنگامی که با Ran-GAP در رشته‌های سیتوپلاسمی NPC میانکنش می‌دهد، خرد شده و tRNA را به سیتوزول رها می‌کند. یک فرآیند وابسته به Ran نیز برای خروج زیر واحدهای ریبوزومی از طریق NPCها هنگامی که پروتئین و اجزای RNA به درستی در هستک تجمع یافتند، لازم است mRNAهای خاصی با پروتئین‌های hnRNP خاصی ارتباط برقرار می‌کنند و می‌توانند توسط مکانیسم وابسته به Ran خارج شوند.

بیشتر mRNAها توسط یک مکانیسم غیروابسته به Ran از هسته خارج می‌شوند

وقتی که پردازش یک mRNA در هسته کامل شد، در ارتباط با پروتئین‌های hnRNP خاصی در یک کمپلکس پروتئین ریبونوکلئولی پیک، یا mRNP باقی ماند، منتقل‌کننده اصلی mRNP به خارج از هسته، خارج‌کننده mRNP[۲] (mRNP exporter) است، خارج از mRNP یک پروتئین هترودیمر متشکل از یک زیر واحد بزرگ به نام فاکتور خروج هسته‌ای[۳] ۱ (NXF1) یا TAP و یک زیر واحد کوچک، یعنی منتقل کننده خروج هسته‌ای ۱ (Nxt1). زیر واحد بزرگ از طریق میانکنش با RNA و دیگر پروتئین‌های میانجی که در طول رونویسی و قبل از پردازش mRNA، با پیش mRNA ارتباط داشتند، با mRNPها هسته‌ای پیوند ایجاد می‌کند. به نظر می‌رسد که چندین خارج کننده mRNP در طول mRNP به خروج آن کمک می‌کنند. TAP/Nxt1 همانند یک کاریوفرین عمل می‌کند، بدین معنی که هر دو زیر واحد با دمین‌های ـ FG از FG نوکلئوپورین‌های میانکنش داده و به آنها اجازه می‌دهند که از طریق کانال مرکزی NPC منتشر شوند. هم‌چنین Tap به صورت برگشت پذیر با پروتئین Gle2 نیز پیوند برقرار می‌کند که آن در عوض به یک نوکلئوپورین در سبد هسته‌ای متصل می‌گردد، که احتمالاً موجب موقعیت‌گیری mRNP برای خروج از طریق منفذ هسته‌ای است. یک نوکلئوپورین در رشته‌های سیتوپلاسمی NPC نیز برای خروج mRNP لازم است. این نوکلئوپورین به یک RNA هلیکاز متصل می‌شود که به نظر می‌رسد این هلیکاز در جدایی خارج‌کننده mRNA و دیگر پروتئین‌های hnRNP از mRNP عمل می‌کند، هنگامی که mRNP به سیتوپلاسم می‌رسد. به نظر نمی‌رسد که خارج‌کننده‌های TAP/Nx1 mRNP با Ran میانکنش داشته باشند، و در نتیجه انتقال یک‌طرفه mRNA به خارج از هسته، نیازمند یک منبع انرژی غیر از هیدرولیز GTP توسط Ran می‌باشد. هنگامی که کمپلکس mRNP از طریق NPC منتقل شد، پروتئین‌های مرتبط با آن، با مجموعه دیگری از پروتئین‌های سیتوپلاسم، مبادله می‌شوند، این فرآیند آرایش مجدد mRNP (mRNP remodeling) نامیده می‌شود (شکل b ۳۶ـ۱۳).

چندین پروتئین mRNP هسته‌ای قبل از این‌که mRNP به سمت سیتوپلاسمیک NPC برسد، از آن جدا می‌شوند. این پروتئین‌ها در هسته باقی مانده، و در آن‌جا به پیش mRNAهای تازه سنتز شده متصل می‌شوند.

دیگر پروتئین‌های mRNP هسته‌ای، شامل خارج‌کننده TAP/Nxt1 mRNP، از طریق NPCها به سیتوپلاسم خارج می‌شود. وقتی که آنها به سمت سیتوپلاسمی NPC می‌رسند، با کمک RNA هلیکاز Dbp5، از mRNP جدا می‌شوند. این هلیکاز با رشته‌های NPC سیتوپلاسمی در ارتباط است. به یاد داشته باشید که RNA هلیکازها، از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای حرکت در طول مولکول های RNA، جداکردن زنجیره‌های RNA دو رشته‌ای و خرد کردن کمپلکس‌های پروتئین ـ RNA استفاده می‌کنند (فصل ۴). این شواهد یک ایده ساده را به ذهن می‌رساند که Dpb5، مجتمع با طرف سیتوپلاسمی کمپلکس منفذ هسته‌ای به عنوان یک موتور یکه ATP استفاده می‌کند برای حرکت کمپلکس‌های mRNP در میان منفذ هسته‌ای عمل می‌نماید.

بعد از تکمیل آرایش مجدد، پروتئین‌های TAP و Nxt1 که توسط هلیکاز Dbp5 از mRNA جدا شده‌اند، به وسیله

1- Karyopherin 2- mRNP exporter
3- Nuclear export factor 1

ایمپورتین‌ها به هسته باز گشته، و در آن‌جا می‌توانند به عنوان خارج‌کننده mRNP دیگر عمل نمایند. در نتیجه، این پروتئین‌های mRNP هسته‌ای بین هسته و سیتوپلاسم در رفت و آمد هستند و mRNPها را از طریق NPCها عبور می‌دهند (شکل ط ۳۶-۱۳).

نکات کلیدی بخش ۶-۱۳

انتقال به داخل و خارج از هسته

■ پاکت هسته‌ای حاوی کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای (NPC) متعددی می‌باشد. منافذ هسته‌ای بزرگ و دارای ساختار پیچیده بوده و از نسخه‌های متعددی از ۳۰ پروتئین به نام نوکلئوپورین‌ها تشکیل شده‌اند (شکل ۳۲-۱۳ را ملاحظه کنید). FG نوکلئوپورین‌ها (که چندین تکرار از یک توالی آبگریز کوتاه (تکرارهای FG) دارند در کانال ناقل مرکزی قرار گرفته ودر انتقال همه ما کرومولکول‌ها از منافذ هسته‌ای نقش ایفاء می‌کنند.

■ انتقال ما کرومولکول‌های بزرگتر از ۴۰-۲۰ کیلودالتون از منافذ هسته‌ای به کمک پروتئین‌هایی که هم با مولکول منتقل شده و هم تکرارهای FG در FG نوکلئوپورین‌ها میانکنش می‌دهند، نیاز دارد.

■ پروتئین‌های واردشده یا خارج شده از هسته‌ها، توالی اسیدآمینه‌ای خاصی دارند. این توالی اسید آمینه‌ای به عنوان سیگنال مکان‌یابی هسته‌ای (NTS) یا سیگنال خروج از هسته (NES) عمل می‌کند: پروتئین‌های محدود به هسته حاوی یک NLS بوده اما NES را ندارند. در حالیکه پروتئین‌هایی که بین هسته و سیتوپلاسم رفت و آمد می‌کنند حاوی هر دو سیگنال هستند.

■ انواع متفاوتی از NLS و NES شناخته شده‌اند. عقیده بر این است که هر کدام از توالی‌های انتقال هسته‌ای با یک گیرنده پروتئین خاص (اکسپورتین یا ایمپورتین) متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌های همولوگ به نام کاریوفدین‌ها میانکنش می‌دهد.

■ پروتئین محموله‌ای یک NES یا NLS داشته و از طریق منافذ هسته‌ای متصل به پروتئین گیرنده (کاریوفرین)، انتقال می‌یابد. این پروتئین گیرنده با FG نوکلئوپورین‌ها نیز میانکنش می‌دهد. عقیده بر این است که ایمپورتین‌ها و اکسپورتین‌ها از طریق کانال‌های پرشده با ماتریکس آبگریز از تکرارهای FG، منتشر می‌شوند. هر دو فرآیند انتقال به مشارکت Ran (یک G پروتئین که هنگام اتصال به GDP یا GTP ساختمان فضایی متفاوتی دارد) نیاز دارد.

■ بعد از رسیدن کمپلکس محموله‌ای به مقصد خود (به سیتوپلاسم در طی خروج و هسته طی ورود) کمپلکس محموله از هم جدا شده و پروتئین محموله و سایر اجزاء رها می‌شوند. این اجزاء سپس از طریق منافذ هسته‌ای در جهت معکوس منتقل می‌شوند تا در انتقال مولکول‌های دیگر از پروتئین محموله را مشارکت نماند (شکل‌های ۲۵-۱۳ و ۲۶-۱۳ را ملاحظه کنید).

■ طبیعت یک طرفه ورود و خروج از طریق منافذ هسته‌ای حاصل جای‌گیری فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانین Ran (GEF) در هسته و پروتئین فعال‌کننده GTPاز Ran (GAP) در سیتوپلاسم است. میانکنش کمپلکس‌های محموله‌ای ورود با Ran-GTP در نوکلئوپلاسم باعث فروپاشی کمپلکس و رهاشدن محموله به داخل نوکلئوپلاسم می‌شود (شکل ۳۵-۱۳ را ملاحظه کنید). کمپلکس‌های محموله‌ای خروجی هنگامی که با Ran-GAP جای گرفته در رشته‌های سیتوپلاسمی NPC میانکنش می‌هند، تجزیه می‌شوند.

■ اغلب mRNPها بوسیله خارج کننده mRNP هترودیمری از هسته خارج می‌شوند. این خارج‌کننده‌های mRNP با تکرارهای FG در FG نوکلئوپورین میانکنش می‌دهند. جهت انتقال (هسته به سیتوپلاسم) احتمالاً به دلیل عمل RNA هلیکاز مجتمع با رشته‌های سیتوپلاسمی در کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای است.

چشم‌اندازی به آینده

همان‌طور که در این فصل دیدیم، ما هم اکنون با جنبه‌های زیادی از فرآیند اساسی مسئول انتقال پروتئین‌های انتخابی به شبکه آندوپلاسمی (ER)، میتوکندری، کلروپلاست، پراکسیزوم و هسته آشنا هستم، مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی، برای مثال، توالی‌هایی با عمل سیگنالی که مسئول هدف‌یابی پروتئین‌ها به غشاء اندامکی بوده و گیرنده‌های غشایی که مسئول تشخیص این توالی‌های سیگنالی بودند شناسایی شدند. ما هم چنین در مورد مکانیسم‌های پایه‌ای که پروتئین‌ها را از میان غشاء اندامک‌ها انتقال می‌دهند اطلاعات کسب کردیم و تعیین نمودیم که برای بیرون کشیدن یا جلو بردن این پروتئین‌ها از غشاء در یک جهت نیاز به انرژی است یا خیر، و هم چنین نوع کانالی که پروتئین‌ها از طریق آن عبور می‌کنند، و این‌که پروتئین‌ها در حالت تاخورده و یا تا نخورده منتقل می‌شوند. با این حال، خیلی از پرسش‌های اساسی ما این‌که چگونه پروتئین‌های کاملاً تا خورده از طریق غشاء و از درون آن حرکت می‌کنند و توپولوژی یک پروتئین غشایی چند گذره (multipass) چگونه تعیین می‌شود بی‌پاسخ مانده‌اند.

ماشین ورود پراکسیزومی مثالی از انتقال پروتئین‌های تاخورده را فراهم می‌آورد. این دستگاه نه تنها قادر است که پروتئین‌های کاملاً تاخورده را با باند پیوند به کوفاکتور متصل را به داخل ماتریکس پراکسیزوم منتقل کند، بلکه می‌تواند ورود قطعات بزرگ طلای متصل به پپتید هدف‌یابی پراکسیزوم (PTS1) را هدایت کند. برخی از محققان عقیده دارند که ممکن است مکانیسم ورودی پراکسیزوم با مکانیسم ورودی هسته در ارتباط باشد، که شناخته‌شده‌ترین مثال انتقال پس از ترجمه در مورد پروتئین‌های تاخورده شده است. دستگاه‌های ورودی پراکسیزومی و هسته‌ای هر دو، می‌توانند مولکول‌های تاخورده در اندازه‌های مختلف را منتقل کنند، و به نظر می‌رسد که هر دو دارای جزئی هستند که می‌تواند بین سیتوزول و داخل اندامک گردش کند. گیرنده Pex5 PTS1 در مورد ورود پراکسیزومی و کمپلکس ایمپورتین Ran در مورد ورود هسته‌ای. با این حال، تفاوت‌های اساسی بین این دو فرآیند نیز به چشم می‌خورد. به عنوان مثال، منافذ هسته‌ای ماکرومولکول‌های بزرگ و پایداری هستند که به راحتی به وسیله میکروسکوپ الکترون قابل رؤیت هستند، در حالی‌که ساختارهای منفذ مانند آنالوگ آنها در غشای پراکسیزوم مشاهده نشده‌اند. به علاوه، مولکول‌های کوچک می‌توانند به راحتی از منافذ هسته‌ای عبور کنند، در حالی‌که غشاهای پراکسیزومی به عنوان یک سد و مانع همیشگی و پایدار در برابر انتشار مولکول‌های کوچک آبدوست باقی می‌مانند. در کل این مشاهدات حاکی از آن است که ورود پراکسیزومی احتمالاً نیاز به نوع جدیدی از مکانیسم انتقال دارد.

مکانیسم محافظت شده در طول تکامل برای انتقال پروتئین‌های تاخورده از غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های باکتری و از غشاء تیلاکوئید کلروپلاست‌ها نیز به میزان کمی شناخته شده است. فهم و شناخت بیشتر تمامی این فرآیندها در انتقال پروتئین‌های تاخورده از طریق غشاء، منوط به پیشرفت سیستم‌های انتقالی در شرایط آزمایشگاهی در آینده است که به دانشمندان اجازه می‌دهد مکانیسم‌های بیوشیمیایی راه‌انداز انتقال را مشخص نموده و ساختارهای حد واسطه انتقال به دام افتاده را تعیین کنند.

در مقایسه با دانش ما در مورد چگونگی انتقال پروتئین‌های محلول به لومن ER و ماتریکس میتوکندریایی، دانسته‌هایما در مورد این که چگونه توالی‌های سیتنالی توپولوژی پروتئین‌های غشایی را تعیین می‌کنند، کاملاً ابتدایی است. برای مثال، نمی‌دانیم که چگونه کانال ترانسلوکون پلی‌پپتیدها را با توجه به غشاء در جهات مختلف قرار می‌دهند و یا این که نمی‌دانیم چگونه توالی‌های پلی‌پپتیدی موضعی با کانال ترانسلوکون میانکنش می‌دهد تا جهت‌گیری عبور از غشاء را مشخص نموده و سیگنالی برای عبور جانبی به غشاء دو لایه شوند. درک بهتر از چگونگی تعیین توپولوژی غشاء به وسیله توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های غشایی، برای رمزگشایی از مقدار زیادی از اطلاعات ساختاری در پروتئین‌های غشایی موجود در بانک‌های اطلاعاتی توالی‌های ژنتیکی، لازم است.

مطالعات بیشتری باید در مورد فرآیندهای انتقال از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی در مورد مخمرها و پستانداران باید صورت گیرد. این مطالعات بدون شک پروتئین‌های کلیدی دیگری را به ما نشان می‌دهد که در تشخیص توالی‌های هدف‌یابی و در انتقال پروتئین‌ها از بین غشاء دو لایه لیپیدی نقش دارند. در نهایت، مطالعات ساختاری کانال‌های ترانسلوکون باید تکمیل شود تا در سطح اتم حالات کنفورماسیونی در هر یک از مراحل چرخه انتقال چه رابطه‌ای دارد مشخص شود.

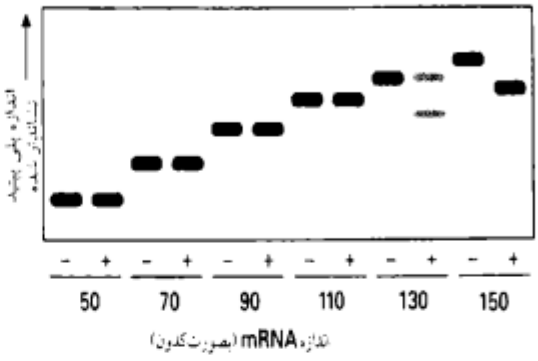
تجزیه و تحلیل داده‌ها

فرض کنید که شما مراحل ابتدایی انتقال و پردازش پروتئین ترشحی پرولاکتین را ارزیابی می‌کنید. با استفاده از دیدگاه تجربی مشابه چیزی که در شکل ۷ـ۱۳ نشان داده شده است، شما می‌توانید از mRNAهای بریده شده برای کنترل طول پلی‌پپتیدهای پرولاکتین جدید که سنتز می‌شوند، استفاده کنید. وقتی که mRNA پرولاکتین که فاقد کدون زنجیره انتهایی (توقف) هست در شرایط آزمایشگاهی ترجمه می‌شوند، پلی‌پپتید تازه سنتز شده که به آخرین کدون mRNA ختم می‌شود، در به طور متصل با ریبوزوم باقی مانده و به پلی‌پپتید با طول مشخص اجازه می‌دهد که از ریبوزوم امتداد پیدا کند. شما مجموعه‌ای از mRNAها را تولید کرده‌اید که قطعات انتهای N پرولاکتین با طول افزایش یافته را رمزدهی می‌کنند، و هر mRNA می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی و به وسیله عصاره ترجمه سیتوزولی شامل ریبوزوم‌ها، tRNAها، آمینواسیل ـ tRNA سنتتاز، GTP و فاکتورهای آغاز کننده و پایان ترجمه شود.

وقتی که اسیدهای‌آمینه نشاندار رادیواکتیو در مخلوط ترجمه حاضر می‌شوند، تنها پلی‌پپتیدهای رمزدهی شده با mRNA اضافه شده، نشاندار می‌شوند. بعد از تکمیل ترجمه، مخلوط واکنش به وسیله ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید SDS، جدا شده و پلی‌پپتیدهای نشاندار، به وسیله اتورادیوگرافی شناسایی می‌شوند.

a) اتورادیوگرافی که در این جا نشان داده شده است نتیجه آزمایشی است که در آن هر واکنش ترجمه‌ای در حضور (+) یا غیاب (-) غشاهای میکروزومی صورت گرفته است. براساس میزان حرکت

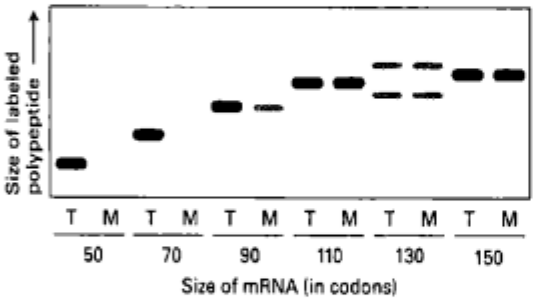
پلی‌پپتیدهای سنتز شده در حضور یا غیاب میکروزوم‌ها بر روی ژل، استنباط می‌کنیم که برای ورود پپتید سیگنال پرولاکتین به لومن ER و برش خوردن آن با سیگنال پپتیداز، زنجیره پرولاکتین جدید باید چه طولی داشته باشد. (به یاد داشته باشید که میکروزوم‌ها حاوی مقادیر قابل توجهی از SRPهای با پیوند ضعیف به غشاء هستند).



b). با دانستن این طول شما درباره حالت یا حالت‌های کنفورماسیونی پلی‌پپتید جدید پرولاکتین وقتی که توسط سیگنال پپتیداز بریده می‌شود، چه نتیجه‌ای می‌توانید بگیرید؟ طول‌های زیر می‌توانند برای محاسبه شما سودمند باشند: توالی سیگنالی پرولاکتین بعد از اسیدآمینه ۳۱ بریده می‌شود؛ کانالی که در ریبوزوم به وسیله پلی‌پپتید نوظهور اشغال شده است حدود A° ۱۵۰ طول دارد؛ غشاء دو لایه حدود A° ۵۰ ضخامت دارد؛ در پلی‌پپتیدها با کنفورماسیون مارپیچ α یک اسید آمینه A° ۱/۵ طول دارد در حالی که در پلی‌پپتید کاملاً باز شده، یک اسید آمینه حدود A° ۳/۵ طول دارد.

c). در این آزمایش روش مورد استفاده مشابه به آزمایش قسمت (a) است به جز این‌که غشاهای میکروزومی در طول ترجمه حضور نداشتند بلکه بعد از تکمیل شدن ترجمه به آن اضافه شدند. در این حالت، هیچ کدام از نمونه‌ها در حضور یا غیاب میکروزوم‌ها، تفاوتی در حرکت نشان ندادند. در مورد این که آیا پرولاکتین می‌تواند پس از ترجمه به میکروزوم‌های جدا شده منتقل شوند، چه نتیجه‌ای می‌توانید بگیرید.

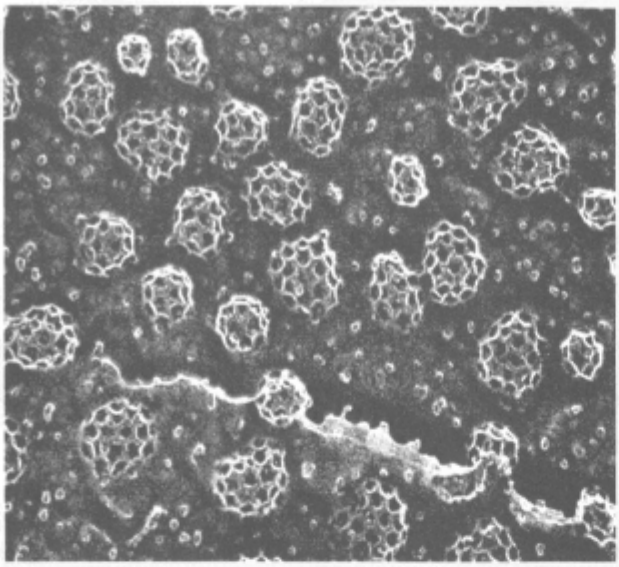
d). در یک آزمایش دیگر، واکنش ترجمه در حضور میکروزوم‌ها صورت گرفته و سپس غشاهای میکروزومی و ریبوزوم‌های متصل از ریبوزوم‌های آزاد و پروتئین‌های محلول توسط سانتریفوژ جدا می‌شوند. برای هر واکنش ترجمه، واکنش کل (T) و قسمت غشایی (M) در چاهک مجاور در ژل الکتروفورز شدند. براساس میزان پلی‌پپتید نشاندار شده در قسمت غشایی در اتورادیوگرافی که در زیر نشان داده شده، نتیجه می‌گیریم که طول زنجیره پرولاکتین جدید چه مقدار باید باشد تا ریبوزوم‌های درگیر در ترجمه، SRP را به کار بگیرد و در نتیجه به غشاهای میکروزومی متصل شود.



فصل

۱۴

حمل و نقل وزیکولی، ترشح و آندوسیتوز



میکروگراف الکترونی نگاره، نحوه تشکیل وزیکول پوشیده شده از کلاترین را بر روی سطح سیتوزولی غشای پلاسمایی نشان می‌دهد.

رئوس مطالب

۱۴.۱ تکنیک‌های مطالعه مسیر ترشحی

۱۴.۲ مکانیسم مولکولی حمل و نقل وزیکولی

۱۴.۳ مراحل اولیه مسیر ترشحی

۱۴.۴ مراحل پایانی مسیر ترشحی

۱۴.۵ اندوسیتوز به واسطه گیرنده

۱۴.۶ هدایت پروتئین‌های غشایی و مواد سیتوزولی به لیزوزوم

در فصل قبل شرح دادیم که چه طور پروتئین‌ها، هدف‌گیری شده و از عرض غشاهای اندامک‌های داخل سلولی از قبیل شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری، کلروپلاست‌ها، پراکسیزوم‌ها و هسته عبور می‌کنند. در این فصل به شرح **مسیر ترشحی** و مکانیسم‌هایی که به پروتئین‌های محلول و پروتئین‌های غشایی، اجازه گذر از غشای پلاسمایی و لیزوزوم می‌دهند می‌پردازیم. هم‌چنین به شرح فرایندهای مرتبط با این مبحث، یعنی آندوسیتوز و اتوفاژی می‌پردازیم که پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک را از خارج سلول یا سیتوپلاسم به منظور تجزیه شدن به درون لیزوزوم منتقل می‌کنند.

پروتئین‌های محلول و غشایی که برای عمل بر روی سطح سلول یا در داخل لیزوزوم در نظر گرفته شده‌اند، توسط مسیرهای ترشحی به سوی مقصد نهایی خود، منتقل می‌گردند. پروتئین‌هایی که به غشای پلاسمایی فرستاده می‌شوند شامل گیرنده‌های سطح سلولی، ترانسپورترهای مخصوص برداشت موادغذایی و کانالهای یونی که تعادل یونی و الکتروشیمیایی مناسب را در عرض غشای پلاسمایی برقرار می‌کنند، می‌باشد. پروتئین‌های ترشحی محلول نیز همانند پروتئین‌های غشای پلاسمایی، مسیر مشابهی را در رسیدن به سطح سلول طی می‌کنند، با این تفاوت که به جای آن‌که در نهایت درون غشای قرار گیرند، به محیط آبکی مایع خارج سلولی و به فرم محلول آزاد می‌شوند. مثال‌هایی از پروتئین‌های ترشحی شامل آنزیم‌های گوارشی، هورمون‌های پپتیدی، پروتئین‌های سرم و کلاژن است. همان‌طور که در فصل ۹ بیان گردید، لیزوزوم اندامکی با محیط درونی اسیدی است که عموماً برای تجزیه پروتئین‌های غیر ضروری به کار رفته و مخزنی از مولکول‌های کوچک مثل اسیدهای آمینه محسوب می‌شود. به این ترتیب انواعی از پروتئین‌ها که در غشای لیزوزوم عمل می‌کنند، زیرواحدهایی از پمپ پروتونی کلاس -V هستند که H^+ را از سیتوزول به لومن اسیدی لیزوزوم پمپ می‌کند، همان‌طور که ترانسپورترها، مولکول‌های کوچک ذخیره شده در لیزوزوم را به درون سیتوپلاسم آزاد می‌کنند. پروتئین‌های محلولی که توسط این مسیر حمل می‌شوند، شامل آنزیم‌های هضم‌کننده لیزوزومی از قبیل پروتئازها، گلیکوزیدازها، فسفاتازها و لیپازها می‌باشد.

برخلاف مسیر ترشحی که عموماً برای انتقال پروتئین‌های غشایی تازه سنتز شده به موقعیت‌های صحیحشان مورد استفاده

قرار می‌گیرد، **مسیر اندوسیتوزی**[1] برای برداشت مواد از سطح سلول به داخل سلول به‌کار می‌رود. مسیر اندوسیتوزی به منظور برداشت مواد غذایی ویژه‌ای که در مقادیر خیلی زیاد توسط یکی از مکانیزم‌های انتقالی ذکر شده در فصل ۱۱ از عرض غشای پلاسمایی منتقل می‌شوند برای مثال، مسیر اندوسیتوزی در برداشت کلسترول موجود در ذرات LDL و هم‌چنین برداشت اتم‌های آهن موجود در پروتئین متصل‌شونده به آهن یعنی ترانسفرین، استفاده می‌شود. به علاوه، مسیر اندوسیتوزی می‌تواند برای برداشت گیرنده‌های پروتئینی از سطح سلول به عنوان روشی برای تنظیم کاهشی فعالیت آنها به کار گرفته شود.

یک اصل واحد و مشترک، حمل و نقل پروتئین را در مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی کنترل می‌کند: انتقال پروتئین‌های غشایی و محلول از یک **بخش**[2] احاطه شده با غشا به دیگری توسط **وزیکول‌های انتقالی**[3] وساطت می‌شود که **پروتئین‌های «کارگو»**[4] موجود در جوانه‌هایی که از غشای یک **بخش** منشأ گرفته را جمع‌آوری می‌کند و سپس این پروتئین‌ها را طی الحاق به غشای آن به **بخش** بعدی منتقل می‌کند. عمدتاً همان‌طور که وزیکول‌های انتقالی از یک غشای جوانه می‌زنند و به دیگری اتصال می‌یابند، همان سطح غشای جهت‌گیری خود را به سمت سیتوزول حفظ می‌کند. بنابراین وقتی یک پروتئین به داخل غشا یا لومن ER وارد می‌شود، می‌تواند به سمت مسیر ترشحی هدایت شده و بدون آن‌که از خلال غشای دیگری عبور کند، یا جهت خود را در داخل غشای تغییر دهد از یک اندامک به دیگری منتقل شود. به‌طور مشابه، وزیکول‌های انتقالی برای حمل پروتئین‌ها از غشای پلاسمایی به اندوزوم و لیزوزوم به کار گرفته می‌شوند. بنابراین جهت‌گیری خود را در غشای اندامک‌ها، حفظ می‌کنند. شکل ۱ـ۱۴ مسیرهای اصلی حمل و نقل پروتئین در سلول را به صورت خلاصه نشان می‌دهد.

وقتی مسیر ترشحی انتقال پروتئین‌های تازه سنتز شده به غشای پلاسمایی یا لیزوزوم‌ها را به صورت ساده‌ای به مهم‌ترین بخش‌هایش مختصر می‌کنیم دو مرحله خواهیم داشت: مرحله اول در شبکه آندوپلاسمی خشن (ER) اتفاق می‌افتد و در فصل ۱۳ شرح داده شد. پروتئین‌های تازه سنتز شده محلول و غشایی به داخل ER منتقل می‌شوند و در آنجا برای به دست آوردن ساختمان فضایی مناسب، تا می‌خورند و تغییرات کووالان از قبیل به دست آوردن کربوهیدرات‌های با پیوند N و O و هم‌چنین پیوندهای دی‌سولفیدی روی آنها انجام می‌گردد. زمانی که پروتئین‌های تازه سنتز شده به‌طور کامل تا خوردند و تغییرات صحیح خود را در لومن ER کسب کردند، وارد مرحله دوم مسیر ترشحی می‌شوند که همان عبور از میان گلژی است. در ER، پروتئین‌های ترشحی در داخل وزیکول‌های انتقالی آنتروگراد (رو به جلو) متراکم می‌شوند. سپس این وزیکول‌ها به هم ملحق شده و بخشی پهن و احاطه شده در غشای را تشکیل می‌دهند که همان **سیسترنای**[5] سیس ـ گلژی است. پروتئین‌های مخصوصی که عموماً پروتئین‌های موجود در ER را در بر می‌گیرد، توسط دسته‌ای متفاوت از وزیکول‌های انتقالی رتروگراد (رو به عقب)، دوباره از سیس ـ گلژی که دارای پروتئین‌های کارگو می‌باشد، به صورت فیزیکی از موقعیت سیس (نزدیک به ER) به موقعیت ترانس (دور از ER) حرکت می‌کند که به صورت متوالی ابتدا به سیسترنای وسطی تبدیل شده و سپس به یک سیسترنای ترانس گلژی تبدیل خواهد شد. این فرایند که تحت عنوان **بلوغ سیسترنایی**[6] خوانده می‌شود، شامل جوانه زدن و الحاق وزیکول‌های انتقالی آنتروگراد نمی‌شود. در طی بلوغ سیسترنایی، آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌های موجود در گلژی به‌طور ثابتی توسط وزیکول‌های انتقالی رتروگراد از سیسترنای دورتر گلژی به سیسترنای نزدیک‌تر برمی‌گردند. بنابراین در موقعیت سیسترنای سیس، وسطی و ترانس گلژی باقی خواهند ماند. همان‌طور که پروتئین‌های ترشحی در میان گلژی حرکت می‌کنند، می‌توانند تغییرات بیشتری از جمله اتصال به کربوهیدرات‌ها را که توسط گلیکوزیل ترانسفرازهای ویژه موجود در بخش‌های مختلف گلژی صورت می‌گیرد، به دست آورند.

پروتئین‌های موجود در مسیر ترشحی که برای غشای پلاسمایی و یا لیزوزوم هدف‌گیری شده‌اند، سرانجام به شبکه پیچیده‌ای از غشاها و وزیکول‌ها می‌رسند که **شبکه ترانس گلژی (TGN)** نام دارد. TGN نقطه بسیار مهمی در مسیر ترشحی محسوب می‌شود و توسط فرایندی که تحت عنوان **دسته‌بندی پروتئین**[7] خوانده می‌شود، یک پروتئین می‌تواند به درون یکی از وزیکول‌هایی که دست کم سه نوع متفاوت از آنها وجود دارد و از TGN جوانه می‌زنند، بارگیری شود. پس از جوانه زدن از شبکه ترانس گلژی، اولین نوع وزیکول، طی فرایندی به نام **اگزوسیتوز**، مستقیماً به سمت غشای پلاسمایی حرکت کرده و به آن متصل می‌شود و به این ترتیب محتویاتش را در خارج از سلول آزاد می‌کند، این در حالی است که پروتئین‌های غشای وزیکول به داخل غشای

1- Endocytic pathway
2- Compartment
3- Cargo proteins
4- Transport vesicle
5- Cisterna
6- Cisternal maturation
7- Protein sorting

غشای وارد می‌شود. در تمام گونه‌های سلولی، دست‌کم تعدادی از پروتئین‌ها به داخل چنین وزیکول‌هایی بارگیری می‌شوند و به‌طور بسته توسط چنین روشی به بیرون ترشح می‌گردند. دومین نوع از وزیکول‌ها که از شبکه ترانس گلژی جوانه می‌زنند و تحت عنوان **وزیکول ترشحی** خوانده می‌شوند، تا زمانی که پیام اگزوسیتوز سبب آزادسازی محتویات آنها از غشای پلاسمایی نشده است، درون سلول ذخیره می‌شوند. از میان پروتئین‌هایی که توسط چنین ترشح تنظیم شده‌ای آزاد می‌شوند، می‌توان به نمونه‌های زیر اشاره کرد: هورمون‌های پپتیدی (مثل انسولین، گلوکاگون، ACTH) از سلول‌های اندوکرین متفاوت، پیش‌ساز آنزیم‌های گوارشی از سلول‌های آسینی پانکراس، پروتئین‌های شیر از غدد پستانی، نوروترانسمیترها از نورون‌ها. سومین نوع وزیکولی که از شبکه ترانس‌گلژی جوانه می‌زند، به سوی **لیزوزوم** و اندامک‌های مسئول تجزیه ماکرومولکول‌های داخل سلولی و اندامک‌های ذخیره‌ای شبه لیزوزوم در سلول‌های مشخصی هدف‌گیری می‌شوند. پروتئین‌های ترشحی که برای لیزوزوم درنظر گرفته شده‌اند، ابتدا توسط وزیکول‌ها شبکه ترانس‌گلژی به بخشی با نام **اندوزوم تأخیری** منتقل می‌شوند سپس پروتئین‌ها به وسیله الحاق مستقیم اندوزوم با غشای لیزوزوم به درون لیزوزوم منتقل می‌شوند.

اندوسیتوز، فرایندی است که مکانیسم آن مرتبط با مسیر ترشحی است. در مسیر اندوسیتوزی، وزیکول‌هایی که از غشای پلاسمایی جوانه می‌زنند پروتئین‌ها و **لیگاندهای** متصل به آنها را از خارج به درون سلول می‌آورند (شکل ۱-۱۴ را ملاحظه کنید). بعد از آنکه مواد توسط اندوسیتوز به درون سلول منتقل شدند، برخی از پروتئین‌ها به وسیله اندوزوم تأخیری به لیزوزوم منتقل می‌شوند، در حالی که بقیه طی یک فرایند چرخه‌ای به سطح سلول بازمی‌گردند.

در این فصل، ابتدا به شرح تکنیک‌های آزمایشگاهی که به همه دانش ما در مورد مسیر ترشحی و اندوسیتوز کمک نموده است می‌پردازیم، سپس روی مبحث مربوط به مکانیسم‌های تجمعی جوانه‌زنی و اتصال غشای‌ها به هم متمرکز خواهیم شد. خواهیم دید که اگرچه انواع مختلف وزیکول‌های انتقالی، دستجات مختلفی از پروتئین‌ها را برای تشکیل و الحاق خود به کار می‌گیرند، اما همه وزیکول‌ها از یک مکانیسم عمومی یکسان برای جوانه‌زنی، هدف‌گیری نشانه‌های ویژه‌ای از مولکول‌های کارگو و اتصال به غشای هدف اختصاصی خود، استفاده می‌کنند. در دو بخش بعدی، نشان می‌دهیم که چگونه همکاری میان مراحل حمل و نقل وزیکول اختصاصی سبب حفظ ماهیت **بخش‌های** متفاوت (مثل یک دسته ثابت از پروتئین‌های موجود روی آنها) در ضمن عبور از مسیر ترشحی شده و هم‌چنین به نحوه انتخاب کارگو که در مرحله دسته‌بندی پروتئین‌ها برای رفتن به موقعیت‌های مختلف داخل سلولی نقش دارد می‌پردازیم. سپس توجهمان را به سمت مسیر اندوسیتوزی معطوف می‌کنیم تا بدین وسیله چگونگی فرآیند اندوسیتوز را که در انتقال ماکرومولکول‌ها از محیط خارج سلولی به سوی داخل سلول نقش دارد، مورد بررسی قرار دهیم و در نهایت به شرح مسیرهای متفاوتی خواهیم پرداخت که توسط آنها، پروتئین‌های غشایی و ماکرومولکول‌های داخل سلولی به سمت لیزوزوم رفته و در آنجا تجزیه و تخریب می‌گردند.

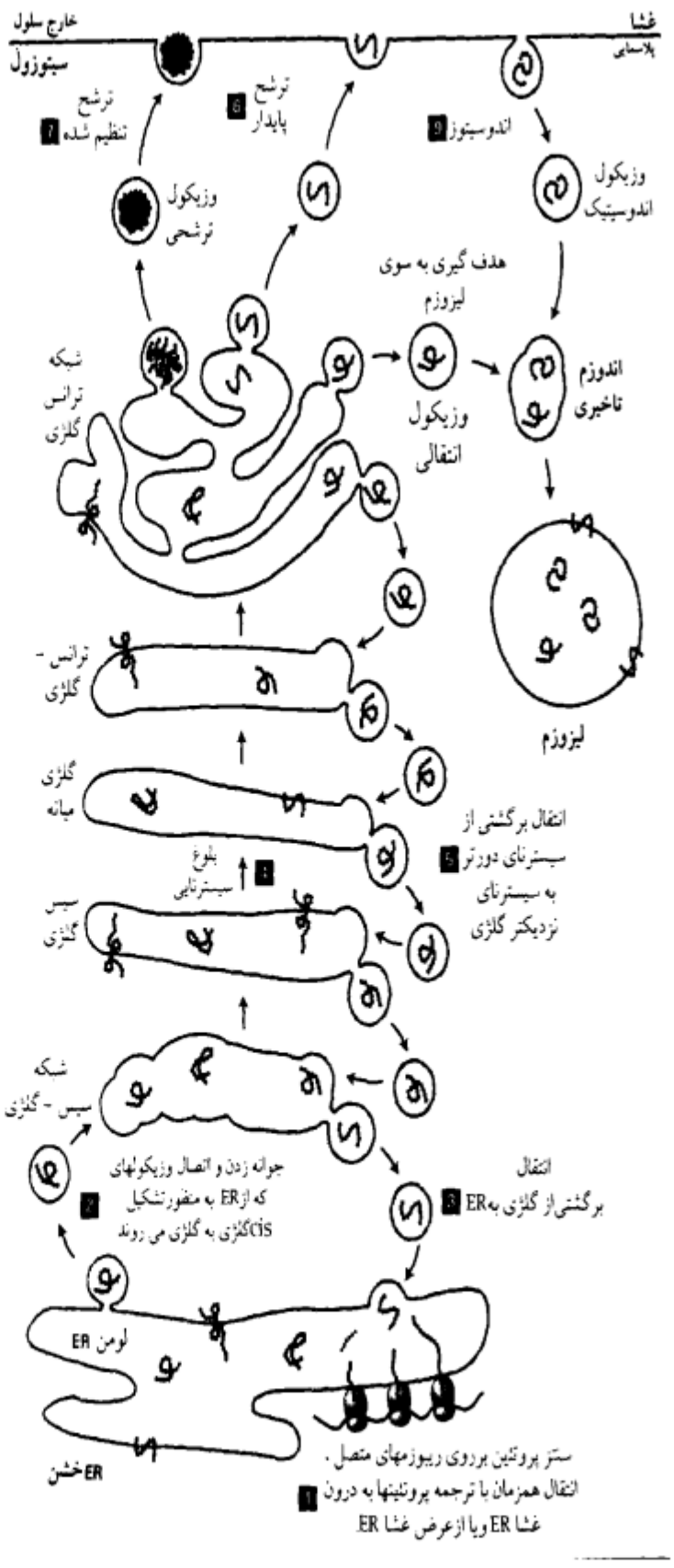
۱-۱۴ تکنیک‌های مورد استفاده در مطالعه مسیر ترشحی

کلید فهم نحوه انتقال پروتئین‌ها توسط اندامک‌های مسیر ترشحی در گسترش یک شرح اساسی از فعالیت و عملکرد وزیکول‌های انتقالی نهفته است.

بسیاری از ترکیبات مورد نیاز برای تشکیل و الحاق وزیکول‌های انتقالی، توسط یک هم‌گرایی قابل تشخیص ژنتیکی و مطالعات بیوشیمیایی که در این فصل شرح داده می‌شوند، در گذشته شناسایی گردید. تمامی مطالعاتی که بر روی حمل و نقل داخل سلولی پروتئین‌ها صورت گرفته است، چندین روش را برای سنجش نحوه انتقال یک پروتئین مورد نظر از بخشی به بخش دیگر به کار گرفته‌اند. ما ابتدا بحث خود را با بیان نحوه انتقال پروتئین‌ها در داخل سلول که در سلول‌های زنده صورت می‌گیرد، شروع می‌کنیم و سپس به شرح عوامل ژنتیکی در سیستم‌های *In Vitro* می‌پردازیم که اهمیت آنها در روشن نمودن فرایند مسیر ترشحی به اثبات رسیده است.

انتقال یک پروتئین توسط مسیر ترشحی می‌تواند در سلول‌های زنده مورد بررسی قرار گیرد

مطالعات کلاسیک جورج پالاد و همکارانش در سال ۱۹۶۰ در ابتدا نشان داد که در طی مسیر ترشحی، پروتئین‌ها مطابق ترتیب خاصی از یک اندامک به اندامک دیگر، حرکت می‌کنند. هم‌چنین در طی این مطالعات اولیه مشخص شد که پروتئین‌های ترشحی هرگز به داخل سیتوزول رها نمی‌شوند و این اولین نشانه‌ای بود که بیان می‌کرد پروتئین‌های انتقال‌یابنده، همیشه با چندین نوع واسطه غشای‌دار ترکیب می‌شوند. در این آزمایشات که ترکیب دو روش



شکل ۱-۱۴ خلاصه مراحل مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی در دسته‌بندی پروتئین‌ها. مسیر ترشحی: سنتز پروتئین‌های نشانه دارای یک توالی پیام ER، روی ER خشن کامل می‌شود ❶ و زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تازه سنتز شده به داخل غشای ER وارد می‌شوند و یا از غشای آن عبور کرده و به داخل لومن (فصل ۱۳) می‌روند. برخی پروتئین‌ها (مثل آنزیم‌های ER یا پروتئین‌های ساختمانی) در داخل ER باقی می‌مانند، اما سایرین در داخل وزیکول‌های انتقالی متراکم می‌شوند ❷ که نهایتاً از ER جوانه زده و به منظور تشکیل سیسترنای جدید سیس - گلژی به هم ملحق می‌گردند. پروتئین‌های دسته‌بندی نشده موجود در ER و پروتئین‌های غشای وزیکولی که برای استفاده‌های بعدی مورد نیازند، توسط وزیکول‌ها به ER برمی‌گردند ❸ که این وزیکول‌ها از سیس - گلژی جوانه می‌زنند و به ER منتقل می‌گردند. هر کدام از سیسترناهای سیس - گلژی به همراه محتوای پروتئینی‌اش به صورت فیزیکی از سمت سیس به ترانس کمپلکس گلژی حرکت می‌کند ❹ که این عمل توسط فرایند غیر وزیکولی که بلوغ سیسترنایی نام دارد، صورت می‌گیرد. وزیکول انتقالی رتروگراد ❺ پروتئین‌های موجود در گلژی را به جایگاه‌های مناسب‌شان در گلژی انتقال می‌دهند. در تمام سلول‌ها، پروتئین‌های ویژه محلول توسط وزیکول‌های انتقالی به سطح سلول متصل شده ❻ و به‌طور پیوسته (ترشح پایدار) به خارج ترشح می‌گردند. در انواع خاصی از سلول‌ها، برخی از پروتئین‌های محلول در داخل وزیکول‌های ترشحی دسته‌بندی می‌شوند و ❼ تنها زمانی آزاد می‌شوند که سلول یک پیام هورمونی یا عصبی مناسب را دریافت کند (ترشح تنظیم شده). پروتئین‌های غشایی و پروتئین‌های محلولی که سرنوشت‌شان به سوی لیزوزوم تعیین گردیده است در داخل وزیکول‌هایی که از ترانس - گلژی جوانه زده‌اند، حمل می‌شوند و ❽ ابتدا به سمت اندوزوم تأخیری و سپس به لیزوزوم رهسپار می‌گردند. مسیر اندوسیتوزی: پروتئین‌های محلول و پروتئین‌های غشایی خارج سلولی که در وزیکول‌های منشأ گرفته از غشای پلاسمایی قرار گرفته‌اند ❾ نیز می‌توانند توسط اندوزوم به سمت لیزوزوم حرکت کنند.

نشانه‌گذاری **pulse-chase** (شکل ۳۹-۳) و **اتورادیوگرافی** بود، اسیدهای آمینه نشاندار شده با رادیواکتیو به پانکراس هامستر (نوعی حیوان، مترجم) تزریق شد. در زمان‌های مختلف پس از تزریق، حیوان را می‌کشتند و سلول‌های پانکراس را از لحاظ شیمیایی تثبیت و سپس قطعه قطعه می‌کردند و آن را در معرض اتورادیوگرافی قرار می‌دادند تا موقعیت پروتئین‌های نشاندار شده با رادیواکتیو را رؤیت نمایند. به علت این‌که اسیدهای آمینه رادیواکتیو در یک زمان کوتاهی در اختیار سلول قرار می‌گرفتند، تنها آن دسته از پروتئین‌هایی که بلافاصله پس از تزریق سنتز شده بودند، نشاندار می‌گردیدند و یک گروه مجزا از پروتئین‌های نشاندار را تشکیل می‌دادند که انتقال آنها را می‌توانستند بررسی کنند. به علاوه به علت این‌که سلول‌های آسینی پانکراس، سلول‌های ترشحی اختصاصی هستند، تقریباً تمام اسیدهای آمینه نشاندار در این سلول‌ها در ساختمان پروتئین‌های ترشحی شرکت کرده بودند و این امر مشاهده پروتئین‌های انتقالی را آسان‌تر می‌نمود.

اگرچه امروزه روش اتورادیوگرافی برای موقعیت‌یابی پروتئین‌ها در سلول، کاربرد کمتری پیدا نموده است ولی این مطالعات اولیه دو نیاز اساسی را در هر نوع سنجشی که انتقالات **بین واحدهای مجزا**[1] را بررسی می‌کند، روشن می‌سازد. اول این‌که لازم است یک دسته از پروتئین‌ها را در مراحل اولیه نشاندار کنیم تا بتوان انتقالات بعدی‌شان را به بخش‌های دورتر، در طی زمان ردیابی نمود. ثانیاً این عمل راهی برای تشخیص یک بخش توسط پروتئین موجود در آن‌که نشاندار شده است می‌باشد. حال به شرح دو روش آزمایشگاهی مدرن برای مشاهده حمل و نقل داخل سلولی یک پروتئین ترشحی در تمام انواع سلول‌ها می‌پردازیم.

در هر دو روش، یک ژن که تعداد زیادی گلیکوپروتئین غشایی (G پروتئین) را می‌سازد از ویروس استوماتیت وزیکولار (VSV) جدا می‌شود و توسط ریز تزریق ژن به سلول‌های کشت داده شده پستانداران و یا توسط ترانس فکشن (آلودگی باکتری‌ها توسط اسید نوکلئیک ویروسی و سپس تولید فاژهای کامل در آنها) و یا حتی به صورت خیلی ساده، آلوده کردن سلول‌ها با ویروس، این گلیکوپروتئین را تولید می‌کنند. G پروتئین VSV هم در سلول‌های تیمار شده و هم آن دسته از سلول‌هایی که برای ترشح اختصاص داده نشده‌اند، به سرعت و همانند پروتئین‌های ترشحی نرمال سلولی روی ER سنتز می‌شوند. استفاده از یک جهش یافته که نوعی G پروتئین VSV حساس به حرارت را کد می‌کند، به محققان اجازه می‌دهد که انتقالات بعدی پروتئین را خاموش و روشن کنند. به این صورت که در دمای محدودکننده ۴۰°C، G پروتئین VSV تازه سنتز شده تاخوردگی خود را از دست داده و توسط مکانیسم کنترل کیفیت که در فصل ۱۳ شرح داده شد، درون ER باقی می‌ماند، در حالی که در دمای مجاز ۳۲°C، پروتئین به‌طور صحیح تا خورده و توسط مسیر ترشحی به سطح سلول منتقل می‌گردد.

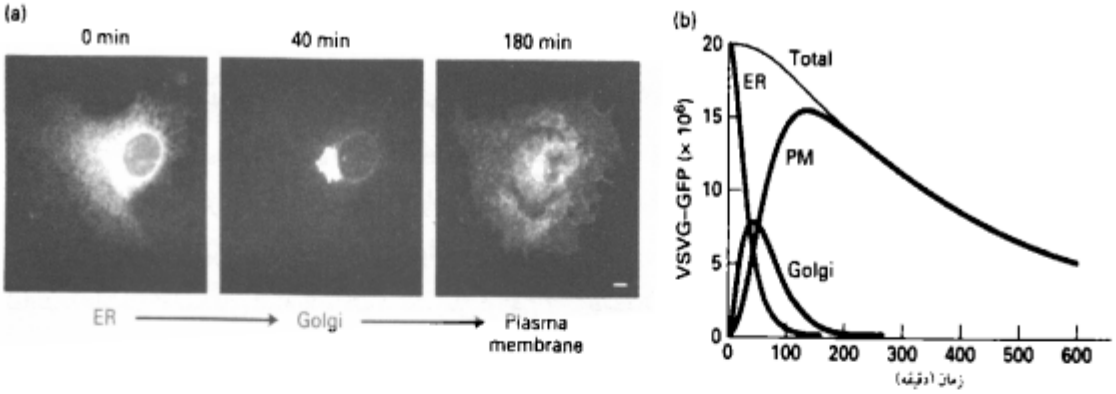
در هر دو روش پایه‌ای ذکر شده، انتقال G پروتئین VSV توسط تکنیک‌های متفاوتی مشخص می‌گردد. مطالعات هم از سنجش‌های پیشرفته نقل و انتقال و هم از آزمایشات جدید پالاد (اسم دانشمند) بهره می‌گیرند که همگی آنها نتیجه یکسانی را مشخص می‌کنند: در سلول‌های پستانداران، انتقال با واسطه وزیکول یک مولکول پروتئین از جایگاه سنتز آن روی ER خشن تا زمان ورود آن به درون غشای پلاسمایی، ۳۰ تا ۶۰ دقیقه طول می‌کشد.

بررسی میکروسکوپی G پروتئین VSV نشاندار با GFP: یکی از روش‌های مشاهده انتقال G پروتئین VSV استفاده از یک ژن هیبرید است که در آن ژن ویروسی به ژن کدکننده پروتئین فلورسنت سبز[2] (GFP) متصل شده است. GFP پروتئینی است که به‌طور طبیعی دارای خاصیت فلورسانس می‌باشد (فصل ۹). این ژن هیبرید را توسط تکنیک‌های شرح داده شده در فصل ۵ به داخل سلول‌های کشت داده شده منتقل می‌کنند. زمانی که سلول‌های بیان‌کننده فرم حساس به درجه حرارت پروتئین هیبریدی (VSVG-GFP)، در درجه حرارت‌های محدودکننده رشد می‌یابند، VSVG-GFPها در ER تجمع می‌یابند که در زیر میکروسکوپ فلورسنت به صورت یک شبکه تورمانندغشایی دیده می‌شوند. زمانی که سلول‌ها به‌طور متناوب در درجه حرارت‌های مجاز قرار می‌گیرند، VSVG-GFP در ابتدا به سمت غشاهای دستگاه گلژی که در کناره هسته به صورت متراکمی تجمع یافته، حرکت کرده و سپس به سطح سلول می‌رود (شکل ۱۴-۲a). محققان به واسطه بررسی پراکندگی VSVG-GFP در زمان‌های مختلف بعد از قرار دادن سلول‌ها در درجه حرارت‌های مجاز، می‌توانند به چگونگی طویل‌سازی ریشه‌های VSVG-GFP در اندامک‌های دخیل در مسیر ترشحی پی برند (شکل ۱۴-۲b).

بررسی تغییرات اولیگوساکاریدهای ویژه در هر بخش سلول: یک مسیر ثانویه که در ضمن انتقال پروتئین‌های ترشحی صورت

1- Intercompartmental

2- Green flourescent protein

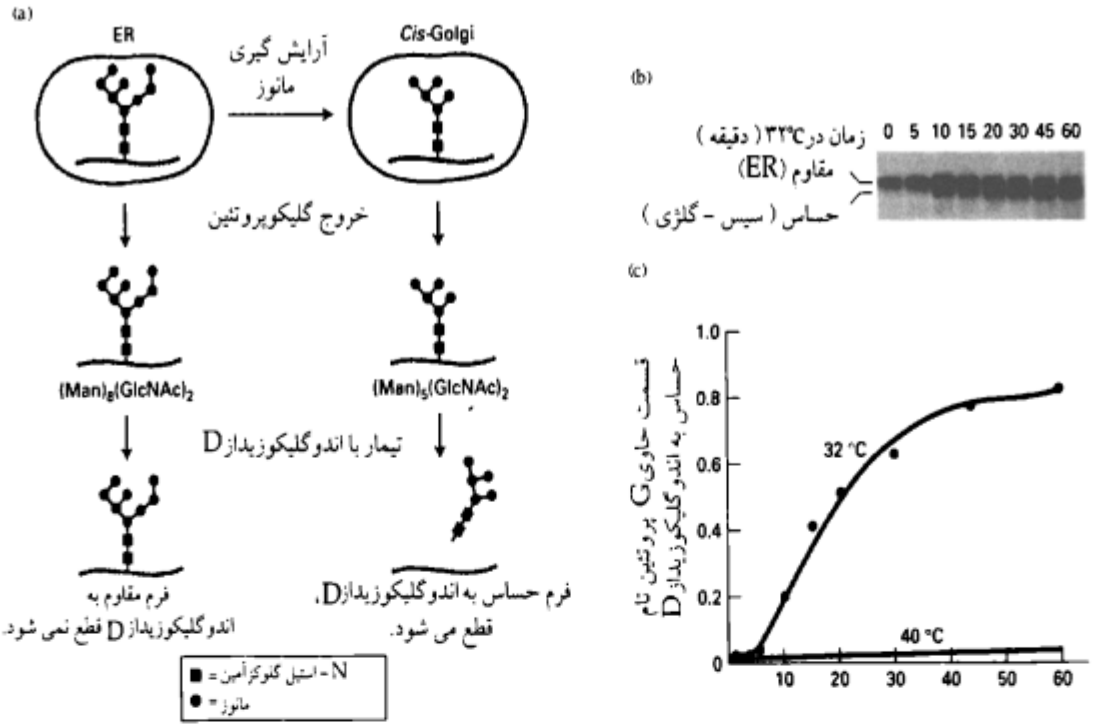


▲ **شکل تجربی ۲-۱۴. انتقال پروتئین توسط مسیر ترشحی می‌تواند بوسیلهٔ میکروسکوپ فلورسنت سلولهای تولید کنندهٔ پروتئین غشایی دارای دنبالهٔ GFP قابل مشاهده گردند.** سلولهای کشت داده شده توسط یک ژن هیبریدی که G پروتئین VSV (یک گلیکوپروتئین ویروسی) و پروتئین سبز فلورسنت (GFP) را کد می‌کند ترانسفکت شدند. شکل جهش یافتهٔ ژن ویروسی به همراه GFP ،پروتئین هیبریدی (VSVG-GFP) را تولید می‌کند که در ۴۰°C در ER مانده ولی در ۳۲°C برای انتقال آزاد می‌شود. (a) میکروگراف فلورسنت از سلولها قبل و بعد از دو زمانی که آنها به دمای پایین منتقل شدند. حرکت VSVG-GFP از به گلژی و در نهایت به سطح سلول در عرض ۱۸۰ دقیقه صورت می‌گیرد. (b) منحنی میزان VSVG-GFP در شبکهٔ آندوپلاسمی (ER)، گلژی و غشای پلاسمایی (PM) در زمانهای مختلف بعد از انتقال به دماهای پایین. کینتیک انتقال از یک اندامک به دیگری می‌تواند با استفاده از آنالیز کامپیوتری این داده‌ها استنباط گردد. کاهش فلورسنت کلی احتمالاً در نتیجهٔ غیر فعال شدن آهسته فلورسانس GFP می‌باشد.

می‌گیرد، سبب ایجاد تغییراتی در زنجیره‌های جانبی کربوهیدرات آنها می‌شود که این اعمال در مراحل مختلف مسیر ترشحی صورت‌می‌گیرند. برای درک این مطلب به خاطر بیاورید که بسیاری از پروتئین‌های ترشحی که ER را ترک می‌کنند دارای یک یا چندین کپی از **اولیگوساکارید با اتصال N**، $Man_8(GlcNAc)_2$ هستند که بر روی پروتئین‌های ترشحی در ER سنتز و به آنها متصل می‌شوند (شکل ۱۸ـ۱۳). همان‌طور که یک پروتئین از میان کمپلکس گلژی حرکت می‌کند آنزیم‌های متفاوتی که در سیسترناهای سیس، وسطی و ترانس‌گلژی قرار گرفته‌اند، توالی منظمی از واکنش‌های مربوط به سنتز هسته $Man_8(GlcNAc)_2$ را به همان صورتی که در بخش قبلی این فصل شرح داده شد، انجام می‌دهند. برای مثال، گلیکوزیدازهایی که به‌طور اختصاصی در بخش‌های سیس گلژی واقع شده‌اند به‌طور متناوب، ریشه‌های مانوز را از انتهای این هسته اولیگوساکاریدی برمی‌دارند تا سرانجام فرم «**آرایش یافته**»[1] آن به صورت $Man_5(GlcNAc)_2$ درآید. دانشمندان به منظور تمیز دادن پروتئین‌های گلیکوزیله باقی‌مانده در ER از آنهایی که به درون سیس‌گلژی می‌روند از یک آنزیم اختصاصی قطع‌کننده کربوهیدرات به نام اندوگلیکوزیداز D استفاده می‌کنند: اولیگوساکاریدهای آرایش یافته مخصوص سیس‌گلژی توسط اندوگلیکوزیداز D از پروتئین جدا می‌شوند در حالی که زنجیره‌های هسته اولیگوساکاریدی (بدون آرایش) موجود بر روی پروتئین‌های ترشحی نسبت به شکاف توسط این آنزیم مقاوم هستند (شکل ۱۴ـ۳a). به دلیل این‌که پروتئین‌های گلیکوزیله حاصل از هضم با اندوگلیکوزیداز D نسبت به پروتئین‌های گلیکوزیله مشابه، بر روی ژل SDS سریع‌تر حرکت می‌کنند، می‌توان آنها را به سادگی از هم افتراق داد (شکل ۱۴ـ۳b).

این نوع بررسی‌ها را می‌توان برای پیگیری مسیر حرکت G پروتئین VSV در سلول‌های آلوده به ویروس که با اسیدهای آمینه رادیواکتیو نشان‌دار شده‌اند، به کار گرفت. بلافاصله پس از نشاندار کردن، تمام G پروتئین‌های نشاندار خارج شده، هنوز در ER هستند و به هضم توسط اندوگلیکوزیداز D مقاوم می‌باشند. اما پس از گذشت زمان، یک بخش در حال ازدیاد از گلیکوپروتئین‌ها نسبت به هضم حساس می‌گردند. این دگرگونی و تبدیل G پروتئین VSV از شکل مقاوم به اندوگلیکوزیداز D به شکل حساس به اندوگلیکوزیداز، نشانه انتقال وزیکولی پروتئین‌ها از ER به سیس‌گلژی است. نکته در اینجاست که انتقال G پروتئین VSV از ER به گلژی چیزی در حدود ۳۰ دقیقه به طول می‌انجامد که این همان چیزی است که در بررسی‌های مبتنی بر پردازش اولیگوساکاریدی و یا بررسی VSV-GFP با میکروسکوپ فلورسنت اندازه‌گیری می‌گردد (شکل

1- Trimmed

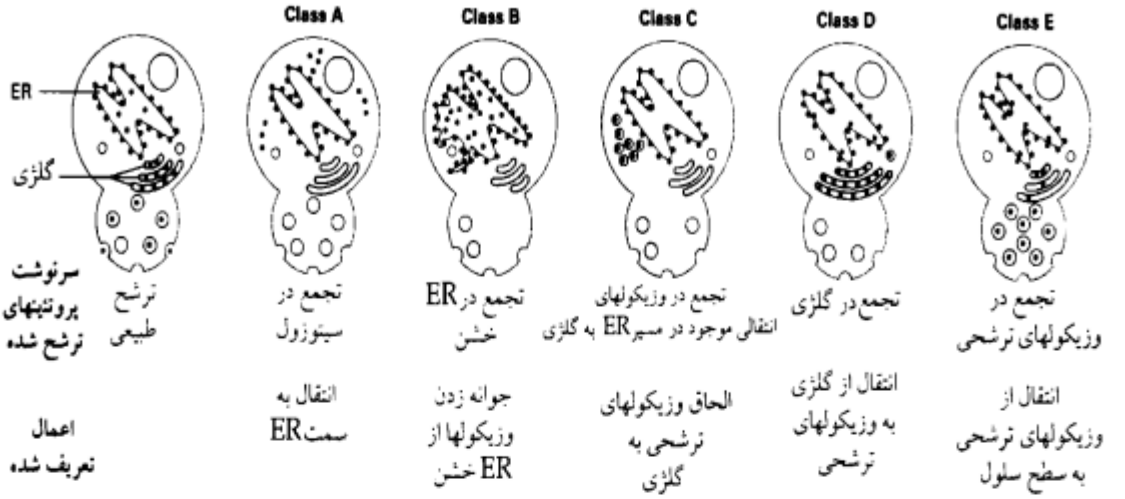


▲ **شکل تجربی ۳ـ۱۴ انتقال یک گلیکوپروتئین غشایی از ER به گلژی را می‌توان بر اساس حساسیت به قطع توسط اندوگلیکوزیداز D بررسی کرد.** اگر سلول‌های بیان‌کننده یک G پروتئین VSV حساس به درجه حرارت (VSVG) که توسط اضافه کردن اسیدهای آمینه رادیواکتیو به آن نشاندار شده‌اند، در درجه حرارت‌های غیر مجاز قرار گیرند، پروتئین نشاندار در ER باقی خواهد ماند. در زمان‌های متناوب پس از قرارگیری مجدد در درجه حرارت مجاز ۳۲°C، VSVG از سلول‌ها خارج می‌شود و با اندوگلیکوزیداز D هضم می‌گردد. (a) همان‌طور که پروتئین‌ها از ER به سمت سیس گلژی حرکت می‌کنند، هسته اولیگوساکاریدی $Man_8(GlcNAc)_2$ توسط آنزیم‌های موجود در قسمت سیس گلژی به صورت آرایش $Man_8(GlcNAc)_2$ درمی‌آید. اندوگلیکوزیداز D زنجیره‌های اولیگوساکاریدی را از پروتئین‌هایی که در سیس گلژی پردازش شده‌اند و نه از پروتئین‌هایی که در ER هستند، جدا می‌کند. (b) الکتروفورز ژل SDS مربوط به فرم‌های مخلوط‌های حاصل از هضم VSVG نشاندار، فرم‌های مقاوم و قطع نشده (با حرکت کندتر) را از فرم حساس و قطع شده (با حرکت سریع‌تر) جدا می‌کند. همان‌طور که این الکتروفورز نشان می‌دهد، در ابتدا تمام VSVGها نسبت به هضم مقاوم بودند، اما با گذشت زمان یک بخش بزرگی نسبت به هضم حساس می‌شوند که نشان‌دهنده پروتئین‌هایی است که از ER به سمت گلژی منتقل شده و در آنجا پردازش یافته‌اند. در سلول‌های کنترل که در دمای ۴۰°C نگهداری شده‌اند، بعد از ۶۰ دقیقه تنها VSVGهایی با حرکت آهسته و مقاوم به هضم دیده می‌شود (نشان داده نشده است). (c) نمودار پروپروتئین VSVG حساس به هضم که از طریق داده‌های حاصل از الکتروفورز ترسیم شده است، مسیر انتقالی گلژی ER را نشان می‌دهد.

۳c ـ۱۴). یک نوع متفاوت از بررسی‌ها مبتنی تغییرات الیگوساکاریدی‌دست که در قسمت‌های دورتر گلژی اتفاق می‌افتد که به منظور اندازه‌گیری زمان پیشروی G پروتئین VSV از میان هرقسمت ازدستگاه گلژی نیز توسعه یافته است.

مخمرهای جهش یافته، مراحل اصلی و اکثر ترکیبات موجود در انتقال وزیکولی را مشخص می‌نمایند

اصول کلی نحوه سازمان‌یابی مسیر ترشحی و بسیاری از ترکیبات مولکولی مورد نیاز در نقل و انتقالات وزیکولی در تمام سلول‌های یوکاریوتی مشابه می‌باشد. به دلیل وجود چنین مشابهتی، مطالعات ژنتیکی انجام شده با مخمر می‌تواند در تأیید و تصدیق توالی مراحل مسیر ترشحی و مشخص نمودن اکثر پروتئین‌های شرکت‌کننده در نقل و انتقال وزیکولی سودمند باشد. اگرچه مخمرها تعداد کمی پروتئین را به درون محیط رشدشان ترشح می‌کنند، اما به‌طور مداوم و پیوسته تعدادی آنزیم را که در فضای باریک میان غشای پلاسمایی و دیواره سلولی قرار گرفته است ترشح می‌کنند. بهترین نوع مطالعه شده از این آنزیم‌ها، اینورتاز است که دی‌ساکارید سوکروز را به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌کند.



▲ **شکل ۴-۱۴ (شکل رنگی) فنوتیپ جهش یافته‌های sec مخمری، مراحل مسیر ترشحی را روشن نموده است.** این جهش یافته‌های حساس به درجه حرارت را می‌توان در پنج کلاس طبقه‌بندی نمود و اساس این کار بر پایه جایگاهی است که در آنجا پروتئین‌هایی که به تازگی سنتز و ترشح شده‌اند (نقاط قرمز) تجمع می‌یابند. این عمل هنگامی صورت می‌پذیرد که سلول‌ها از درجه حرارت‌های مجاز به درجه حرارت‌های بالاتر منتقل می‌شوند، یعنی به حرارت‌های غیر مجاز می‌روند. تحلیل و بررسی جهش یافته‌های دوتایی این امکان را می‌دهد که ترتیب توالی مراحل در این مسیر، مشخص گردد.

تعداد زیادی از مخمرهای جهش یافته در ابتدا بر اساس توانایی‌شان در ترشح پروتئین‌ها در یک درجه حرارت وعدم توانایی‌شان در این کار و سپس در یک درجه حرارت غیر مجاز و بالاترمشخص شدند. زمانی که جهش یافته‌های ترشحی (sec) حساس به حرارت را از درجه حرارت پایین‌تر به بالاتر انتقال می‌دهند، پروتئین‌های ترشحی در نقطه‌ای که در مسیر ترشحی توسط جهش مسدود شده است، تجمع می‌یابند. با بررسی چنین جهش یافته‌هایی، پنج کلاس (A-E) شناسایی شد که به وسیله تجمع پروتئین‌ها در سیتوزول، ER خشن، وزیکول‌های کوچکی که پروتئین‌ها را از ER به کمپلکس گلژی می‌برند، سیسترنای گلژی و یا وزیکول‌های دارای ترشح پایدار مشخص می‌گردند (شکل ۴-۱۴). دسته‌بندی کردن جهش یافته‌های sec در کلاس‌های مختلف کمک بزرگی به روشن شدن ترکیبات اصلی و مکانیسم‌های مولکولی نقل و انتقالات وزیکولی کرده، که در بخش‌های بعدی شرح داده می‌شود.

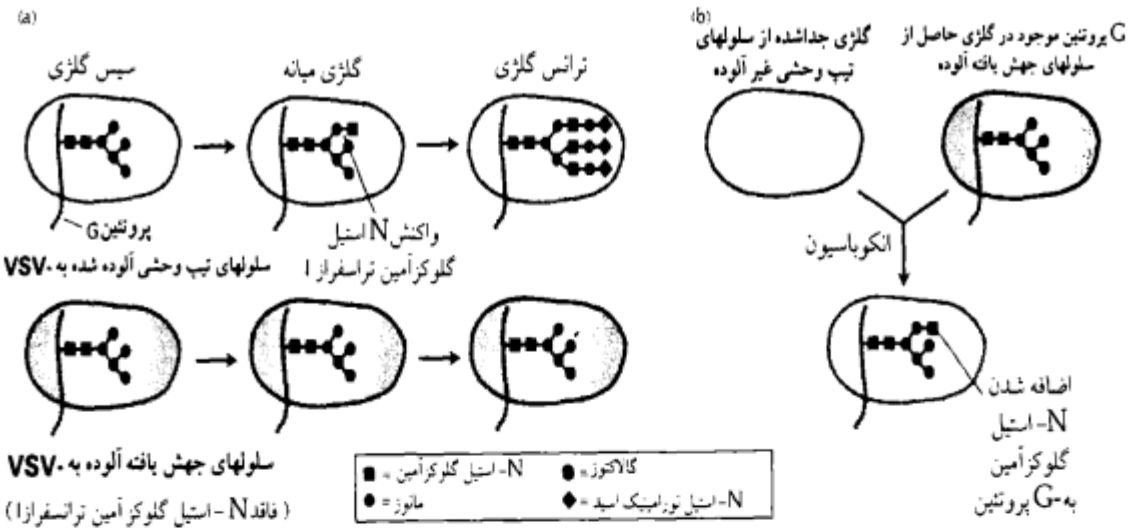
به منظور مشخص شدن ترتیب مراحل در این مسیر، محققین جهش یافته‌های دوتایی sec را مورد بررسی قرار دادند. برای مثال زمانی که سلول‌های مخمر در عملکردهای هر دو کلاس B و D با هم جهش یابند، پروتئین‌ها در ER خشن و نه در سیسترنای گلژی تجمع می‌یابند. بنابراین اگر تجمع پروتئین‌ها در ابتدایی‌ترین مراحل مسدود گردد؛ به این معناست که جهش‌های مربوط به کلاس B در نقطه‌ای از مسیر که مقدم‌تر از محل اثر جهش در کلاس D است عمل می‌کنند. این مطالعات تأیید می‌کنند همان‌طور که یک پروتئین سنتز شده و پردازش می‌یابد، به‌طور تدریجی در مسیر سیتوزول ER ← خشن ← ER به وزیکول‌های انتقالی گلژی ← سیسترنای گلژی ← وزیکول‌های ترشحی حرکت کرده و سرانجام از طریق اگزوسیتوز به خارج از سلول می‌رود.

سه روشی که در این بخش به‌طور مختصر شرح داده شد، یک طرح کلی راجع به مراحل اصلی مسیر ترشحی ارائه نموده و در شناسایی بسیاری از پروتئین‌های مسئول جوانه زدن و الحاق وزیکول‌ها کمک بزرگی نموده است. جزئیات مکانیسمی هر کدام از مراحل موجود در مسیر ترشحی مورد مطالعه قرار گرفته است و به‌طور فزاینده‌ای از بررسی‌های بیوشیمیایی و مطالعات ژنتیک مولکولی نیز برای مطالعه هر کدام از این مراحل در ارتباط با اعمال منحصر به فرد مولکول‌های پروتئینی موجود در این مسیرها، استفاده می‌گردد.

سنجش‌های انتقالی در سیستم‌های فاقد سلول امکان جداسازی تک‌تک مراحل انتقال وزیکولی را ممکن ساخته است

بررسی‌های انجام شده در *In Vitro* بر روی انتقالات **بین نواحی جدا از هم**[1]، مکمل بسیار سودمندی برای اطلاعات حاصل

1- Intercompartmental



▲ **شکل تجربی ۵-۱۴ به‌کارگیری سیستم‌های فاقد سلول، نحوه انتقال پروتئین را از یک سیسترنا به سیسترنای دیگر گلژی مشخص نموده است.** (a) در این نوع سنجش، استفاده از یک دودمان از سلول‌های فیبروبلاست جهش یافته موجود در محیط کشت ضروری است. در این مثال، سلول‌ها فاقد آنزیم N- استیل گلوکزآمین ترانسفراز (مرحله ❷ در شکل ۴-۱۴) هستند. در سلول‌های تیپ وحشی، این آنزیم در محل گلژی وسطی قرار دارد و باعث افزودن یک N- استیل گلوکزآمین به اولیگوساکاریدهای با اتصال N می‌شود. در سلول‌های تیپ وحشی آلوده به VSV اولیگوساکارید موجود بر روی G پروتئین ویروسی، همان‌طور که در تصویر ترانس ـ گلژی نشان داده شده است به صورت یک کمپلکس اولیگوسارکاریدی معمول تغییر کرده است. در سلول‌های جهش یافته آلوده به ویروس، G پروتئین به واسطه یک اولیگوساکارید پُرمانوز که تنها حاوی دو ریشه N-استیل گلوکزآمین و پنج ریشه مانوز است به سطح سلول می‌چسبد. (b) زمانی که سیسترنای گلژی جدا شده از سلول‌های جهش یافته آلوده با سیسترنای گلژی حاصل از سلول‌های غیر آلوده و طبیعی انکوبه می‌شود، G پروتئین VSV تولید شده در *In Vitro* دارای تعداد بیشتری N- استیل گلوکزآمین خواهد بود. این تغییرات توسط آنزیم ترانسفرازی صورت می‌گیرد که توسط وزیکول‌های انتقالی از سیسترنای گلژی میانه تیپ وحشی به سمت سیسترنای گلژی سیس جهش یافته موجود در مخلوط واکنش منتقل شده است.

از مطالعه مخمرهای جهش یافته sec به منظور شناسایی و بررسی ترکیبات سلولی دخیل در نقل و انتقالات وزیکولی است. در یک نمونه از موارد کاربرد این اطلاعات، سلول‌های جهش یافته موجود در محیط کشت که فاقد یکی از آنزیم‌های دخیل در پردازش زنجیره‌های اولیگوساکاریدی با اتصال N در گلژی است را با ویروس استوماتیت‌وزیکولار (VSV) آلوده می‌سازند. به عنوان مثال، اگر سلول‌های آلوده شده فاقد N- استیل گلوکز آمین ترانسفراز I باشند، می‌توانند تعداد بسیار زیادی G پروتئین VSV تولید کنند، اما قادر نیستند همانند سلولهای تیپ وحشی، ریشه‌های N- استیل گلوکزآمین را به زنجیره‌های الیگوساکاریدی در ناحیهٔ گلژی و سطحی اضافه نمایند (شکل ۵a-۱۴). هنگامی که غشاهای گلژی از چنین سلول‌های جهش یافته‌ای جدا شوند و با غشاهای گلژی مربوط به سلول‌های تیپ وحشی غیر آلوده ادغام شوند، اضافه شدن N- استیل گلوکز آمین به G پروتئین VSV دوباره انجام می‌شود (شکل ۵b-۱۴). این تغییرات، نتیجه انتقال وزیکولی N- استیل گلوکزآمین ترانسفراز I از گلژی وسطی تیپ وحشی به قطعات سیس‌گلژی سلول‌های جهش یافته آلوده به ویروس است. انجام موفقیت‌آمیز این انتقالات میان بخش‌های مجزا در یک سیستم فاقد سلول به وجود شرایط لازم برای انجام یک فرایند فیزیولوژیک شامل عصاره سیتوزولی، منبع انرژی شیمیایی ATP و GTP و انکوباسیون در درجه حرارت‌های فیزیولوژیک وابسته می‌باشد.

به علاوه، تحت شرایط مناسب، جمعیت یکسانی از وزیکول‌های انتقالی که N- استیل گلوکزآمین ترانسفراز I را از گلژی میانه به گلژی سیس انتقال می‌دهند را می‌توان توسط سانتریفیوژ از غشاهای گلژی فرم وحشی جداسازی کرد. آزمایش نمودن پروتئین‌هایی که در چنین وزیکول‌هایی تغلیظ شده‌اند به دانشمندان این امکان را می‌دهد که بتوانند بسیاری از پروتئین‌های سراسری و پروتئین‌های سطحی موجود در پوشش وزیکولی که جزو ترکیبات ساختمانی این نوع از

وزیکول‌ها هستند را شناسایی نمایند. تجزیه عصاره سیتوزولی مورد نیاز برای انجام فرایند انتقال در مخلوط‌های فاقد سلول، امکان جداسازی پروتئین‌های متفاوت مورد نیاز برای تشکیل وزیکول‌های انتقالی و پروتئین‌های لازم برای هدف‌گیری و الحاق وزیکول با غشاهای گیرنده مناسب را فراهم می‌کند. سنجش‌های انجام شده در محیط *In Vitro* از نظر اصول کلی با آنچه که در شکل ۵-۱۴ نشان داده شده است، مشابه می‌باشد و از آنها می‌توان در مطالعه مراحل متفاوت انتقال در طی مسیر ترشحی استفاده نمود.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۴

روشهای مطالعهٔ مسیرهای ترشحی

- تمام روشهای بررسی عبور و مرور پروتئین‌ها از مسیرهای ترشحی در سلولهای زنده به روشهایی برای نشاندارکردن پروتئین‌های ترشحی و روشهایی برای جداکردن بخشهای نشاندارشدهٔ پروتئین نیاز دارند.
- نشاندارسازی پالسی با اسیدهای آمینه رادیواکتیو می‌تواند به طور ویژه پروتئین‌های موجود در ER را نشاندار کند. به علاوه پروتئین‌های موتانت حساس به حرارتی که در یک دمای مجاز به ERبرمی گردند هنگامی که سلولها به سمت دمای مجاز سوق داده می‌شوند می‌توانند آزاد شوند.
- انتقال پروتئین‌های نشاندار با مواد فلورسنت در مسیرهای ترشحی می‌تواند بوسیله میکروسکوپ مشاهده گردد (شکل ۲-۱۴ را ملاحظه کنید). انتقال پروتئین‌های نشاندارشده با مواد رادیواکتیو بطور عمومی توسط تغییرات کووالان ویژه پروتئین‌های بخشها ردیابی می‌شود.
- بسیاری از ترکیبات مورد نیاز برای حمل و نقل داخل سلول پروتئین‌ها در مخمر توسط آنالیز نقص‌های موتانت sec حساس به حرارت برای ترشح پروتئین‌ها در دماهای غیرمجاز جداشده است (شکل ۴-۱۴ را ملاحظه کنید).
- سیستم‌های فاقد سلول در انتقال بین بخشی پروتئین‌ها اجازه تفکیک تک‌تک مراحل ترشحی مسیر را فراهم کرده است. واکنشهای آزمایشگاهی می‌توانند برای تولید وزیکول‌های انتقالی خاص و بررسی اعمال بیوشیمیایی تک‌تک پروتئین‌های انتقالی استفاده شوند.

۲-۱۴ مکانیسم‌های مولکولی نقل و انتقالات وزیکولی

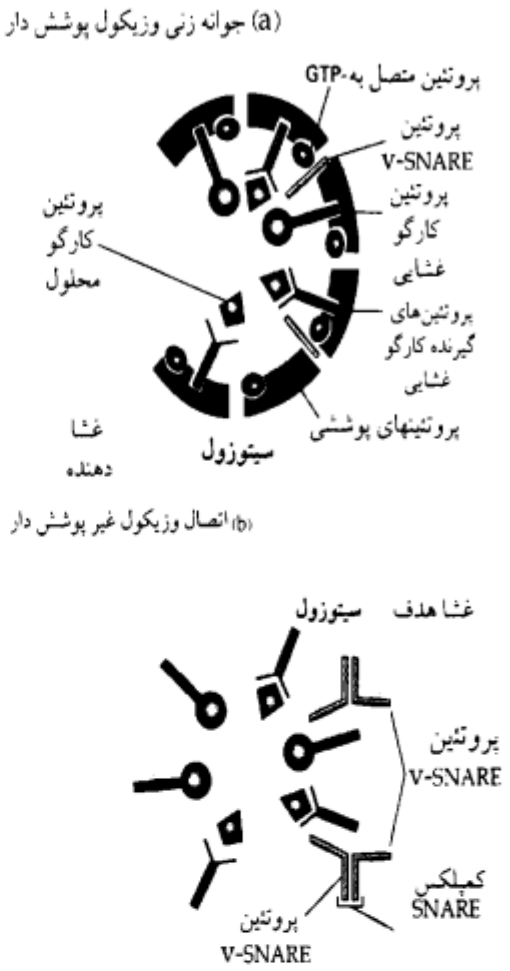
وزیکول‌های کوچک غشاداری که پروتئین‌ها را از یک اندامک به اندامک دیگر انتقال می‌دهند، عناصر مشترک مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی می‌باشند (شکل ۱-۱۴ را ملاحظه کنید). این وزیکول‌ها از غشای یک اندامک ویژه (دهنده) «والد» جوانه زده و با غشای اندامک ویژه (پذیرنده) «هدف» ادغام می‌شود. اگرچه در هر مرحله از مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی انواع متفاوتی از وزیکول‌ها به کار گرفته می‌شوند، اما مطالعات مبتنی بر تکنیک‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان داده‌اند که هر کدام از مراحل مختلف انتقال وزیکولی با وجود داشتن تفاوت‌هایی با سایرین، دارای زمینه یکسانی هستند. در این بخش، به شرح مکانیسم‌های اساسی که جوانه‌زنی و ادغام وزیکول‌ها (پدیده‌هایی که در میان تمامی انواع وزیکول‌ها مشترک است) را در بر می‌گیرد، خواهیم پرداخت.

جوانه زدن وزیکول‌ها از غشای والدشان در نتیجه پلیمریزاسیون کمپلکس‌های پروتئینی محلول به سمت غشای به منظور تشکیل یک پوشش وزیکولی **حاوی پروتئین** می‌باشد (شکل ۶-۱۴a). بر هم‌کنش میان قسمت‌های سیتوزولی پروتئین‌های سراسری غشای و پوشش وزیکولی، پروتئین‌های کارگو را به منظور تشکیل وزیکول آماده می‌کند. بنابراین پوشش، نه تنها سبب انحنای غشای برای تشکیل یک وزیکول می‌شود، بلکه هم‌چنین به عنوان یک فیلتر عمل کرده و مشخص می‌کند چه پروتئین‌هایی اجازه دخول به درون وزیکول را دارند.

پروتئین‌های سراسری غشایی موجود در یک وزیکول در حال جوانه زدنی، پروتئین‌های **v-SNAREs** هستند که برای اتصال وزیکول با غشای هدف مناسب خود ضروری و حیاتی هستند. مدت زمان کوتاهی پس از آن‌که وزیکول به‌طور کامل توسط v-SNAREهای موجود در غشای خود با **t-SNARE**های خویشاوندش در غشای هدف اتصال اختصاصی برقرار کرد، دو غشای به‌طور مناسبی به هم نزدیک شده و دو لایه‌های دو غشای با هم ادغام می‌شوند (شکل ۶-۱۴b). ما هم‌اکنون به شرح جزئیات دقیق‌تر مکانیسم‌های جوانه‌زنی، قطع شدن جوانه از غشای و الحاق آن می‌پردازیم و سپس در بخش‌های بعدی ویژگی‌های مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی را بیان خواهیم کرد.

نحوه سازمان‌یابی پوشش پروتئینی، نقش یک محرک در تشکیل وزیکول و انتخاب مولکول‌های کارگو دارد

سه نوع وزیکول پوشش‌دار شناخته شده، که هر کدام پوشش پروتئینی متفاوتی دارند و توسط پلیمریزاسیون برگشت‌پذیر دستجات متفاوتی از زیرواحدهای پروتئینی تشکیل می‌گردند (جدول



▲ **شکل ۶-۱۴ نگاه کلی به فرایند جوانه زنی وزیکول و الحاق آن به غشای هدف.** جوانه زنی به واسطه اتصال یک پروتئین کوچک متصل به GTP به قطعه‌ای از غشاء دهنده شروع می‌شود. سپس کمپلکس‌های پروتئین‌های پوششی به دُمین سیتوزولی پروتئین‌های غشایی کارگو متصل می‌شوند که تعدادی از آنها می‌توانند به عنوان رسپتور عمل کرده و به پروتئین‌های محلول موجود در لومن می‌چسبند، به این ترتیب پروتئین‌های کارگوی لومنی، موقعیتی را ایجاد می‌کنند که برای جوانه زدن وزیکول مناسب است. (b) پس از آن‌که پوشش وزیکول شروع به آزاد شدن و جدا شدن از غشای نمود، وزیکول طبق فرایندی که مستلزم بر هم‌کنش پروتئین‌های SNARE خویشاوند با هم است، به غشای هدفش متصل می‌گردد.

۱-۱۴). هر نوع وزیکول بر اساس پروتئین‌های پوششی اولیه خود نام‌گذاری می‌شود که پروتئین‌های کارگو را از اندامک‌های ویژه والد به اندامک‌های اختصاصی مجزا انتقال می‌دهد:

■ وزیکول‌های **COPII** پروتئین‌ها را از ER خشن به گلژی منتقل می‌کند.

■ وزیکول‌های **COPI** اساساً پروتئین‌ها را به صورت رتروگراد میان سیسترنای گلژی منتقل کرده و از سیس گلژی به ER خشن برمی‌گردانند.

■ وزیکول‌های **کلاترین** پروتئین‌ها را از غشای پلاسمایی (سطح سلول) و شبکه ترانس‌گلژی به اندوزوم‌های تأخیری منتقل می‌کنند.

در هر مرحله از نقل و انتقالات با واسطه وزیکولی، تعدادی از انواع پوشش وزیکولی استفاده می‌شود؛ با این حال یک کمپلکس از پروتئین‌های پوششی خاص فقط مختص به یک نوع وزیکول نیست. برای مثال، هنوز محققان پروتئین‌های احاطه کننده وزیکول‌هایی که پروتئین‌ها را از ترانس‌گلژی به غشای پلاسمایی در طی پدیده ترشح پایدار یا تنظیم شده منتقل می‌کنند، پی نبرده‌اند.

نمای کلی جوانه زدن وزیکول که در شکل ۶a-۱۴ نشان داده شده است، برای هر سه نوع وزیکول پوشش‌دار کاربرد دارد. آزمایشات صورت گرفته بر روی غشاهای جدا شده یا مصنوعی و پروتئین‌های پوششی تخلیص شده نشان می‌دهد که پلیمریزاسیون پروتئین‌های پوششی به سمت سطح سیتوزولی غشای والد یک مرحله ضروری برای ایجاد انحنا در غشا است که در حالت عادی برای یک وزیکولی انتقال حدود ۵۰nm قطر دارد. میکروگراف الکترونی حاصل از واکنش‌های جوانه‌زنی انجام شده در *In Vitro* غالباً نشان‌دهنده نواحی مجزایی در غشای والد است که پوشش متراکمی را که دارای فاکتورهای منحنی‌کننده یک وزیکول کامل شده است، ایجاد می‌کنند (شکل ۷-۱۴). چنین ساختمان‌هایی که معمولاً جوانه‌های وزیکولی نامیده می‌شوند، به نظر می‌رسد حدواسطهایی هستند که پس از شروع پلیمریزاسیون پروتئینهای پوششی و قبل از آنکه وزیکول کامل شده از غشاء والد جدا شود، دیده می‌گردند. به نظر می‌رسد پروتئین‌های پوششی پلیمریزه شده به واسطه اتصال به سطح سیتوزولی غشای، به عنوان محرک تشکیل جوانه وزیکولی در فرایند شکل‌گیری برخی از انواع شبکه‌های انحنادار عمل می‌کنند.

مجموعه‌ای از پروتئین‌های GTPase سوئیچ‌کنندهٔ به شدت محافظت شده، همایش وزیکول‌های پوشش‌دار مختلف را کنترل می‌کنند

دانشمندان بر اساس آزمایشات انجام شده در محیط *In Vitro* بر روی واکنش‌های جوانه‌زنی وزیکول توسط غشاهای جدا شده و پروتئین‌های پوششی تخلیص شده، موفق به تعیین تعدادی از ترکیبات پوششی مورد نیاز برای تشکیل هر کدام از سه نوع اصلی وزیکول‌ها شده‌اند. اگرچه تعدادی از پروتئین‌های پوششی هر نوع

جدول ۱ـ۱۴ انواع وزیکول‌های پوشش‌داری که در نقل و انتقالات پروتئین‌ها شرکت می‌کنند

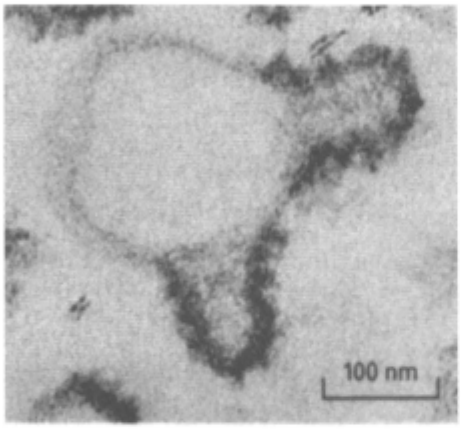
نوع وزیکول	مرحله‌ای از انتقال که وساطت می‌کنند	پروتئین‌های پوششی	GTPaseمرتبط
COPII	ER به سیس گلژی	کمپلکسهای Sec24 / Sec23 و Sec31 / Sec13 و Sec16	Sarl
COPI	سیس گلژی به ER (سیسترنای دورتر به سیسترنای نزدیک‌تر گلژی)	کتامرهای حاوی هفت زیرواحد متفاوت COP	ARF
کلاترین و پروتئین‌های آداپتور*	ترانس گلژی به اندوزوم	کلاترین +کمپلکس‌های AP1	ARF
	ترانس گلژی به اندوزوم	کلاترین + GGA	ARF
	غشای پلاسمایی به اندوزوم	کلاترین +کمپلکس‌های AP2	ARF
	گژی به لیزوزوم، ملانوزوم یا وزیکول‌های پلاکتی	کمپلکس‌های AP3	ARF

* هر نوع از کمپلکس AP حاوی چهار زیرواحد متفاوت است. مشخص نیست که آیا وزیکول‌های پوشش AP_3 حاوی کلاترین هستند یا نه.

وزیکول تفاوت قابل ملاحظه‌ای با انواع دیگر وزیکول‌ها دارد، اما پوشش‌های هر سه نوع از وزیکول‌ها دارای یک پروتئین کوچک متصل به GTPای است که به عنوان یک زیرواحد تنظیمی برای کنترل سازمان‌یابی پوشش‌ها عمل می‌کند (شکل ۱۴ـ۶a را ملاحظه کنید). برای هر دو نوع وزیکول COPI و کلاترین، این پروتئین متصل به GTP تحت عنوان پروتئین ARF نام‌گذاری شده است. یک نوع متفاوت اما مرتبط با پروتئین‌های متصل به GTP که تحت عنوان پروتئین Sarl شناخته می‌شود، در ساختمان وزیکول‌های پوششی COPIIها وجود دارد. هم ARF و هم Sarl پروتئین‌های منومری هستند که ساختمان کلی آنها مشابه Ras است که یک پروتئین کلیدی درون سلولی در فرایند هدایت پیام است (شکل ۱۶ـ۲۴ را ملاحظه کنید). پروتئین‌های ARF و Sarl متعلق به **ابرخانواده GTPase**[1] هستند که در واقع پروتئین‌های تنظیمی بوده و بین فرم غیر فعال متصل به GDP و فرم فعال متصل به GTP می‌چرخند (شکل ۳ـ۳۲ را ملاحظه کنید).

به نظر می‌رسد همان‌طور که نحوه سازمان‌یابی وزیکول‌های COPII در شکل ۱۴ـ۸ نشان داده شده است، چرخه اتصال به GTP و هیدرولیز آن در ARF و Sarl نیز شروع سازمان‌یابی پوشش وزیکولی را کنترل می‌کند.

در ابتدا، یک پروتئین غشایی ER که تحت عنوان Sec12 شناخته می‌شود، آزادسازی GDP را از Sar1. GDP و اتصال GTP به آن را کاتالیز می‌کند. ظاهراً فاکتور تعویض‌کننده نوکلئوتید گوانین Sec12، عمل دریافت و تکمیل پیام‌های چندگانه‌ای را به عهده دارد که هنوز ماهیت نامعلوم دارند، اما احتمال می‌رود که نیازمند حضور پروتئین‌های کارگو در منطقه‌ای از غشا ER است که برای انتقال یافتن آماده شده است. اتصال GTP با ایجاد تغییرات



▲ **شکل تجربی ۱۴ـ۷ جوانه‌های وزیکولی را می‌توان در طی واکنش‌های جوانه‌زنی در in vitro رؤیت نمود.** زمانی که محتویات تخلیص شده حاصل از پوشش COPIIها را با وزیکول‌های ER یا وزیکول‌های فسفولیپیدی مصنوعی (لیپوزوم‌ها) انکوبه می‌کنیم، پلیمریزاسیون پروتئین‌های پوششی بر روی سطح وزیکول افزایش انحنای جوانه را به‌طور ناگهانی تحریک می‌کند. در این میکروگراف الکترونی حاصل از واکنش جوانه‌زنی در محیط *In Vitro*، نقاط مجزای پوششی غشا به صورت یک لایه پروتئینی تیره دیده می‌شود که در سطح جوانه‌های وزیکولی قرار گرفته است.

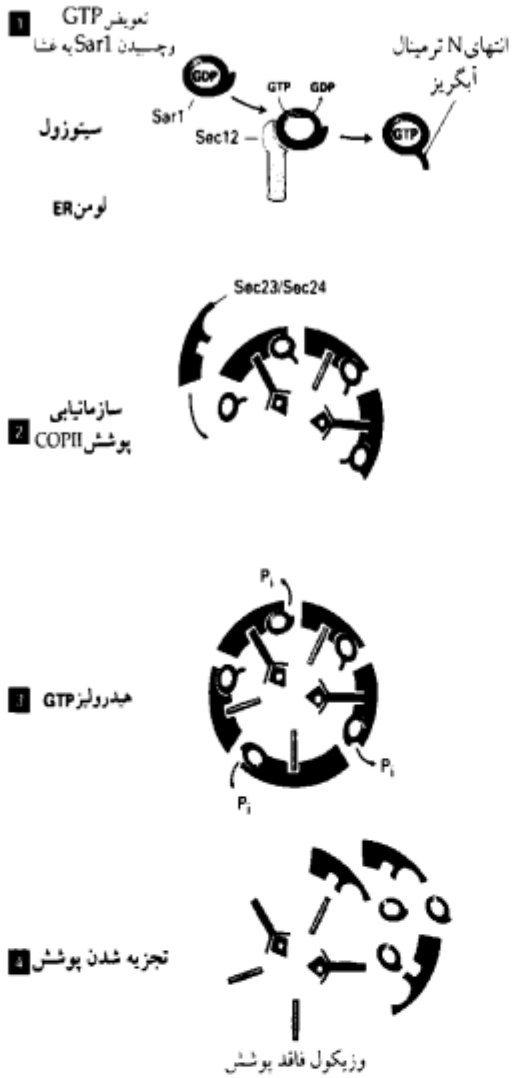
ساختمان فضایی در Sar1 و در معرض قرار دادن انتهای N ترمینال آبگریز آن سبب می‌شود که این ناحیه به درون دو لایه فسفولیپیدی کشیده و Sar1.GTP درون غشای ER جفت شود. Sar1.GTP متصل به‌غشای سبب تحریک پلیمریزاسیون زیرواحدهای کمپلکس سیتوزولی COPII می‌گردد و نهایتاً منجر به تشکیل جوانه وزیکول می‌شود. زمانی که یکی از وزیکول‌های COPII از غشاء دهنده آزاد می‌شود، فعالیت GTPaseای Sar1 سبب هیدرولیز Sar1.GTP موجود در غشای وزیکول Sar1.GTP می‌شود که این عمل را به

1- Super family

کمک یکی از زیرواحدهای پوشش وزیکولی انجام می‌دهد. Sar1 سبب جفت شدن چرخه اتصال به GTP و هیدرولیز آن با چرخه تشکیل و جدا شدن پوشش COPII می‌گردد.

پروتئین ARF نیز توسط چرخه مشابهی از تعویض نوکلئوتیدی و هیدرولیز آن با فرایند سازمان‌یابی پوشش‌هایی که یا از COPI و یا از کلاترین و سایر پروتئین‌های پوششی (کمپلکس‌های AP) تشکیل شده‌اند، جفت می‌گردد. یک اتصال کووالان پروتئینی که تحت عنوان لنگر مریستات خوانده می‌شود، در انتهای N پروتئین ARE سبب اتصال مجموعهٔ ARF.GDP به غشای گلژی می‌شود. زمانی که GTP توسط یک فاکتور تعویض نوکلئوتید متصل به غشا گلژی با GDP متصل به پروتئین جایگزین می‌شود، سبب ایجاد تغییرات ساختمان فضایی در ARF می‌شود که در نتیجه آن ریشه‌های آبگریز در قطعه N- ترمینال، به داخل دو لایه غشایی فرو می‌رود. سپس به واسطه اتصال محکم ARF.GTP با غشای، می‌تواند به عنوان یک پایه استوار برای قرارگیری سایر اجزاء پوشش عمل کند.

با توجه به وجود شباهت‌های ساختاری میان Sar1 و ARF در پروتئین‌های کوچک تنظیمی GTPase آنها، محققان موفق به ترسیم نقشه ژنتیکی مربوط به ژن‌هایی شدند که کپی‌های جهش یافته آنها، دو پروتئین را بیان می‌کنند که در صورت انتقال آنها به درون سلول‌های کشت داده شده می‌توانند اثرات قابل پیش‌بینی بر نقل و انتقالات وزیکولی اعمال کند. به عنوان مثال، در سلول‌های بیان‌کننده کپی‌های جهش یافته Sar1 و یا ARF که قادر به هیدرولیز GTP نبودند، پوشش‌های وزیکولی تشکیل شده و جوانه‌های وزیکول از غشای جدا می‌شوند. با این وجود، به دلیل این‌که پروتئین‌های جهش یافته نمی‌توانستند واکنش‌های تجزیه نمودن پوشش را راه‌اندازی کنند، تمام زیرواحدهای پوششی در دسترس، نهایتاً به‌طور مداوم به صورت وزیکول‌های پوشش‌داری که قادر به اتصال با غشاهای هدف نبودند، آرایش می‌یافتند. افزودن آنالوگهای غیر قابل هیدرولیز GTP نیز اثری مشابه با مسدود کردن فرایند تجزیه پوشش بر روی واکنش‌های جوانه‌زنی وزیکول در محیط *In Vitro* دارد. وزیکول‌های حاصل از چنین واکنش‌هایی، دارای پوشش‌هایی هستند که هرگز تجزیه نمی‌شوند. بنابراین، این امکان را فراهم می‌کنند که بتوان ساختار و محتویاتشان را به آسانی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. وزیکول‌های COPI جدا شده‌ای که در شکل ۹-۱۴ دیده می‌شوند نیز توسط چنین واکنش‌های جوانه‌زنی تولید شده‌اند.



▲ **شکل ۸-۱۴ مدلی که نقش Sar1 را در فرایند تشکیل و تجزیه پوشش‌های COPII نشان می‌دهد.** مرحله ❶: بر همکنش Sar1 محلول متصل به GDP با فاکتور تعویض‌کننده Sec12 که یک پروتئین سراسری غشایی است و تبادل GTP را با GDP در سطح Sar1 کاتالیز می‌کند. وقتی که Sar1 به فرم متصل به GTP است، N- ترمینال آبگریز آن به سمت خارجی سطح پروتئین گسترده می‌شود و Sar1 در داخل غشای ER لنگر می‌اندازد. مرحله ❷: Sar1 متصل به غشای به عنوان یک جایگاه اتصال برای کمپلکس پروتئین پوششی Sec23 / Sec24 عمل می‌کند. پروتئین‌های کارگوی غشایی توسط اتصال توالی‌های کوتاه اختصاصی خود (پیام‌های دسته‌بندی) موجود در نواحی سیتوزولی‌شان با جایگاه‌های موجود بر روی کمپلکس Sec23 / Sec24، خود را برای جوانه زدن وزیکول آماده می‌کنند. تعدادی از پروتئین‌های کارگوی غشای نیز می‌توانند در نقش رسپتورهایی عمل کنند که به پروتئین‌های محلول در لومن متصل می‌گردند. پوشش توسط سازمان‌یابی نوع ثانویه‌ای از کمپلکس پوششی تشکیل شده از Sec13 و Sec31 تکمیل می‌گردد (نشان داده نشده است). مرحله ❸: بعد از آن که پوشش وزیکولی کامل شد، زیرواحد پوششی Ses23 هیدرولیز GTP توسط Sar1 را شروع می‌کند. مرحله ❹: آزاد شدن Sar.GTP از غشای وزیکول سبب تجزیه پوشش می‌شود.

هدف‌گیری توالیهای پروتئین‌های کارگو، سبب برقراری ارتباطات مولکولی اختصاصی با پروتئین‌های پوششی می‌شوند

با توجه به این‌که وزیکول‌های انتقالی، عمل جابه‌جایی در پروتئین‌های اختصاصی را میان قسمت‌های مجزا از هم به عهده دارند، پس جوانه‌های وزیکولی باید این قابلیت را دارا باشند که بتوانند پتانسیل‌های مختلف غشایی را از هم تشخیص داده و پروتئین‌های کارگوی محلول را نیز شناسایی نمایند تا تنها آن دسته از پروتئین‌های کارگویی را بپذیرند که باید به بخش بعدی حمل گردد و در ضمن مانع ورود آنهایی شوند که باید در همان قسمت دهنده باقی بمانند.

پوشش وزیکولی علاوه بر ایجاد شکل منحنی در غشای دهنده، نقش انتخاب پروتئین‌های اختصاصی همانند کارگو را نیز به عهده دارد. مکانیسم اولیه‌ای که توسط آن وزیکول‌های پوشش‌دار مولکول‌های کارگو را انتخاب می‌کنند، به واسطه اتصال مستقیم به توالی‌های اختصاصی یا **پیام‌های دسته‌بندی**[1] موجود در قسمت سیتوزولی پروتئین‌های غشایی کارگو می‌باشد (شکل ۱۴-۶a را ملاحظه کنید). بنابراین پوشش پلیمریزه شده در حکم یک ماتریکس تمایلی برای **کلاستر**[2] انتخاب شده پروتئین‌های کارگوی غشای عمل می‌کند که آنها را به سمت تشکیل جوانه‌های وزیکولی سوق می‌دهد. زمانی که پروتئین‌های محلول موجود در داخل لومنِ اندامک‌های والد در تماس مستقیم با پوشش نباشند، به نوع متفاوتی از پیام دسته‌بندی نیاز است. پروتئین‌های لومنی محلول، غالباً حاوی قسمتی هستند که به نظر می‌رسد نقش پیام‌های دسته‌بندی لومنی را دارد که به دُمین‌های لومنی پروتئین‌های کارگوی غشایی اختصاصی که به عنوان گیرندگان پروتئین‌های کارگوی لومنی عمل می‌کنند، متصل می‌شوند. ویژگی‌های چندین پیام دسته‌بندی شناخته شده موجود در غشای و پروتئین‌های محلول در جدول ۱۴-۲ به‌طور خلاصه آورده شده است. در بخش‌های بعدی جزئیات بیشتری از این پیام‌ها را شرح خواهیم داد.

Rab GTPaseها اتصال وزیکول‌ها به غشای هدف را کنترل می‌کنند

دومین دسته از پروتئین‌های متصل به GTP که تحت عنوان پروتئین‌های Rab شناخته می‌شوند، در فرایند هدف‌گیری وزیکول‌ها به سمت غشای هدف مناسب کاربرد دارند. همانند Sar1 و ARF، پروتئین‌های Rab نیز تبدیل Rab.GDP سیتوزولی به Rab. GTP که توسط فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانین اختصاص کاتالیز می‌شود، سبب القاء یک تغییر ساختمان فضایی در Rab شده، که آن را قادر می‌سازد تا با یک پروتئین سطحی موجود بر روی یک وزیکول انتقالی ویژه برهمکنش نموده و لنگر ایزوپرنوئیدی خودش را به داخل غشای وزیکولی وارد نماید. زمانی که یک Rab.GTP به سطح وزیکول فرو می‌رود، به نظر می‌رسد که با یکی از اعضای مربوط به پروتئین‌های بلند که تحت عنوان افکتورهای Rab شناخته شده‌اند، برهمکنش کرده و به این وسیله به غشای هدف می‌چسبد. اتصال Rab.GTP به یک افکتور Rab سبب اتصال وزیکول به غشای هدف مناسبش می‌شود (شکل ۱۴-۱۰، مرحله ❶). پس از آن‌که ادغام وزیکولی صورت گرفت، GTP متصل به پروتئین Rab به GDP هیدرولیز می‌شود و همین امر باعث آزاد شدن Rab.GDP می‌گردد، سپس چرخه بعدی شروع می‌گردد که دوباره همان مراحل یعنی تعویض GDP-GTP، اتصال و هیدرولیز تکرار خواهد شد.

شواهد متعددی وجود دارند که نقش اختصاصی پروتئین‌های Rab را در طی پدیده ادغام وزیکولی قوت می‌بخشند. به عنوان مثال، ژن SEC4 مخمر، یک پروتئین Rab را کد می‌کند و در سلول‌های مخمری که پروتئین‌های جهش یافته Sec4 را بیان می‌کنند وزیکول‌های ترشحی که قادر به ادغام شدن با غشای پلاسمایی نیستند، در سلول تجمع می‌یابند (جهش یافته‌های کلاس E در شکل ۱۴-۴). در سلول‌های پستانداران پروتئین Rab5 در وزیکول‌های اندوسیتوزی قرار دارد که این وزیکول‌ها را تحت عنوان اندوزوم اولیه نیز می‌شناسند. وزیکول‌های غیر پوشش‌دار تنها زمانی تشکیل می‌شوند که وزیکول‌های با پوشش کلاترینی در طی پدیده آندوسیتوز از غشای پلاسمایی جوانه بزنند (شکل ۱۴-۱، مرحله ❾). ادغام با هم اندوزوم‌های اولیه در سیستم‌های فاقد سلول نیازمند حضور Rab5 است به‌طوری که افزودن Rab5 و GTP به عصاره‌های فاقد سلول، سرعت ادغام این وزیکول‌ها را با هم افزایش می‌دهد. یک پروتئین مارپیچی طویل که EEA1 (آنتی‌ژن 1 اندوزوم اولیه) نام دارد و روی غشای اندوزوم اولیه قرار دارد، به عنوان افکتور Rab5 عمل می‌کند. در این مورد، Rab5.GTP موجود بر روی یک وزیکول اندوسیتوزی به‌طور اختصاصی به EEA1 موجود در غشای وزیکول اندوسیتوزی دیگر متصل می‌شود و الحاق دو وزیکول به هم طبق مراحل خودش دنبال می‌شود.

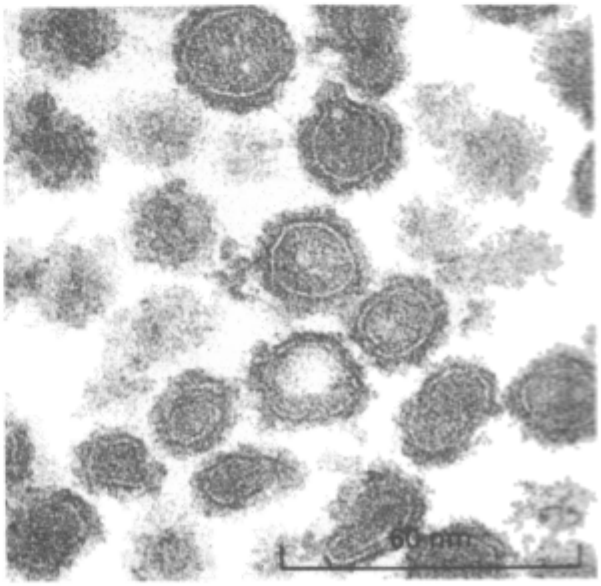
به نظر می‌رسد نوع متفاوتی از افکتور Rab در هر نوع وزیکول و

1- Sorting signals 2- Cluster

جدول ۲-۱۴. پیام‌های دسته‌بندی شناخته شده‌ای که پروتئین‌ها را به سمت تشکیل وزیکول‌های انتقالی خاصی هدایت می‌کنند

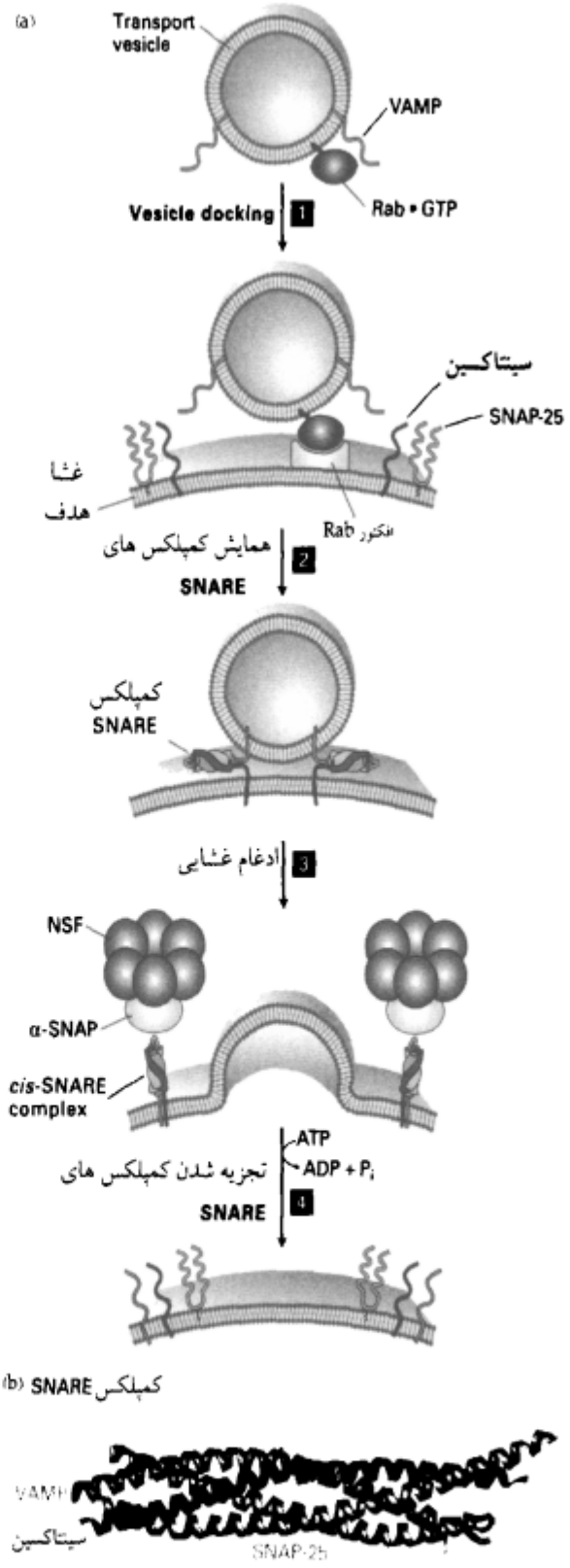
نوع پیام‌ها*	پروتئین‌های حاوی پیام	گیرنده پیام	وزیکول‌هایی که با پروتئین‌آورنده پیام همکاری می‌کنند
پیام‌های دسته‌بندی لومنی			
Lys-Asp-Glu-Leu(KDEL)	پروتئین‌های محلول مقیم در ER	گیرنده KDEL در غشای سیس گلژی	COPI
(M6P) مانوز ۶ فسفات	آنزیم‌های محلول لیزوزومی پس از پردازش در سیس گلژی آنزیم‌های لیزوزومی ترشح شده	گیرنده M6P در غشای گلژی گیرنده M6P در غشای پلاسمایی	کلاترین / COP1 کلاترین / COP2
پیام‌های دسته‌بندی سیتوپلاسمی			
Lys-Lys-X-X- (KKXX)	پروتئین‌های غشایی مقیم در ER	زیرواحدهای α و β COPI	COPI
دی‌اسیدها (مثل Asp-X-Glu)	پروتئین‌های غشایی کارگو موجود در ER	زیرواحد COPII Sec24	COPII
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	گیرنده LDL در غشای پلاسمایی	کمپلکس AP2	کلاترین / AP2
Tyr-X-X-ϕ(YXXϕ)	پروتئین‌های غشایی موجود در ترانس گلژی پروتئین‌های غشای پلاسمایی	AP1 (زیرواحد $\mu 1$) AP2 (زیرواحد $\mu 2$)	کلاترین / AP2
Leu-Leu(LL)	پروتئین‌های غشایی پلاسمایی	کمپلکس‌های AP2	کلاترین / AP2

* X = هر آمینو اسیدی می‌تواند باشد؛ ϕ = اسیدهای آمینه آبگریز. علامت اختصاری و تک‌حرفی اسیدهای آمینه در داخل پرانتز آورده شده است.



◀ **شکل تجربی ۹-۱۴ وزیکول‌های پوشش‌دار در طی واکنش‌های جوانه‌زنی در *In Vitro* در حضور یک آنالوگ غیر قابل هیدرولیز GTP تجمع می‌یابند.** زمانی که غشاهای گلژی جدا شده با عصاره سیتوزولی حاوی پروتئین‌های پوششی COPI انکوبه شوند، وزیکول‌ها تشکیل و به خارج از غشاها جوانه می‌زنند. استفاده از یک آنالوگ غیر قابل هیدرولیز GTP در واکنش جوانه زدن، مانع از تجزیه پوشش پس از آزاد شدن وزیکول می‌شود. این میکروگراف نشان‌دهنده وزیکول‌های COPI تولید شده در چنین واکنشی است که توسط سانتریفوژ از غشاها جداسازی شده‌اند. وزیکول‌های پوشش‌داری که توسط چنین روشی ایجاد شده‌اند را می‌توان به منظور تعیین محتویات و ویژگی‌هایشان تجزیه و بررسی نمود.

در هر مرحله از مسیر ترشحی عمل می‌کند. سئوالاتی از این قبیل که پروتئین‌های Rab چگونه به سمت غشای صحیح مربوطه هدف‌گیری می‌کنند و یا کمپلکس‌های اختصاصی چگونه در میان پروتئین‌های Rab متفاوت و پروتئین‌های افکتور مربوط به آنها شکل می‌گیرند در این مقوله هنوز هم پاسخی نیافته‌اند.



◀ شکل ۱۰-۱۴ مدلی از جدا شدن وزیکول انتقالی و اتصال آن به غشای هدف. (a) پروتئین‌های نشان داده شده در این مثال که در فرایند ادغام وزیکول‌های انتقالی به غشای پلاسمایی شرکت می‌کنند، شبیه پروتئین‌هایی هستند که تمامی مراحل ادغام وزیکولی را وساطت می‌کنند. مرحله ❶: یک پروتئین Rab که توسط لنگر لیپیدی به داخل وزیکول ترشحی فرو رفته است، به کمپلکس پروتئینی افکتور موجود بر روی غشای پلاسمایی متصل می‌شود. به این ترتیب وزیکول انتقالی روی غشای پلاسمایی هدف می‌نشیند. مرحله ❷: پروتئین v-SNARE (در این مثال VAMP) با دُمین‌های سیتوزولی t-SNARE‌های خویشاوندی خود (در این مثال، سیتاکسین و SNAP-25) بر همکنش می‌کند. کمپلکس‌های فوق‌العاده پایدار SNARE که به صورت مارپیچ مارپیچی شده است، پس از شکل‌گیری سبب نگه داشتن وزیکول در مجاورت غشای هدف می‌شود. مرحله ❸: الحاق آنی دو غشای به دنبال تشکیل کمپلکس SANRE انجام می‌شود، اما دقیقاً مشخص نشده است که این فرایند چگونه اتفاق می‌افتد. مرحله ❹: به دنبال الحاق غشاها، NSF متصل به پروتئین α-SNAP به کمپلکس‌های SNARE متصل می‌شود. NSF با کاتالیز نمودن هیدرولیز ATP سبب تحریک تجزیه شدن کمپلکس‌های SNARE می‌شود و پروتئین‌های SNARE در حال آزاد شدن برای وزیکول دیگری که قرار است با غشای ادغام شود، دوباره به‌کار گرفته می‌شود. در این زمان، Rab.GTP به Rab.GDP هیدرولیز شده و از افکتور Rab جدا می‌گردد (نشان داده نشده است). (b) کمپلکس SNARE تعداد بی‌شماری از برهمکنش‌های غیر کوالان در میان چهار مارپیچ α طویل (دو تا از SNAP-25 و یک سیتاکسین و یک VAMP) ساختمان مارپیچ مارپیچی شده را پایدار و محکم می‌کنند.

دسته‌های جفت شده پروتئین‌های SNARE، ادغام وزیکول‌ها با غشاهای هدف مربوطه را وساطت می‌کنند

همان‌طور که در مباحث قبل ذکر کردیم، مدت کوتاهی پس از جدا شدن جوانه‌های وزیکولی از غشادهنده، پوشش وزیکولی تجزیه می‌شود و به پروتئین غشایی مختص وزیکول، یک v-SNARE، تبدیل می‌شود (شکل ۱۴-۶b). هم‌چنین تمامی انواع غشاهای هدف در یک سلول، حاوی پروتئین‌های غشایی t-SNARE است. پس از اتصال یک وزیکول به غشای هدفش (مقصد) با وساطت Rab،

برهمکنش با هم SNAREهای خویشاوند، دو غشای را تا حدی به هم نزدیک می‌کند که بتوانند با هم ادغام شوند.

یکی از مثال‌هاییکه به خوبی مطالعه شده است، ادغام وساطت شده با SNARE است که در طی پدیده اگزوسیتوز پروتئین‌های ترشحی انجام می‌شود (شکل ۱۰-۱۴، مراحل ❷و ❸). در این حالت v-SNAREکه با نام VAMP (پروتئین غشایی متصل‌شونده به وزیکول) شناخته شده است، در حین جوانه زنی وزیکول‌های ترشحی از شبکه ترانس‌گلژی به آن می‌پیوندد. t-SNARE سینتاکسین هستند که پروتئین سراسری غشایی بوده و درون غشای پلاسمایی وجود دارد و به واسطه یک لنگر لیپیدی آبگریز در وسط پروتئین به غشای می‌چسبند. ناحیه سیتوزولی در هر کدام از سه پروتئین SNARE، حاوی یک توالی هفت‌تایی تکرارشونده است که در آن چهار عدد مارپیچ α، یک VAMP، یک سینتاکسین و دو تا از SNARE-25، حول هم می‌پیچند و **دسته**[1] مارپیچ چهارتایی تشکیل می‌دهند. پایداری غیر معمول کمپلکس SNARE دسته شده توسط نظم میان بخش‌های آبگریز و ریشه‌های آمینو باردار موجود در تکرارهای هفت‌گانه تأمین می‌شود. اسیدهای آمینه آبگریز در قسمت‌های داخلی هسته این دستجات مدفون می‌شود و اسیدهای آمینه با بار مخالف طوری در کنار هم صف می‌بندند که برهمکنش‌های الکتروستاتیک مناسب و مطلوب در میان مارپیچ‌ها ایجاد شود. در حین تشکیل دستجات مارپیچ چهارگانه، وزیکول‌ها و غشاهای هدف توسط دُمین‌های غشاگذر VAMP و سینتاکسین به سمت هم کشیده شده و نزدیک هم قرار می‌گیرند.

آزمایشات صورت گرفته در محیط *In Vitro* نشان می‌دهند زمانی که **لیپوزوم‌های** حاوی VAMP تخلیص شده با لیپوزوم‌های حاوی سینتاکسین و SNARE-25 با هم انکوبه شوند، این دو غشای از دو کلاس متفاوت به هم متصل شده و در هم ادغام می‌شوند، ولو این عمل به آهستگی صورت گیرد. این یافته‌ها در حکم شواهد بسیار قوی هستند که بیانگر این مطلبند که نزدیکی تنگاتنگ غشاها به هم در نتیجه تشکیل کمپلکس‌های SNARE است. ادغام وزیکول و غشای هدف در سلول‌ها نسبت به آنچه که در آزمایشات با لیپوزوم انجام می‌شود، به‌طور سریع‌تر و مؤثرتری اتفاق می‌افتد که علت آن این است که در آزمایشگاه، پدیده ادغام تنها توسط پروتئین‌های SNARE کاتالیز می‌شود. یک توضیح مناسب برای چنین تفاوتی این است که در سلول، سایر پروتئین‌ها از قبیل پروتئین‌های Rab و افکتورهای آنها نیز در فرایند هدف‌گیری وزیکول به سمت غشای مناسب شرکت می‌کنند.

سلول‌های مخمر، همانند تمامی سلول‌های یوکاریوتی بیش از ۲۰ پروتئین متفاوت مربوط به t-SNARE و v-SNARE را بیان می‌کنند. بررسی مخمرهای جهش یافته‌ای که در یکی از ژن‌های SNARE دچار آسیب شده‌اند، مراحلی از ادغام غشایی راکه در آن یک پروتئین SNARE خاص شرکت می‌کند مشخص نموده است. در همه مراحل ادغام که تا کنون آزمایش شده‌اند، SNAREها کمپلکس‌های دسته‌بندی شده حاوی مارپیچ چهارگانه‌ای را تشکیل می‌دهند که مشابه کمپلکس‌های حاصل از VAMP / سینتاکسین / SNARE-25 ای است که ادغام وزیکول‌های ترشحی به غشای پلاسمایی را وساطت می‌کنند. بنابراین، در سایر فرایندهایی که در طی آنها پدیده ادغام روی می‌دهد (مثل ادغام وزیکول‌های COPII با شبکه سیس - گلژی)، هر پروتئین SNARE شرکت‌کننده، فقط یک مارپیچ α را برای تشکیل دستجات به کار می‌برد (و نه مانند SNARE-25 که دو مارپیچ α را به کار می‌گیرد). در این موارد، کمپلکس‌های SNARE یک مولکول v-SNARE و سه مولکول t-SNARE را دارا هستند.

با به‌کارگیری سنجش‌های ادغام وزیکول در محیط کشت *In Vitro*، محققان به آزمایش کردن توانایی ترکیبات مختلف حاصل از پروتئین‌های v-SNARE و t-SNARE در وساطت ادغام غشاهای دهنده و هدف پرداختند. از میان تعداد بی‌شماری از این ترکیبات مختلف آزمایش شده، تنها تعداد اندکی توانستند ادغام غشاها را به نحو مطلوبی وساطت کنند. تعداد قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات عملکردی t-SNARE و v-SNARE که در این آزمایشات انجام شده در محیط *In Vitro* به‌کار رفته‌اند، بیانگر این است که در واقعیت نیز برهمکنش‌های میان پروتئین‌های SNARE، رویدادهای شناخته شده در طی فرایند ادغام غشایی را در سلول مخمر وساطت می‌کند. بنابراین اختصاصی بودن برهمکنش میان پروتئین‌های SNARE سبب اختصاصی شدن فرایند ادغام یک نوع وزیکول خاص با غشای هدفش می‌گردد.

تجزیه کمپلکس‌های SNARE پس از ادغام غشاها توسط هیدرولیز ATP تحریک می‌گردد

پس از آن‌که یک وزیکول با غشای هدفش ادغام شد، کمپلکس‌های SNARE باید تجزیه شوند تا مجدداً پروتئین‌های SNARE منفرد برای انجام فرایندهای ادغامی بعدی در دسترس

1- Bundle

قرار گیرند. به دلیل پایداری فوق‌العاده کمپلکس‌های SNARE که اجزاء آن توسط برهمکنش‌های بین مولکولی غیر کوالان بی‌شماری در کنار هم قرار گرفته‌اند، تجزیه‌شان وابسته به وجود پروتئین‌های دیگر و صرف انرژی است.

در ابتدا به بررسی نحوه تجزیه شدن کمپلکس‌های SNARE می‌پردازیم که نیاز به کمک پروتئین‌های دیگری دارند که در ضمن واکنش‌های انتقالی در *In Vitro* از پروتئین‌های سیتوزولی خاصی تأمین می‌شوند. مشاهده تجمع وزیکول‌ها در این واکنش‌ها نشان می‌دهد که وزیکول‌ها تشکیل می‌شوند، اما قادر نیستند که با غشای هدف ادغام گردند. نهایتاً پی بردند که وجود دو پروتئین که با NSF و α-SNAP نشان داده می‌شوند، برای انجام فرایند ادغام وزیکولی در طی واکنش‌های انتقالی *In Vitro* مورد نیازند. عمل NSF را می‌توان به طور انتخابی توسط N- اتیل مالئیمید (NEM) در بدن موجود زنده مهار کرد. NEM یک ماده شیمیایی است که با یک گروه SH ضروری در NSF (به این دلیل به آن فاکتور حساسیت به NEM می‌گویند)، واکنش می‌دهد.

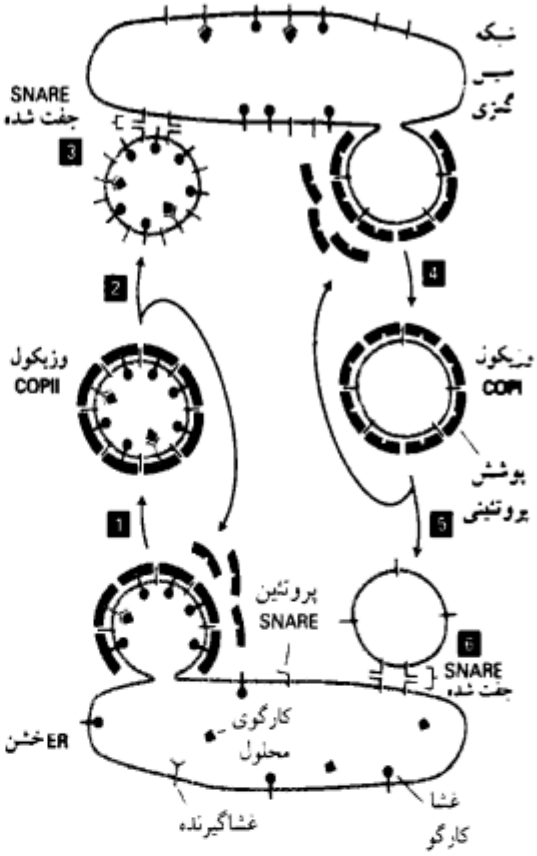
در میان مخمرهای جهش یافته sec کلاس C گونه‌هایی وجود دارند که فاقد Sec18 یا Sec17 عملکردی هستند که به ترتیب همتای پروتئین‌های NSF و α-SNAP در پستانداران هستند. زمانیکه جهش یافته‌های این کلاس را در درجه حرارتهای غیرمجاز قرار می‌دهیم، وزیکول‌های انتقالی ER به گلژی در آنها تجمع می‌یابد؛ حال اگر سلولها را به درجه حرارتهای پایین‌تر یا درجه حرارتهای مجاز منتقل کنیم، وزیکول‌های تجمع یافته قادر به ادغام شدن با سیس گلژی می‌شوند.

مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی پی‌درپی، نشان داد که در طی بررسیهای انتقالی که تاکنون در محیط‌های *In Vitro* صورت گرفته است، NSF و α-SNAP به عنوان عوامل گمراه‌کننده عمل نموده‌اند. با استفاده از سنجش‌های جدیدتر، محققان نشان دادند که در حقیقت پروتئین‌های NSF و α-SNAP برای ادغام غشاها ضروری نیستند، اما تا حدی برای بازسازی پروتئین‌های SNARE آزاد مورد نیازند. NSF هگزامری با زیرواحدهای یکسان است که به کمک α-SNAP (پروتئین اتصالی NSF محلول) به کمپلکس SNARE متصل می‌شود. سپس NSF متصل شده سبب هیدرولیز ATP می‌شود که باعث آزاد شدن انرژی لازم برای تجزیه کمپلکس SNARE می‌شود (شکل ۱۰-۱۴، مرحله ❹). به این ترتیب، نقص مشاهده شده در فرایند ادغام غشایی در طی سنجش‌های اولیه صورت گرفته در *In Vitro* و در جهش یافته‌های مخمر، پس از کاهش Sec17 یا Sec18 به این دلیل بوده است که پروتئین‌های SNARE آزاد سریعاً در کمپلکس‌های SNARE تجزیه نشده انبار شده و بنابراین برای وساطت ادغام غشایی غیر قابل دسترس می‌شدند.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۴

مکانیسم‌های مولکولی انتقال وزیکولی

- سه نوع وزیکول انتقالی (COPI، COPII و کلاترین) توسط پروتئین‌هایی که پوشش آنها را تشکیل داده و انتقال آنها را میانجی می‌کنند تشخیص داده شده است.
- تمام وزیکول‌های پوششی توسط پلیمریزاسیون پروتئین‌های پوشش وزیکولی بر روی غشای دهنده برای تشکیل جوانه‌های وزیکولی که فوراً از غشا جداشده و وزیکول کامل آزاد می‌کنند شکل می‌گیرند. مدت کوتاهی بعد از آزادی وزیکول پوشش از بین رفته و پروتئین‌های مورد نیاز برای ادغام با غشای هدف آشکار می‌شوند (شکل ۶-۱۴ را ملاحظه کنید).
- پروتئین‌های کوچک متصل به GTP (Sar1 یا ARF) که جزئی از ابر خانوادهٔ GTPase هستند پلیمریزاسیون پروتئین‌های پوششی (اولین مرحله در جوانه‌زنی وزیکول) را کنترل می‌کنند (شکل ۸-۱۴ را ملاحظه کنید). بعد از آزادی وزیکول از غشای دهنده، هیدرولیز GTP متصل به ARF یا Sar1 باعث از هم پاشیدن پوششهای وزیکول می‌شوند.
- پیام‌های ویژه در غشای و پروتئین‌های لومینال ارگانهای دهنده با پروتئین‌های پوششی به هنگام جوانه‌زنی وزیکول برهمکنش می‌دهند تا پروتئین‌های کارگو به وزیکول وارد شوند (جدول ۲-۱۴ را ملاحظه کنید).
- نوع دومی از پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP پروتئین‌های Rab، برخورد وزیکول‌ها با غشای هدف صحیح را تنظیم می‌کنند. به نظر می‌رسد هر Rab به یک افکتور همراه Rab با غشای هدف متصل شود.
- هر v-SNARE در غشای وزیکول به طور ویژه به کمپلکسی از پروتئین‌های t-SNARE در غشای هدف متصل می‌شوند که شامل ادغام دو غشاست. بعد از اینکه ادغام کامل شد کمپلکس SNARE در یک واکنش وابسته به ATP واسطه‌شده توسط سایر پروتئین‌های سیتوزولی از هم پاشیده می‌شود (شکل ۱۰-۱۴ را ملاحظه کنید).



▲ **شکل ۱۱ـ۱۴(شکل رنگی) نقل و انتقالات پروتئین به واسطه وزیکول در میان ER و سیس گلژی.** مراحل ❶ـ ❸: انتقال رو به جلو (رفت[1]) توسط وزیکول‌های COPII وساطت می‌شود که به واسطه پیمریزاسیون کمپلکس‌های محلول پروتئینی موجود در پوشش COPII (سبز) بر روی غشای ER صورت می‌گیرد. v-SNAREها (نارنجی) و سایر پروتئین‌های کارگو (آبی) در غشای ER به واسطه بر همکنش با پروتئین‌های پوششی، به داخل وزیکول جای‌گیری می‌کنند. پروتئین‌های کارگوی محلول (قرمز) به وسیله اتصال به گیرنده‌های مناسب که در غشای وزیکول‌های در حال جوانه زدن وجود دارند، ایفای نقش می‌کنند. تجزیه شدن پوشش، سبب بازیابی کمپلکس‌های پوششی آزاد و در دسترس قرار گرفتن پروتئین‌های v-SNARE موجود بر سطح وزیکول می‌شود. پس از آن‌که وزیکول بدون پوشش به واسطه فرایندی که توسط Rab وساطت می‌شود، در غشای سیس ـ گلژی به‌طور محکم مستقر گردید، مجموعه حاصل از جفت شدن v-SNARE در دسترس و t-SNARE خویشاوندش در غشای گلژی، به وزیکول اجازه ادغام شدن را می‌دهد و بدین ترتیب وزیکول محتویات خود را به داخل بخش سیس گلژی آزاد می‌سازد (شکل ۱۰ـ۱۴). مراحل ❹ـ ❻: انتقال معکوس (برگشتی) توسط وزیکول‌های پوشیده شده از COPI (بنفش) وساطت می‌شود که سبب بازگشت غشای دولایه و یک سری پروتئین‌های خاص از قبیل v-SNAREها و پروتئین‌های دسته‌بندی نشده موجود در ER (نشان داده نشده است) از سیس گلژی به ER می‌شود. در اینجا با وجود این‌که v-SNARE و t-SNAREها پروتئین‌های مجزایی هستند، اما تمامی پروتئین‌های SNARE با نارنجی نشان داده شده‌اند.

۳ـ۱۴ مراحل اولیه مسیر ترشحی

در این بخش نگاه دقیق‌تری به مراحل نقل و انتقال وزیکولی میان ER و گلژی در مسیر ترشحی و برخی شواهد تقویت‌کننده مکانیسم‌های کلی ذکر شده در بخش قبلی خواهیم داشت. یادآوری می‌کنیم که انتقال در جهت رفت از ER به گلژی، اولین مرحله در مسیر ترشحی می‌باشد که توسط وزیکول‌های COPII وساطت می‌شود. این وزیکول‌ها حاوی پروتئین‌های تازه سنتز شده‌ای هستند که برای گلژی، سطح سلول یا لیزوزوم‌ها هدف‌گیری شده‌اند و نیز سایر محتویات وزیکول از قبیل v-SNAREها که برای رساندن وزیکول‌ها به غشای سیس‌گلژی به ER می‌باشد که توسط وزیکول‌های COPIها وساطت می‌شود (شکل ۱۱ـ۱۴). چنین وزیکول‌های انتقالی برگشتی، سبب بازگشت پروتئین‌های v-SNARE و غشای مربوط به ER می‌شود تا مواد ضروری برای چرخه‌های بعدی جوانه زدن وزیکول از ER فراهم گردد. انتقال برگشتی با واسطه COPI نیز سبب بازگشت پروتئین‌های دسته‌بندی نشده ساکن در ER از سیس ـ گلژی به ER برای تصحیح دسته‌بندی‌های اشتباه می‌شود. پروتئین‌هایی که به‌طور صحیح به گلژی ارسال شده‌اند، به وسیله پدیده بلوغ سیسترنایی از میان قسمت‌های پشت سر هم گلژی به جلو پیشروی می‌کنند.

وزیکول‌های COPII انتقال از ER به گلژی را وساطت می‌کنند

وزیکول‌های COPII در ابتدا هنگامی شناسایی شدند که عصاره فاقد سلول حاصل از غشاهای ER خشن مخمر را با سیتوزول و آنالوگ غیر قابل هیدرولیز GTP انکوبه کردند. وزیکول‌های تشکیل شده از غشاهای ER دارای پوششی مجزا تا حدی مشابه وزیکول‌های COPI می‌باشد، اما محتویات پروتئینی متفاوتی دارند که این پروتئین‌ها را با COPIIها نشان می‌دهند.

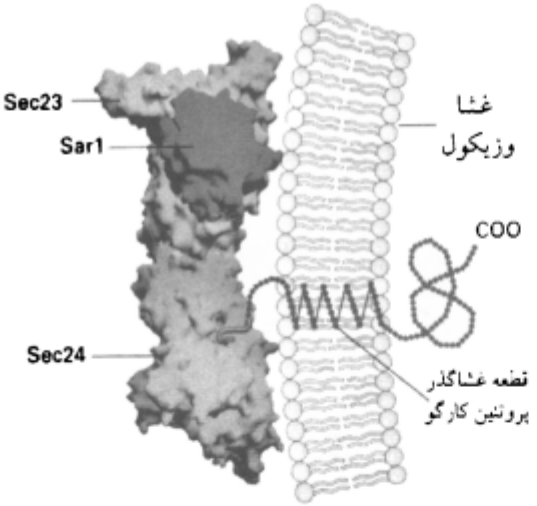
در سلول‌های مخمری که دارای جهش‌هایی در ژن‌های مربوط به پروتئین‌های COPIIها هستند و در کلاس B جهش یافته‌های sec قرار می‌گیرند، پروتئین‌ها در داخل ER خشن تجمع می‌یابند (شکل ۴ـ۱۴ را ملاحظه کنید). بررسی چنین جهش یافته‌هایی نشان می‌دهد که چندین پروتئین برای تشکیل وزیکول‌های COPIIها مورد نیازند.

همان‌طور که قبلاً هم شرح دادیم، تشکیل وزیکول‌های

1- Anterograde

COPIIها زمانی راه‌اندازی می‌شود که Sec12، یک فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانین در غشای ER، جایگزینی GDP متصل به Sarl سیتوزولی را با GTP کاتالیز می‌کند. این تعویض، اتصال Sarl به غشای ER را تحریک می‌کند که توسط اتصال یک کمپلکس از پروتئین‌های Sec23 و Sec14 انجام می‌شود (شکل ۸ـ۱۴ را ملاحظه کنید). در نتیجه کمپلکس چهارگانه حاصل از Sarl.GTP، Sec23 و Sec24 که در شکل ۱۲ـ۱۴ نشان داده شده، ایجاد می‌گردد. پس از تشکیل این کمپلکس بر روی غشای ER، کمپلکس ثانویه‌ای که شامل پروتئین‌های Sec13 و Sec31 است، به هم می‌چسبند تا ساختمان پوشش کامل شود. پروتئین‌های Sec13 و Sec31 تخلیص شده، قادرند به‌طور خودبه‌خودی به صورت یک شبکه قفس مانند آرایش یابند. به نظر می‌رسد که Sec13 و Sec31 با هم یک ساختار داربستی را برای وزیکول‌های COPII تشکیل می‌دهند. سرانجام یک پروتئین رشته‌ای بزرگ به نام Sec16 که به سطح سیتوزولی ER چسبیده است، با Sarl.GTP و کمپلکس‌های Sec13/31 و Sec13/24 برهمکنش کرده و سبب سازمان‌یابی سایر پروتئین‌های پوششی و افزایش سرعت پلیمریزاسیون پوشش می‌شود. همانند Sec13/31، کلاترین نیز دارای توانایی خودآرایی برای تشکیل ساختار شبه‌پوششی است که در بخش ۴ـ۱۴ راجع به آن صحبت خواهیم کرد.

پروتئین‌های سراسری خاصی که در غشای ER وجود دارند به‌طور اختصاصی به وزیکول‌های COPII می‌روند تا به گلژی انتقال یابند. بخش‌های سیتوزولی بسیاری از این پروتئین‌ها حاوی یک **پیام دسته‌بندی دی‌اسیدی**[1] است (ریشه‌های کلیدی در این توالی دارای Asp-X-Glu است که به صورت تک‌حرفی DXE نیز نمایش داده می‌شود) (جدول ۲ـ۱۴ را ملاحظه کنید). پیام دسته‌بندی به زیرواحد Sec24 در COPII پوششی متصل می‌شود و برای صدور انتخابی پروتئین‌های غشای کلاترین از ER ضروری هستند (شکل ۱۲ـ۱۴). مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام شده در این مسیرها، به‌طور آشکار نشان می‌دهند که افزودن پیام‌ها به هدایت پروتئین‌های کارگو به داخل وزیکول‌های COPII کمک می‌کند. سایر مطالعات صورت گرفته در این زمینه، در صدد تعیین این موضوع هستند که پروتئین‌های کارگوی محلول چگونه به‌طور انتخاب شده در داخل وزیکول‌های COPIIها بارگیری می‌شوند. اگرچه با استفاده از وزیکول‌های COPIIها تخلیص شده از سلول‌های مخمر به محتوای یک پروتئین غشایی که به **فاکتور α جفت‌یابی**[2] متصل می‌شود، پی برده‌اند اما گیرنده‌های مربوط به سایر پروتئین‌های کارگو



▲ **شکل ۱۲ـ۱۴(شکل رنگی) ساختمان سه بُعدی کمپلکس چهارگانه حاوی پروتئین‌های پوششی COPII، Sec23 Sec24 و Sarl-GTP.** در ابتدای شکل، پوشش COPII، کمپلکس‌های Sec23 (نارنجی) / Sec24 (سبز) توسط Sarl (قرمز) که در وضعیت متصل به GTP است، در غشای ER گرد هم می‌آیند. به منظور تشکیل کمپلکس چهارگانه پایدار و مقاوم در برابر حل شدن برای مطالعات ساختاری، از آنالوگ غیر قابل هیدرولیز GTP یعنی GppNHp استفاده شد. یک پروتئین کارگو موجود در غشای ER می‌تواند توسط بر همکنش با یک پیام تری‌پپتید دی‌اسیدی (بنفش) موجود در دُمین سیتوزولی کارگو با Sec24، سبب گردهمایی وزیکول‌های COPII شود. موقعیت مشابه در غشای وزیکول COPII قطعه غشای گذر پروتئین کارگو، نامعلوم است. قطعه N-ترمینال Sarl که آن را در داخل غشای نگه می‌دارد، نشان داده نشده است.

از جمله اینورتاز هنوز هم ناشناخته مانده است.

بیماری ارثی سیستیک فیبروز به علت بروز جهش‌هایی در یک پروتئین به نام CFTR ایجاد می‌شود. این پروتئین به صورت یک پروتئین سراسری غشایی در ER سنتز می‌شود و قبل از آن‌که به سمت غشاهای پلاسمایی سلول‌های اپیتلیوم، جایی که در آنجا به عنوان یک کانال کلرید عمل می‌کند، منتقل شود، باید به گلژی فرستاده شود. محققان اخیراً نشان داده‌اند که پروتئین CFTR دارای یک پیام دسته‌بندی دی‌اسیدی است که به زیرواحد Sec24 در COPIIهای پوششی متصل می‌شود که این پیام برای انتقال پروتئین CFTR به خارج ER ضروری می‌باشد. یکی از شایع‌ترین جهش‌هایی که در CFTR اتفاق می‌افتد، حذف

1- Diacidic sorting signal

2- α mating factor

یک فنیل‌آلانین در موقعیت ۵۰۸ توالی پروتئینی (تحت عنوان ΔF508 شناخته می‌شود) می‌باشد. این جهش مانع از انتقال طبیعی CFTR به غشای پلاسمایی و به واسطه مهار عمل بسته‌بندی و ارسال آن به داخل وزیکول‌های در حال جوانه زدن COPII از ER می‌شود. اگرچه جهش ΔF508 ارتباطی با پیام دسته‌بندی دی‌اسیدی ندارد، اما می‌تواند سبب تغییر ساختمان فضایی پروتئین سیتوزولی CFTR به نحوی شود که پیام دی‌اسیدی قادر به اتصال به Sec24 نباشد.

بر اساس آزمایشات شرح داده شده مرتبط با انتقال VSVG-GFP در سلول‌های کشت داده شده پستانداران و بررسی آنها با میکروسکوپ فلورسانت (شکل ۲-۱۴ را ملاحظه کنید)، دیدگاهی درمورد وجود حد واسفلورسنت مسیر انتقالی ER به گلژی ایجاد کردیم. در برخی سلول‌ها، وزیکول‌های کوچک فلورسنت حاوی VSVG-GFP که به نظر می‌رسد از ER تشکیل شده‌اند، کمتر از ۱μm حرکت کرده و سپس به‌طور مستقیم با سیس گلژی ادغام می‌گردند. در سایر سلول‌ها در جایی که ER چندین میکرومتر با کمپلکس گلژی فاصله دارد، چندین وزیکول مشتق از ER مدت زمان کوتاهی پس از تشکیل، با هم ادغام می‌گردند و بخش‌هایی را تشکیل می‌دهند که حد واسط‌های ER به گلژی هستند. سپس این ساختارهای بزرگ‌تر در امتداد میکروتوبول‌ها به سیس گلژی منتقل می‌شوند. تعداد بسیار زیادی از وزیکول‌های موجود در این مسیر در سلول‌های عصبی از این طریق از جسم سلولی منتقل می‌شوند یعنی از جایی که تشکیل شده‌اند به سمت انتهای اکسون می‌روند (فصل ۱۸). میکروتوبول‌ها در حکم «خطوط راه‌آهن» عمل می‌کنند که امکان حرکت وزیکول‌های انتقالی و ترکیبی بزرگ را در فواصل طولانی به سوی مقصدشان یعنی سیس‌گلژی فراهم می‌کنند. زمانی که بخش‌های حد واسط ER به گلژی تشکیل می‌شوند، برخی از جوانه‌های وزیکولی COPII از آن جدا شده و تعدادی از پروتئین‌ها را دوباره به ER برمی‌گردانند.

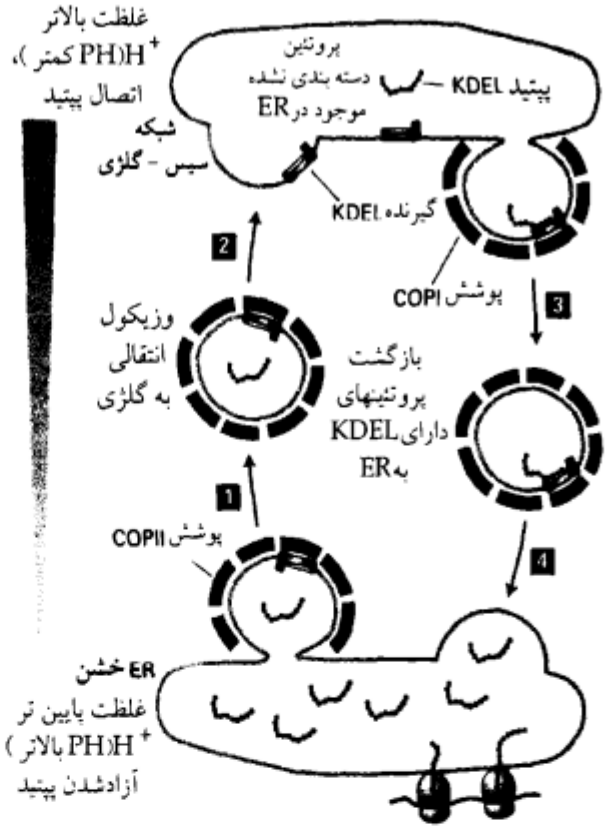
وزیکول‌های COPI انتقال برگشتی را در میان گلژی و از گلژی به ER وساطت می‌کند

وزیکول‌های COPI در ابتدا زمانی کشف شدند که بخش‌های جدا شده از گلژی با محلول حاوی سیتوزول و یک آنالوگ غیر قابل هیدرولیز GTP انکوبه شدند (شکل ۹-۱۴ را ملاحظه کنید). بررسی پی در پی این وزیکول‌ها نشان داد که پوششی از کمپلکس‌های سیتوزولی بزرگ، تشکیل شده که **کُتامر**[1] نام داشته و حاوی هفت زیرواحد پلی‌پپتیدی است. سلول‌های مخمری که در پروتئین‌های COPI دچار جهشی شده‌اند که آنها را به حرارت حساس نموده است اگر در درجه حرارت‌های غیر مجاز قرار گیرند، پروتئین‌ها در ER خشن تجمع پیدا می‌کنند. بنابراین آنها را در کلاس B جهش یافته‌های sec دسته‌بندی می‌کنند (شکل ۴-۱۴ را ملاحظه کنید). اگرچه در ابتدا با کشف این جهش یافته‌ها این پیشنهاد مطرح شد که وزیکول‌های COPI انتقال از ER به گلژی را وساطت می‌کنند، اما آزمایشات بعدی نشان داد که عمل اصلی آنها، انتقال برگشتی است که هم در میان سیسترنای گلژی و هم از سیس‌گلژی به ER خشن صورت می‌گیرد (شکل ۱۱-۱۴، سمت راست را ملاحظه کنید). به این دلیل که جهش یافته‌های COPI قادر به برگرداندن پروتئین‌های مهم غشایی به ER خشن نیستند، بنابراین در آنها ER به تدریج از پروتئین‌های ER از جمله v-SNARE‌ها که برای تشکیل وزیکول COPII لازمند، تهی می‌گردد. در نتیجه، تشکیل وزیکول از ER خشن دچار وقفه می‌گردد؛ سنتز پروتئین‌های ترشحی ادامه می‌یابد، اما در ER تجمع می‌یابند که این موارد از مشخصه تعریفی جهش یافته‌های sec کلاس B می‌باشد. بررسی اثرات مشترک حاصل از جهش بر روی عملکرد وزیکول‌های COPI یا COPII که سبب مهار انتقالات رفت و برگشتی در جهش یافته‌های sec می‌شود، نشان‌دهنده وابستگی ذاتی و زیربنایی این دو فرایند انتقالی است.

همان‌طور که در فصل ۱۳ شرح داده شد، ER حاوی چندین پروتئین محلول است که در فرایند تاخوردن و تغییر پروتئین‌های تازه سنتز شده شرکت دارند. این آنزیم‌ها شامل چاپرون Bip و آنزیم پروتئین دی‌سولفید ایزومراز است که برای انجام شدن اعمال ER ضروری هستند. اگرچه این پروتئین‌های لومنی جدید در ER به‌طور اختصاصی توسط وزیکول‌های COPII انتخاب نمی‌شوند، اما به علت وفورشان در ER می‌توانند به‌طور غیر فعال به داخل وزیکول‌هایی که به سمت سیس‌گلژی منتقل می‌شوند، بارگیری شوند. بازگشت این پروتئین‌های محلول به سمت ER که به واسطه وزیکول‌های COPI صورت می‌گیرد، مانع از تهی شدن مخزن آنها می‌شود.

اغلب پروتئین‌های محلول ساکن در ER دارای یک توالی Lys-Asp-Glu-Leu (که به صورت کد تک‌حرفی KDEL است) در انتهای C ترمینال خود می‌باشند (جدول ۲-۱۴ را ملاحظه کنید). آزمایشات متعددی نشان داده‌اند که **پیام دسته‌بندی**

1- Coatomer



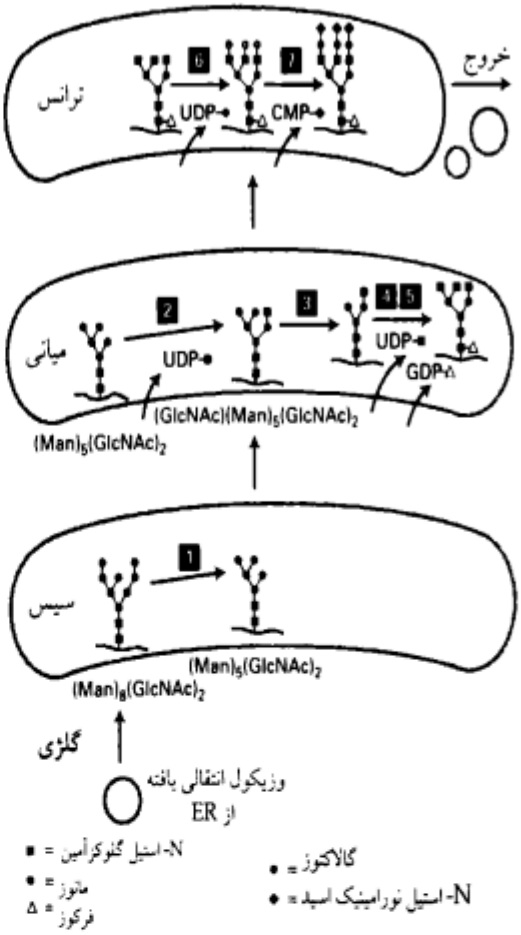
شکل ۱۳-۱۴ نقش گیرنده KDEL در حصول مجدد پروتئین‌های لومنی موجود در ER از گلژی. پروتئین‌های ER خصوصاً آنهایی که در مقادیر زیاد وجود دارند، می‌توانند به‌طور غیر فعال به داخل وزیکول‌های COPII بروند و به سمت گلژی منتقل گردند (مراحل ❶ و ❷). بیشتر این پروتئین‌ها دارای یک توالی C ترمینال KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) (قرمز) هستند که به آنها اجازه برگشت مجدد به ER را می‌دهد. گیرنده KDEL که اکثراً در شبکه سیس گلژی و در هر دو وزیکول COPII و COPII قرار گرفته است، به پروتئین‌های دارنده پیام دسته‌بندی KDEL متصل شده و آنها را به سمت ER برمی‌گرداند (مراحل ❸ و ❹). این سیستم برگشتی مانع از تهی شدن مخزن پروتئین‌های لومنی ER از جمله آنهایی که برای تاخوردن مناسب پروتئین‌های تازه سنتز شده ترشحی لازمند، می‌شود. تمایل اتصال گیرنده KDEL نسبت به pH بسیار حساس است. تغییرات جزئی در pH اندامک ER و گلژی بر میزان تمایل اتصال پروتئین‌های دارای KDEL با گیرنده‌اش در وزیکول‌های مشتق شده از گلژی و آزاد شدن در ER اثر می‌گذارد.

KDEL[1] به عنوان یک عامل ضروری و کافی سبب می‌شود که پروتئین‌های حامل آن در ER قرار گیرند. به عنوان مثال، زمانی که آنزیم پروتئین دی‌سولفید ایزومراز سنتز شده در سلول‌های فیبروبلاست موجود در محیط کشت، دچار جهشی گردد که سبب فقدان این چهار ریشه شود، پروتئین ترشح خواهد شد. بنابراین اگر پروتئینی که به‌طور عادی ترشح می‌شود، طوری تغییر کند که در انتهای C- ترمینال آن توالی پیام KDEL قرار گیرد، پروتئین در ER قرار خواهد گرفت. پیام دسته‌بندی KDEL توسط گیرنده KDEL شناسایی شده و به آن متصل می‌گردد. این گیرنده یک پروتئین غشای گذر می‌باشد که در ابتدا بر روی وزیکول‌های انتقالی کوچکی که میان ER و سیس‌گلژی و هم‌چنین بر روی شبکه سیس‌گلژی در گردش بودند، شناسایی شدند. علاوه بر این، پروتئین‌های محلول موجود در ER که پیام KDEL را دارا هستند، حاوی زنجیره‌های اولیگوساکاریدی می‌باشند که به واسطه تغییرات کاتالیزشونده با آنزیم‌هایی که تنها در سیس‌گلژی یا شبکه سیس‌گلژی وجود دارند، ایجاد شده‌اند. بنابراین در این زمان‌هاست که پروتئین‌ها باید ER را ترک کرده و به دورترین شبکه سیس‌گلژی انتقال یابند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که گیرنده KDEL به‌طور اساسی برای بازگرداندن پروتئین‌های محلول حاوی پیام دسته‌بندی KDEL که به شبکه سیس-گلژی منتقل شده‌اند؛ به ER وارد عمل می‌شود (شکل ۱۳-۱۴). گیرنده KDEL در pH پایین به‌طور محکم به لیگاند خود اتصال می‌یابد که چون pH گلژی سیس کم است، بنابراین گیرنده قادر به اتصال با پپتیدهای KDEL در سیس‌گلژی است اما این اتصال در ER گسسته می‌شود که علت آن pH بیشتر ER نسبت به گلژی است.

گیرنده KDEL و سایر پروتئین‌های غشایی که از گلژی به ER برگشت می‌کنند، حاوی یک توالی Lys-Lys-X-X در انتهایی‌ترین نقطه در قطعه C ترمینال خود هستند که در سطح سیتوزول واقع شده است (جدول ۲-۱۴ را ملاحظه کنید). این **پیام دسته‌بندی KKXX**[2] که به کمپلکس حاصل از زیرواحدهای β و α در COPI (دو تا از زیرواحدهای هفت پلی‌پپتیدی در کُتامر COPI) متصل می‌گردد، به عنوان یک فاکتور لازم و کافی برای وارد کردن پروتئین‌های غشایی به درون وزیکول‌های COPIها به منظور انتقال برگشتی آنها به ER عمل می‌کند. جهش یافته‌های حساس به حرارت مخمری که فاقد COPIα یا COPIβ هستند، نه تنها قادر به اتصال به پیام KKXX نیستند، بلکه هم‌چنین توانایی بازگرداندن پروتئین‌های حاوی این پیام به ER را هم ندارند که این امر نشان‌دهنده این است

1- KDEL sorting signal

2- KKXX sorting signal



▲ **شکل ۱۴ـ۱۴ پردازش زنجیره‌های اولیگوساکاریدی با اتصال N موجود بر روی گلیکو پروتئین‌های درون سیسترناهای سیس، میانی و ترانس در سلول‌های مهره‌داران.** آنزیم‌های کاتالیزکننده هر مرحله در جای خود نشان داده شده است. پس از اضافه شدن سه ریشه مانوز در سیس گلژی (مرحله ❶)، پروتئین به وسیله پدیده بلوغ سیسترنایی به سمت گلژی میانه حرکت می‌کند. در این منطقه، سه ریشه N- استیل گلوکزآمین (GlcNAC) اضافه می‌شود (مراحل ❷ و ❹)، دو ریشه دیگر مانوز نیز به آن می‌چسبند (مرحله ❸) و سپس یک فوکوز در مرحله بعدی به آن افزوده خواهد شد (مرحله ❺). فرایند پردازش توسط اضافه شدن سه ریشه مانوز (مرحله ❻) و نهایتاً پیوند یک ریشه N- استیل نورامینیک اسید به هر کدام از ریشه‌های گالاکتوز (مرحله ❼)، کامل می‌شود. آنزیم‌های ترانسفرازی که قندها را به صورت یکی در هر بار به اولیگوساکارید اضافه می‌کنند، از نوکلئوتیدهای قندی وارد شده از سیتوزول به عنوان پیش‌ساز استفاده می‌نمایند. این مسیر اشاره به فرایندهای پردازش گلژی برای یک گلیکو پروتئین عادی پستانداران دارد. تفاوت در ساختار اولیگوساکارید با اتصال N می‌تواند در نتیجه تفاوت‌های موجود در مراحل پردازش در گلژی ایجاد گردد.

که وزیکول‌های COPI انتقال برگشتی از گلژی به ER را وساطت می‌کنند.

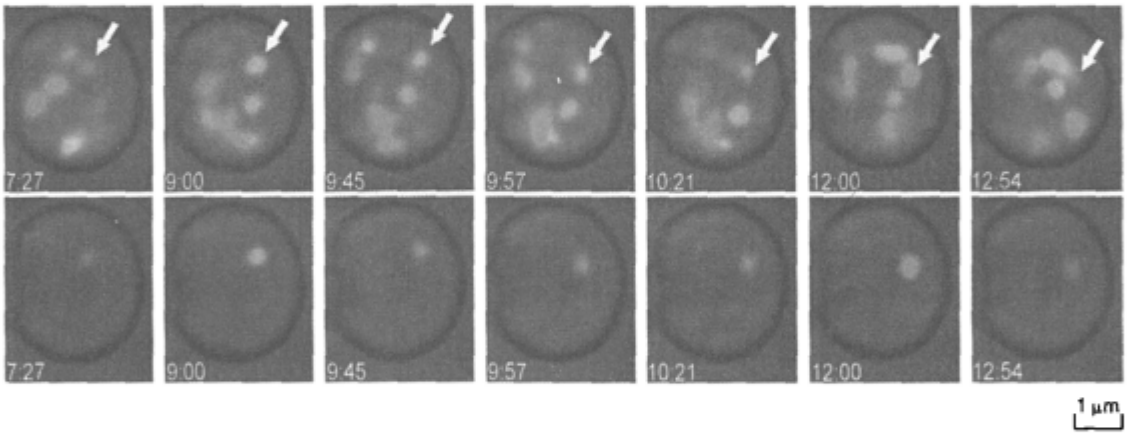
به‌طور واضح، دسته‌بندی پروتئین‌های ER و کمپلکس گلژی فرایندی بسیار انتخابی و تنظیم شده است که نهایتاً توسط ویژگی کارگوی وارد شده به وزیکول‌های COPII (رفت) و COPI (برگشتی) کنترل می‌گردد. ورود انتخابی پروتئین‌ها به داخل وزیکول‌های انتقالی محصور شده در غشای، چرخه بازیافت فسفولیپیدها و پروتئین‌های غشایی و چرخه بازیافت پروتئین‌های لومنی محلول میان دو بخش مجزا از هم، مباحث زیربنایی فرایند نقل و انتقال پروتئین‌های وزیکولی هستند که در مراحل پایانی مسیر ترشحی هم صورت می‌گیرند.

انتقال رو به جلو (رفتی) میان گلژی توسط بلوغ سیسترنایی صورت می‌گیرد

کمپلکس گلژی از سه یا چهار بخش کوچک‌تر تشکیل شده است که غالباً به صورت توده فشرده حاصل از کیسه‌های پهن یا سیسترنا، آرایش یافته‌اند. هر بخش از گلژی بر اساس وجود آنزیم‌های ویژه‌ای در آن، از بخش دیگر متمایز می‌شود. بسیاری از آنزیم‌های گلیکوزیداز و گلیکوزیل ترانسفرازی که در فرایند پردازش کربوهیدرات‌های با اتصال N یا O چسبیده به پروتئین‌های ترشحی نقش دارند، نیز همانند همین پروتئین‌های ترشحی به توده گلژی انتقال می‌یابند. روی هم رفته، پروتئین‌هایی که به صورت پیوسته در میان توده گلژی حرکت می‌کنند، شباهت بسیار زیادی به یک رشته پیوسته‌ای دارند که در آنجا زنجیره‌های کربوهیدراتی پردازش شده در یک بخش به عنوان سوبسترایی برای آنزیم‌های پردازنده بخش بعدی به کار گرفته می‌شوند (شکل ۱۴ـ۱۴ مراحل پی در پی و منظم پردازش را نشان می‌دهد).

سالیان زیادی تصور بر این بود که دستگاه گلژی اساساً به صورت دسته‌ای متشکل از بخش‌های مجزا از هم و ساکن است که در آن وزیکول‌های انتقالی کوچک پروتئین‌های ترشحی را در جهت رو به جلو از سیس به بخش وسطی گلژی و از قسمت وسطی به ترانس‌گلژی منتقل می‌کردند. استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که وزیکول‌های کوچک بسیار زیادی با گلژی همکاری می‌کنند که سبب حرکت پروتئین‌ها از یک بخش به بخش دیگر آن می‌شوند (شکل ۱۵ـ۱۴). به این ترتیب مشخص شد که بسیاری از این وزیکول‌ها، انتقال برگشتی را وساطت کرده و سبب بازگرداندن آنزیم‌های گلژی یا ER از قسمت‌های دورتر به بخش‌های ابتدایی‌تر

◀ شکل تجربی ۱۵-۱۴ میکروگراف الکترونی کمپلکس گلژی یک سلول اگزوکرینی پانکراس که هر دو نوع وزیکول رفت و برگشتی را نشان می‌دهد. یک وزیکول بزرگ ترشحی در حال تشکیل شدن از شبکه ترانس‌گلژی در این تصویر دیده می‌شود. اجزاء ER خشن در انتهای سمت چپ این میکروگراف واقع شده‌اند. در مجاورت ER خشن عناصر انتقالی به چشم می‌خورد که برآمدگی‌های هموار در حال جوانه زدن از آنها هستند. این جوانه‌ها وزیکول‌های کوچکی تشکیل می‌دهند که پروتئین‌های ترشحی را از ER خشن به سمت کمپلکس گلژی می‌برند. سایر وزیکول‌های کوچکی که در میان سیسترنای گلژی پراکنده هستند در فرایند انتقال برگشتی و نه در سمت رفت شرکت می‌کنند.



▲ شکل تجربی آزمایشگاهی ۱۶-۱۴ (شکل رنگی) پروتئین‌های ادغامی که دارای برچسب فلورسانس هستند، مراحل بلوغ سیسترنایی را در یک سلول مخمر زنده نشان می‌دهند. سلول‌های مخمر بیان‌کننده پروتئین گلژی پسین Vrg4 متصل به GFP (فلورسانس سبز) و پروتئین گلژی پیشین Sec7 متصل به DsRed (فلورسانس قرمز) توسط **میکروسکوپ ثبت‌کننده زمان**[1] مورد مشاهده قرار گرفته است. ردیف بالایی تصاویر که به فاصله حدود ۱ دقیقه از هم گرفته شده‌اند، یک مجموعه از سیسترنای گلژی را نشان می‌دهد که در هر لحظه از زمان با Vrg4 یا Sec7 نشاندار شده است. ردیف پایینی تصاویر تنها یک سیسترنای گلژی را نشان می‌دهد که توسط پردازش دیجیتالی تصاویر بدست آمده است. در ابتدای امر فقط Vrg4-GFP در سیسترنای جدا شده به چشم می‌خورد و پس از آن فقط Sec7-DsRed را در سیسترنای جدا شده می‌توان مشاهده نمود، اما در این میان یک دوره زمانی مهم به چشم می‌خورد که در آن هر دو پروتئین با هم در این قسمت دیده می‌شوند. این آزمایش تجسم مستقیمی از فرضیه بلوغ سیسترنایی است و نشان می‌دهد که محتویات یک سیسترنای مورد نظر، تحت تأثیر فرایند بلوغ که به واسطه کاهش پروتئین‌های گلژی پسین و به دست آوردن پروتئین‌های گلژی پیشین مشخص می‌شود، قرار می‌گیرد.

مسیر ترشحی می‌شوند.

هم‌اکنون می‌دانیم که گلژی سازمان‌یابی بسیار پویایی دارد. به منظور درک اثر این انتقالات برگشتی بر سازمان‌یابی گلژی، به بررسی اثر خالص ناشی از انتقال آنزیم‌ها از ترانس‌گلژی میانه در مقابل انتقال آنزیم‌ها از گلژی میانه به سیس‌گلژی بر روی بخش‌های گلژی میانه متمرکز می‌شویم. همان‌طور که این فرایند در حال انجام شدن

1- Time-lapse microscop

است، گلژی میانه آنزیم‌هایی را از ترانس‌گلژی می‌گیرد و در مقابل آنزیم‌های گلژی میانه در آنجا در حال کم شدن هستند. به این ترتیب این قسمت به تدریج به یک ترانس‌گلژی جدید تبدیل می‌شود. در این مسیر، پروتئین‌های ترشحی کارگو دچار پردازش ناشی از کربوهیدرات‌ها می‌شوند که در توالی‌های خاصی از آنها صورت می‌گیرد بدون آن‌که توسط وزیکول انتقالی رفت از یک سیسترنا به سیسترنای دیگر منتقل شوند.

شواهد اولیه نشان می‌دهد که انتقال رو به جلو پروتئین‌های کارگو از سیس به قسمت ترانس‌گلژی توسط یک مکانیسم غیر وزیکولی به نام **بلوغ سیسترنایی**[1] صورت می‌گیرد که توسط بررسی‌های دقیق میکروسکوپی فرایند سنتز فلس‌های جلبکی[2]، کشف گردید. این گلیکوپروتئین‌های دیواره سلولی، در زیر میکروسکوپ الکترونی به صورت کمپلکس‌های بزرگ قابل رؤیت در سیس‌گلژی به چشم می‌خورند. همانند سایر پروتئین‌های ترشحی فلس‌های تازه سنتز شده از سیس به سمت ترانس‌گلژی حرکت می‌کنند، ولی می‌توانند حدود ۲۰ بار بزرگ‌تر از وزیکول‌های انتقالی معمولی که از سیسترنای گلژی جوانه می‌زنند، شوند. به‌طور مشابهی در طی سنتز کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها، تجمعات بزرگی از پیش‌ساز پروکلاژن اغلب در لومن سیس‌گلژی تشکیل می‌شوند (شکل ۱۴ـ۱۹). تجمعات پروکلاژن بزرگ‌تر از آنند که بتوان آنها را جزو وزیکول‌های انتقالی کوچک دسته‌بندی نمود و محققان تاکنون نتوانسته‌اند نمونه‌های مشابه دیگری از چنین تجمعات بزرگی را در میان وزیکول‌های ترشحی پیدا کنند. چنین مشاهداتی این پیشنهاد را مطرح می‌کنند که انتقال رو به جلوی کلاژن و یا شاید تمامی پروتئین‌های ترشحی از یک قسمت گلژی به بخش دیگر به واسطه وزیکول‌های کوچک انجام نمی‌شود.

به منظور بررسی دقیق بلوغ سیسترنایی در مخمر، از کپی‌های GFP با رنگ‌های متفاوت استفاده می‌شود که می‌تواند دو پروتئین مختلف گلژی را به‌طور همزمان نشان دهد. شکل ۱۶ـ۱۴ نشان می‌دهد که چه‌طور یک پروتئین ساکن در سیس‌گلژی که با یک پروتئین فلورسنت سبز رنگ نشاندار شده است، به همراه یک پروتئین ترانس‌گلژی نشاندار شده با یک پروتئین فلورسنت قرمز رنگ در سلول مخمری عمل می‌کنند. به نظر می‌رسد که در هر لحظه از زمان، یک قسمت مورد نظر از سیسترنای گلژی دارای تشابهاتی واضح با سایر بخش‌های گلژی است به این معنا که هر بخش دارای پروتئین سیس‌گلژی یا پروتئین ترانس‌گلژی است، ولی به مقادیر کمتر، هر دو نوع پروتئین را نیز داراست. به این ترتیب با گذشت زمان، به نظر می‌رسد که در سیسترنای مورد نظر که با پروتئین مخصوص سیس‌گلژی نشاندار شده است، مقدار این پروتئین به‌طور پیشرونده‌ای کاهش می‌یابد و در عوض پروتئین ترانس‌گلژی به دست می‌آورد. این رفتار، مدلی بسیار دقیق برای بلوغ سیسترنایی پیش‌بینی می‌کند که در آن محتوای یک سیسترنای مشخص به صورتی تغییر می‌کند که پروتئین‌های موجود در آن از قسمت‌های دورتر به بخش‌های نزدیک‌تر حرکت می‌کنند.

سئوالات جدال‌آمیز بسیار زیادی در ارتباط با چگونگی جریان یافتن غشای میان توده گلژی هنوز حل نشده مانده است. به عنوان مثال، اگرچه به نظر می‌رسد که اکثر انتقالات پروتئینی توسط مکانیسم بلوغ سیسترنایی ازخلال کمپلکس گلژی صورت می‌گیرد، اما مدارکی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد دست کم وزیکول‌های انتقالی COPI که از غشاهای گلژی جوانه می‌زنند، حاوی پروتئین‌های کارگو (بیشتر آنزیم‌های گلژی) بوده و به سمت رفت (بیشتر از برگشت) حرکت می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۴

مراحل اولیه مسیرهای ترشحی

- وزیکول‌های COPII پروتئین‌ها را از ER خشن به سیس گلژی منتقل می‌کنند؛ وزیکول‌های COPI پروتئین‌ها را در جهت برگشت انتقال می‌دهند (شکل ۱۱-۱۴ را ملاحظه کنید)
- پوشش‌های COPII حاوی سه ترکیب هستند: پروتئین Sar1 متصل‌شونده به GTP، کمپلکس Sec23/Sec24 و کمپلکس Sec13/Sec31.
- اجزاء پوشش COPII به پروتئین‌های کارگوی غشایی حاوی پیام دی-اسیدی یا سایر پیام‌ها در بخشهای سیتوزولی آنها متصل می‌شوند (شکل ۲۱-۱۴ را ملاحظه کنید). پروتئین‌های کارگوی محلول شاید بوسیله اتصال به گیرندهٔ پروتئینی غشای به وزیکول‌های COPII هدفدهی شوند.
- بسیاری از پروتئین‌های محلول ER حاوی پیام KDELهستند. اتصال این توالی پیام به گیرندهٔ پروتئینی ویژه در غشای سیس- گلژی، پروتئین‌های ER را به سمت وزیکول‌ها رتروگراد COPI سوق می‌دهد (شکل ۱۳-۱۴ را ملاحظه کنید).
- پروتئین‌های غشایی نیازمند به تشکیل وزیکول‌های COPII می‌توانند بوسیله وزیکول‌های COPI از سیس‌گلژی بازگردند.

1- Cisternal maturation

2- Algal scales

یکی از پیامهایی که پروتئین‌های غشایی را به وزیکول‌های COPI هدایت می‌کند توالی KKXX است که به زیرواحدهای پوشش COPI متصل می‌شود.

- وزیکول‌های COPI همچنین پروتئین‌های مربوط به گلژی را از نواحی آخری به نواحی اولی مجموعه گلژی حمل می‌کنند.
- پروتئین‌های محلول و غشایی در کمپلکس گلژی توسط بلوغ سیسترنایی تکامل می‌یابند. بلوغ سیسترنایی فرایند انتقال آنتروگراد وابسته به آنزیمهای گلژی است که توسط انتقال وزیکولهای COPI در جهت رتروگراد حرکت می‌کنند.

۱۴-۴ مراحل پایانی مسیر ترشحی

همان‌طور که پروتئین‌های کارگو توسط پدیده بلوغ سیسترنایی از سطح سیس به سوی سطح ترانس‌گلژی حرکت می‌کنند، زنجیره‌های اولیگوساکاریدی آنها توسط آنزیم‌های مقیم در گلژی دچار تغییر می‌شوند. انتقالات برگشتی وزیکول‌های COPI از بخش‌های پیشین به سمت پسین، سبب حفظ مقادیر کافی آنزیم‌های تغییردهنده کربوهیدرات‌ها در قسمت‌های عملکردی‌شان می‌شوند. نهایتاً، پروتئین‌های کارگویی که به‌طور صحیح انتخاب شده‌اند، روی شبکه ترانس‌گلژی، اغلب در بخش‌های **دورگلژی**[1]، فرود می‌آیند. در این نقطه پروتئین‌ها به منظور انتقال به مقصد نهایی‌شان، درون یک یا چندین نوع متفاوت وزیکول دسته‌بندی می‌شوند. در این بخش به بحث در مورد انواع متفاوت وزیکول‌هایی که از شبکه ترانس‌گلژی جوانه می‌زنند، مکانیسم‌هایی که پروتئین‌های کارگو را میان آنها جدا می‌کنند و پردازش‌های کلیدی که در مراحل پایانی مسیر ترشحی صورت می‌گیرند، می‌پردازیم. انواع مختلف وزیکول‌هایی که از ترانس گلژی جوانه می‌زنند را در شکل ۱۴-۱۷ خلاصه کرده‌ایم.

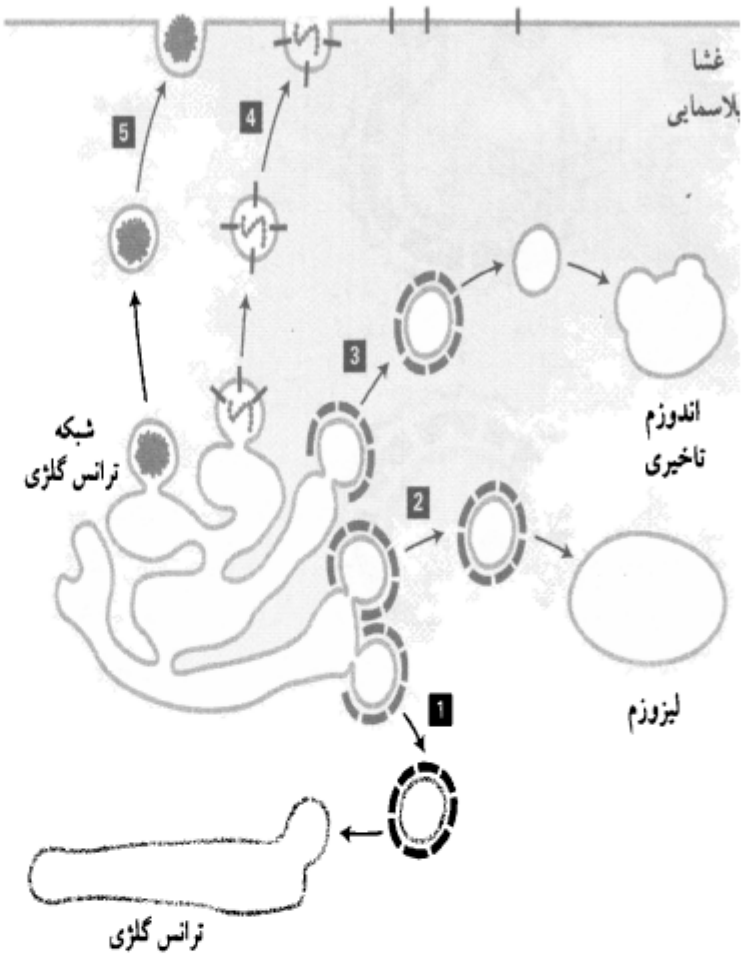
وزیکول‌های پوشیده از کلاترین و / یا پروتئین‌های آداپتور، چندین مرحله از انتقال را وساطت می‌کنند

نمونه‌ای از وزیکول‌ها که به بهترین نحو بررسی و شناسایی شده وزیکولی است که از شبکه ترانس‌گلژی (TGN) جوانه می‌زند و دارای یک پوشش دولایه‌ای است: لایه خارجی متشکل از پروتئین رشته‌ای کلاترین است و لایه داخلی آن متشکل از کمپلکس‌های پروتئین آداپتور (AP) می‌باشد. مولکول‌های تخلیص شده کلاترین که شکل سه‌بازویی دارد، تری‌اسکلیون نامیده می‌شود که از کلمه یونانی «Three-legged» گرفته شده است (شکل ۱۴-۱۸a). هر بازو حاوی یک زنجیره سنگین کلاترین (جرم مولکولی ۱۸۰۰۰۰) و یک زنجیره سبک کلاترین (جرم مولکولی ۴۰۰۰۰-۳۵۰۰۰) است. تری‌اسکلیون‌ها پلیمریزه شده و یک تورینه چندوجهی را تشکیل می‌دهند که به‌طور ذاتی دارای شکل منحنی می‌باشد (شکل ۱۴-۱۸b). زمانی که کلاترین روی غشاء دهنده پلیمریزه می‌شود، به کمپلکس‌های AP که در میان تورینه کلاترین و غشای آرایش می‌یابند، متصل می‌شود. هر کمپلکس AP (جرم مولکولی ۳۴۰۰۰۰) حاوی یک کپی از هر زیرواحد پروتئین‌های متفاوت آداپتور است. یک اتصال اختصاصی بین دُمین کروی موجود در انتهای هر زنجیره سنگین کلاترین در یک تری‌اسکلیون و یک زیرواحد کمپلکس AP سبب شروع آرایش همزمان تری‌اسکلیون‌های کلاترین با کمپلکس‌های AP شده و بر پایداری پوشش وزیکولی کامل شده می‌افزاید.

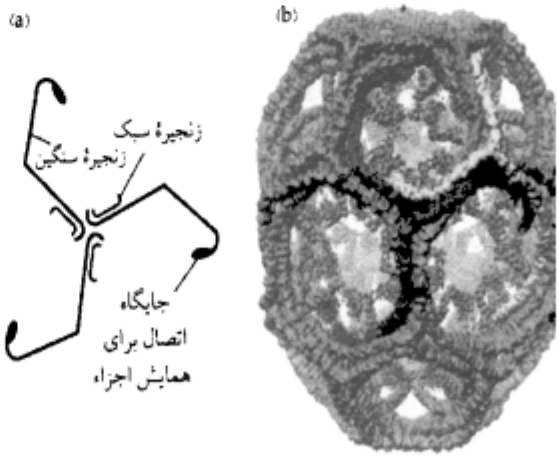
پروتئین‌های آداپتور به وسیله اتصال به بخش سیتوزولی پروتئین‌های غشایی، قادر به شناسایی و تشخیص پروتئین‌های کارگویی که به‌طور اختصاصی در ساختمان یک وزیکول انتقالی در حال جوانه زدن وارد می‌شوند (یا از آن خارج می‌شوند)، می‌گردد. سه نوع متفاوت از کمپلکس‌های AP شناخته شده است (AP2, AP3 و AP1) که هر کدام دارای چهار زیرواحد متفاوت‌اند که به نظر می‌رسد پروتئین‌های مرتبط به هم می‌باشند. اخیراً نوع ثانویه‌ای از پروتئین‌های آداپتور با نام GGA شناخته شده‌اند که دارای یک پلی‌پپتید منفرد با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ است که هر دو جزء متصل‌شونده به کلاترین و کارگو در آن مشابه با آنچه که در کمپلکس‌های هتروتترامری بزرگ‌تر AP شناسایی شده است، می‌باشد.

وزیکول‌های حاوی هر کدام از انواع کمپلکس آداپتور (AP یا GGA) مراحل انتقالی خاصی را وساطت می‌کنند (جدول ۱-۱۴ را ملاحظه کنید). همه وزیکول‌هایی که در پوشش خود یکی از این کمپلکس‌ها را دارند، برای شروع سازمان‌دهی پوشش روی غشاءدهنده، از ARF استفاده می‌کند. همان‌گونه که قبلاً شرح دادیم، ARF می‌تواند سبب راه‌اندازی فرایند سازماندهی پوشش‌های COPIها هم بشود. سایر ترکیبات غشایی یا فاکتورهای پروتئینی مشخص‌کننده نوع پوشش که پس از اتصال ARF به روی آن سازمان می‌یابند تا کنون مشخص نشده‌اند.

1- Distal



◀ شکل ۱۷-۱۴ (شکل رنگی) نقل و انتقالات پروتئینی از شبکه ترانس گلژی با وساطت وزیکول. وزیکول‌های COPI (بنفش) (❶) انتقال برگشتی را در داخل گلژی وساطت می‌کنند. پروتئین‌های عمل‌کننده در لومن یا در غشای لیزوزوم توسط وزیکول‌های پوشیده از کلاترین (قرمز) از شبکه ترانس‌گلژی انتقال می‌یابند (❸). پس از برداشته شدن پوشش، وزیکول‌ها با اندوزوم‌های تأخیری ادغام می‌شوند که سبب حمل محتویات آنها به لیزوزوم می‌شود. پوشش موجود بر روی اکثر وزیکول‌های کلاترینی حاوی پروتئین‌های اضافی (کمپلکس‌های AP) می‌باشد که در اینجا نشان داده نشده است. برخی از وزیکول‌های مربوط به گلژی ترانس که پروتئین‌های کارگوی اختصاص یافته برای لیزوزوم را حمل می‌کنند، به‌طور مستقیم با لیزوزوم ادغام می‌شوند (❷)، به این ترتیب از مسیر فرعی لیزوزوم عبور نمی‌کنند. این وزیکول‌ها با نوعی از کمپلکس AP (آبی) پوشیده می‌شوند. پروتئین‌های کمپلکس AP چه در وزیکول‌های پوشیده از کلاترین و چه در این نوع وزیکول‌ها، هنوز ناشناخته مانده‌اند. پروتئین‌های پوششی احاطه‌کننده وزیکول‌های ترشحی پایدار (❹) و تنظیمی (❺) تا کنون مشخص نشده‌اند. این وزیکول‌ها پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشای پلاسمایی را از شبکه ترانس‌گلژی به سطح سلول منتقل می‌کنند.



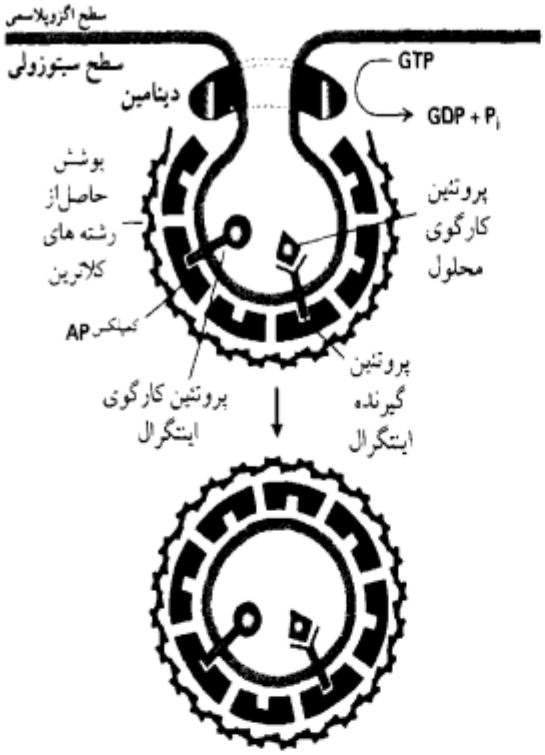
▲ شکل ۱۸-۱۴ (شکل رنگی) ساختمان پوشش‌های کلاترین. (a) یک مولکول کلاترین که **تری‌اسکلیون**[1] نامیده می‌شود، از سه زنجیره سنگین و سه زنجیره سبک تشکیل شده است. کلاترین دارای یک انحنای ذاتی است که منجر به خمیده شدن زنجیره‌های سنگین می‌شود. (b) پوشش‌های کلاترینی تشکیل شده در محیط کشت *In Vitro* به وسیله مخلوط کردن زنجیره‌های سنگین و سبک کلاترین تخلیص شده با کمپلکس‌های AP2 در غیاب غشاها به دست می‌آیند. **میکروگراف کرایوالکترونی**[2] بیش از ۱۰۰۰ ذره شبکه مانند کلاترینی با آرایش شش‌وجهی توسط دستگاه دیجیتالی پردازنده تصاویر به منظور ساخت یک ساختار متوسط حاصل از تصاویر به دست آمده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. تصویر به دست آمده تنها زنجیره‌های سنگین کلاترین موجود در یک ساختار متشکل از ۳۶ تری‌اسکلیون را نشان می‌دهد. سه تری‌اسکلیون نشان داده شده قرمز، آبی و سبز سایه روشن شده‌اند. ناحیه کمپلکس‌های AP2 که به نواحی داخلی قفس کلاترینی چسبیده‌اند نیز در این نمونه پردازش شده قابل رؤیت است.

1- Triskelion

2- Cryoelectron micrograph

وزیکول‌هایی که از شبکه ترانس‌گلژی جوانه می‌زنند در راه رسیدن به لیزوزوم وارد مسیری می‌شوند که در آن اندوزوم تأخیری دارای پوشش کلاترین به AP1 یا GGA اتصال می‌یابد. AP1 و GGA به دُمین سیتوزولی پروتئین‌های کارگو در غشای هدف متصل می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که پروتئین‌های غشایی حاوی توالی Tyr-X-X-Φ که در آن X می‌تواند هر اسید آمینه‌ای باشد و Φ یک اسید آمینه آبگریز حجیم است، به درون وزیکول‌های کلاترین / AP1ای که درحال جوانه زدن از شبکه ترانس‌گلژی هستند وارد می‌شوند. **این پیام دسته‌بندی YXXΦ**[1] بایکی از زیرواحدهای موجود در پوشش وزیکول برهمکنش می‌کند. همان‌طور که در بخش بعدی شرح می‌دهیم، وزیکول‌های دارای پوشش‌های کلاترین / AP2 که در طی فرایند اندوسیتوز از غشای پلاسمایی جوانه می‌زنند نیز می‌توانند پیام دسته‌بندی YZZΦ را شناسایی نمایند. وزیکول‌های پوشیده از پروتئین‌های GGA و کلاترین توسط نوع متفاوتی از توالی‌های دسته‌بندی به مولکول‌های کارگو می‌چسبند. پیام‌های دسته‌بندی سیتوزولی به‌طور اختصاصی به پروتئین‌های آداپتور GGA دارای توالی‌های Asp-Phe-Gly-X- و Leu-Leu ,Asp-X- Φ (در اینجا X و Φ نیز به همان صورت بالا تعریف می‌شوند)، متصل می‌شوند.

برخی از وزیکول‌های جوانه زده از شبکه ترانس‌گلژی دارای پوششی متشکل از کمپلکس AP3 هستند. اگرچه کمپلکس AP3 دارای جایگاه اتصال به کلاترین مشابه با کمپلکس‌های AP1 و AP2 است. اما در اینجا به درستی مشخص نیست که آیا کلاترین برای عمل وزیکول‌های حاوی AP3 ضروری است. زیرا مشاهده شده است که جهش یافته‌های AP3 که فاقد جایگاه اتصال به کلاترین هستند، عملکرد خود را به‌طور کامل حفظ کرده‌اند. وزیکول‌های پوشیده از AP3 انتقال به لیزوزوم را وساطت می‌کنند. اما به نظر می‌رسد که مسیر اندوزوم تأخیری را میانبر زده و به‌طور مستقیم با غشای لیزوزوم ادغام می‌شوند. در انواع خاصی از سلول‌ها، وزیکول‌های AP3 انتقال پروتئین را به بخش‌های مختص ذخیره مواد که مرتبط با لیزوزوم هستند، وساطت می‌کنند. به عنوان مثال AP3 برای انتقال پروتئین‌ها به ملانوزوم‌ها که حاوی رنگدانه سیاه ملانین در سلول‌های پوست هستند و به وزیکول‌های ذخیره‌ای پلاکت در مگاکاریوسیت‌ها، سلول‌های بزرگی که قطعه قطعه شده و تولید دوجین پلاکت می‌کنند، لازم می‌باشد. موش‌هایی که در هر دو زیرواحد مختلف AP3 جهش یافته‌اند، نه تنها پیگمانتاسیون پوست آنها غیر طبیعی است، بلکه ناهنجاری‌های مربوط به لخته شدن خون



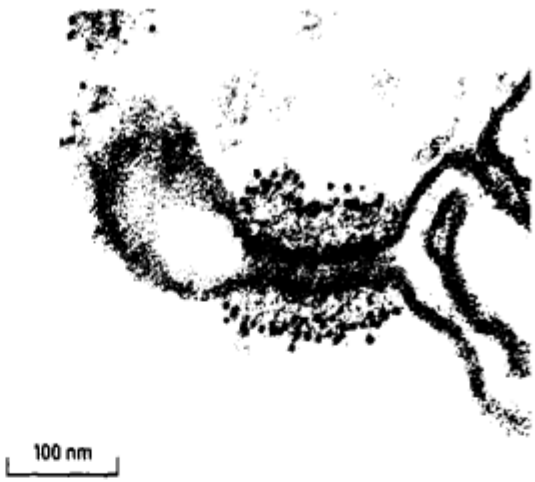
▲ **شکل ۱۹-۱۴ مدلی از جدا شدن وزیکول‌های پوشیده از کلاترین/AP با واسطه دینامین.** پس از تشکیل یک جوانه وزیکولی، دینامین درقسمت بالایی گردن آن پلیمریزه می‌شود. به واسطه مکانیسمی که به‌خوبی شناخته نشده است، هیدرولیز GTP که توسط دینامین کاتالیز می‌شود، منجر به‌آزاد شدن وزیکول از غشای‌دهنده می‌شود. یادآورمی‌شویم که پروتئین‌های غشایی موجود در غشای‌دهنده به واسطه بر همکنش با کمپلکس‌های AP موجود در پوشش، به داخل وزیکول کشیده‌می‌شوند.

نیز در آنها دیده می‌شود. مورد اخیر به این دلیل اتفاق می‌افتد که پاره شدن رگ خونی به دلیل نبودن پلاکت‌های حاوی وزیکول‌های ذخیره‌ای طبیعی، بهبود نمی‌یابد.

دینامین برای جدا شدن وزیکول‌های کلاترین از غشادهنده لازم است

مرحله اساسی در تشکیل یک وزیکول انتقالی که ما هنوز به آن اشاره‌ای نکرده‌ایم، قطع شدن جوانه وزیکولی از غشای‌دهنده می‌باشد. در مورد وزیکول‌های با پوشش کلاترین /AP، پروتئین سیتوزولی دینامین برای رها شدن وزیکول‌های کامل شده، لازم است. در مراحل پایانی تشکیل شدن جوانه، دینامین در اطراف بخش

1- YXXΦ sorting signal



▲ **شکل تجربی ۲۰ـ۱۴ هیدرولیز GTP توسط دینامین برای جدا شدن وزیکول‌های پوشیده با کلاترین از غشای در عصاره‌های فاقد سلول لازم است.** مخلوطی از پایانه‌های عصبی که اندوسیتوز در سطح وسیعی در آنها صورت می‌گیرد را توسط تیمار با آب مقطر لیز کرده و با GTP-γ-S، یک مشتق غیر قابل هیدرولیز GTP، انکوبه کرده‌ایم. پس از برش‌گیری، مخلوط تهیه شده را با آنتی‌بادی آنتی‌دینامین چسبیده به طلا، تیمار کرده و سپس در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمودیم. این تصویر که نشان‌دهنده یک جوانه پوشیده از کلاترین / AP با گردن بلند آستر شده با دینامین پلیمریزه شده در محل گردن است، بیانگر این مطلب است که جوانه‌ها در غیاب هیدرولیز GTP تشکیل می‌شوند، اما وزیکول‌ها قدرت جدا شدن از غشای را ندارند. پلیمریزاسیون وسیع دینامین که در حضور GTP-γ-S رخ می‌دهد، به‌طور حتم در طی فرایند جوانه‌زنی عادی صورت نمی‌گیرد.

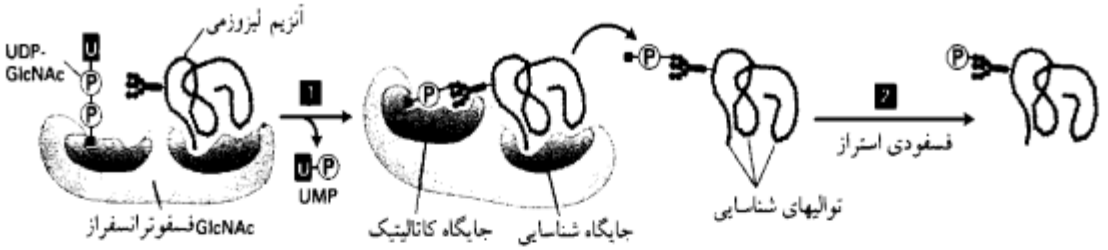
گردن پلیمریزه شده و سپس GTP را هیدرولیز می‌کند. به نظر می‌رسد که انرژی حاصل از هیدرولیز GTP یک تغییر ساختمان فضایی دردینامین القاء کرده که باعث فشرده شدن گردن وزیکول تا جایی که به‌طور کامل جدا شود، می‌گردد (شکل ۱۹ـ۱۴). نکته جالب اینجاست که وزیکول‌های COPI و COPII بدون نیاز به GTPaseای چون دینامین، می‌توانند از غشای دهنده جدا گردند. به علت وجود چنین تفاوت‌های اساسی فرایند جدا شدن در میان انواع متفاوت وزیکول‌ها، این پدیده هنوز به درستی شناخته نشده است.

انکوباسیون عصاره سلولی با مشتق غیر قابل هیدرولیز GTP، دلایل مهمی برای اهمیت دینامین در پدیده جدا شدن وزیکول‌های کلاترین /AP در طی آندوسیتوز، ثابت کرده است. چنین تیمارهایی منجر به تجمع تعداد زیادی جوانه وزیکولی پوشش‌دار می‌شود که دارای گردن‌های بسیار بلندی هستند که توسط دینامین پلیمری احاطه شده‌اند، اما نمی‌توانند از غشای جدا شوند (شکل ۲۰ـ۴) و همین طور سلول‌های بیان‌کننده شکل‌های جهش یافته دینامین که قادر به اتصال GTP نیستند و به جای تجمع جوانه‌های وزیکولی دارای گردن بلند که با دینامین پلیمریزه شده، احاطه شده‌اند. این جهش یافته‌ها اصلاً قادر به تشکیل وزیکول‌های با پوشش کلاترین، نیستند.

همانند وزیکول‌های COPI و COPII، وزیکول‌های کلاترین/AP هم معمولاً پس از تشکیل، پوشش خود را به زودی از دست می‌دهند. Hsc70 سیتوزولی، یک پروتئین چاپرونی بوده که به‌طور پیوسته در تمامی سلول‌های یوکاریوتی دیده می‌شود و از انرژی حاصل از هیدورلیز ATP برای تحریک پلیمریزاسیون پوشش کلاترینی با استفاده از تری‌اسکلیون‌ها استفاده می‌کند. تجزیه پوشش نه تنها باعث آزاد شدن تری‌اسکلیون‌ها به منظور استفاده مجدد در تشکیل وزیکول‌های بیشتر می‌شود، بلکه هم‌چنین سبب در معرض قرار گرفتن v-SNAREها برای به کارگیری‌شان در ادغام با غشاهای هدف می‌گردد. به نظر می‌رسد که تغییرات ساختمان فضایی صورت گرفته بر روی ARF که سبب تبدیل آن از وضعیت متصل به GTP به وضعیت متصل به GDP می‌شود، زمان دپلیمریزاسیون پوشش کلاترینی را کنترل و تنظیم می‌کند. نحوه فعالیت Hsc70 که ممکن است با فعالیت کنترلی ARF جفت شده باشد، هنوز به درستی شناخته نشده است.

ریشه‌های مانوز ۶ فسفات، پروتئین‌های محلول را به سمت لیزوزوم‌ها هدف‌گیری می‌کنند

اکثر پیام‌های دسته‌بندی که در مسیر نقل و انتقالات وزیکولی عمل می‌کنند، توالی‌های آمینو اسیدی کوتاهی هستند که در پروتئین‌های تعیین هدف شده یافت می‌شوند. بر خلاف اینها، پیام دسته‌بندی که آنزیم‌های لیزوزومی محلول را از شبکه ترانس‌گلژی به اندوزوم تأخیری هدایت می‌کند، یک ریشه کربوهیدراتی مانوز ۶ فسفات (M6P) می‌باشد که در سیس‌گلژی تشکیل می‌شود. اضافه شدن و شروع پردازش یک یا چندین پیش‌ساز اولیگوساکاریدی با اتصال N که در ER خشن صورت می‌گیرد، برای آنزیم‌های لیزوزومی مشابه با پروتئین‌های ترشحی و غشایی است که حاوی یک هسته متشکل از زنجیره‌های $Man_8(GlcNAc)_2$ می‌باشد (شکل ۱۸ـ۱۳). در سیس‌گلژی اولیگوساکاریدهای با اتصال N موجود بر روی تعدادی از آنزیم‌های لیزوزومی، تحت اثر یک واکنش دو مرحله‌ای قرار می‌گیرد و ریشه‌های M6P روی آن تشکیل می‌گردد



▲ شکل ۲۱ـ۱۴ (شکل رنگی) تشکیل ریشه‌های مانوز -۶ فسفات (M6P) که آنزیم‌های محلول را به سوی لیزوزوم‌ها هدف‌گیری می‌کنند. ریشه‌های M6P که پروتئین‌ها را به سوی لیزوزوم‌ها هدایت می‌کنند، توسط دو آنزیم مقیم در قسمت سیس گلژی تشکیل می‌گردند. مرحله ❶: یک N-استیل گلوکزآمین (GlcNAc) فسفوترانسفراز، یک گروه فسفریله شده GlcNAc را به اتم کربن شماره ۶ یک یا چند ریشه مانوز منتقل می‌کند. به دلیل این‌که تنها آنزیم‌های لیزوزومی حاوی توالی‌هایی (قرمز) هستند که توسط این آنزیم‌ها شناسایی و به آنها متصل می‌شوند بنابراین گروه‌های GlcNAc فسفریله به‌طور اختصاصی تنها به آنزیم‌های لیزوزومی اضافه می‌شوند. مرحله ❷: پس از رها شدن پروتئین تغییر یافته از فسفوترانسفراز، یک فسفودی‌استراز گروه GlcNAc را برمی‌دارد و در عوض یک ریشه مانوز فسفریله شده را روی آنزیم لیزوزومی قرار می‌دهد.

(شکل ۱۲ـ۱۴). اضافه شدن ریشه‌های M6P به زنجیره‌های اولیگوساکاریدی آنزیم‌های محلول لیزوزومی مانع از این می‌شود که این پروتئین‌ها تحت اثر واکنش‌های پردازش بیشتر که آنها را برای ترشح و قرارگیری در غشای نشانه‌گذاری می‌کند، قرار گیرند (شکل ۱۴ـ۱۴ را ملاحظه کنید).

همان‌طور که در شکل ۲۲ـ۱۴ نشان داده است، جدا شدن آنزیم‌های لیزوزومی حاوی M6P از پروتئین‌های ترشحی و غشایی در شبکه ترانس‌گلژی صورت می‌گیرد. در اینجا گیرنده‌های غشای گذر مانوز -۶ فسفات به ریشه‌های M6P موجود بر روی پروتئین‌های مربوط به لیزوزوم به صورت بسیار محکم و اختصاصی متصل می‌گردد. سپس وزیکول‌های کلاترین/AP1 حاوی گیرنده M6P و آنزیم‌های لیزوزومی متصل به آن، از شبکه ترانس‌گلژی جوانه زده، پوشش‌های خود را از دست می‌دهند و سرانجام به واسطه مکانیسم‌هایی که قبلاً شرح داده شدند، با اندوزوم تأخیری ادغام می‌گردند.

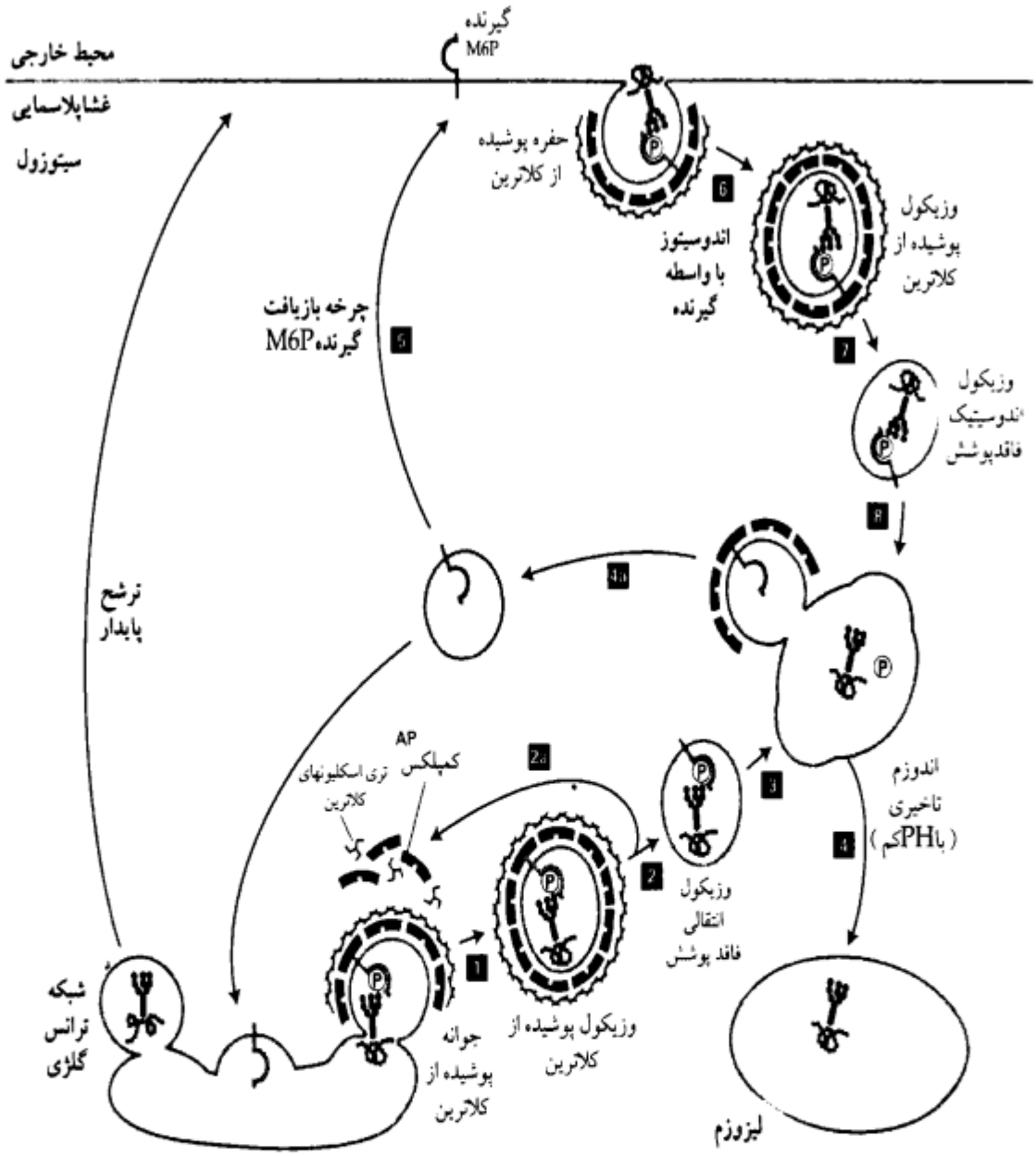
گیرنده‌های M6P می‌توانند در pH کمی اسیدی (۶/۵≈) شبکه ترانس‌گلژی به M6P متصل شوند، اما در pH کمتر از ۶، اتصال آنزیم‌های لیزوزومی در داخل اندوزوم‌های تأخیری که pH درونی‌شان ۵/۰ـ۵/۵ است، گسسته می‌شود. به علاوه، وجود یک فسفاتاز در اندوزوم‌های تأخیری که اغلب گروه فسفات ریشه‌های M6P موجود بر روی آنزیم‌های لیزوزومی را برمی‌دارد، مانع از اتصال مجدد گیرنده M6P که ممکن است علی‌رغم pH پایین لیزوزوم‌ها اتفاق افتد، می‌شود. وزیکول‌های در حال جوانه زدن از اندوزوم‌ها، گیرنده M6P را به شبکه ترانس‌گلژی یا گه‌گاه به صورت تصادفی به سطح سلول برمی‌گردانند. نهایتاً اندوزوم‌های تأخیری بالغ با لیزوزوم‌ها ادغام شده و آنزیم‌های لیزوزومی را به مقصد نهایی‌شان می‌رسانند.

دسته‌بندی آنزیم‌های محلول لیزوزومی در شبکه ترانس‌گلژی (شکل ۲۲ـ۱۴، مراحل ❶ - ❹) سبب شرکت کردن بسیاری از ترکیبات انتقالی میان بخش‌های ER و سیس‌گلژی که توسط وزیکول‌های COPI و COPIIها وساطت می‌شود، می‌گردد. در ابتدا مانوز ۶ فسفات به عنوان یک پیام دسته‌بندی با دُمین لومنی پروتئین گیرنده در غشای هدف برهمکنش می‌کند. دوماً، گیرنده‌های محصور در غشای به همراه لیگاندهای متصل به آنها، به واسطه برهمکنش با پوشش وزیکولی، به درون وزیکول‌های مناسب (در این مورد، وزیکول‌های کلاترین حاوی AP1 یا GGA) کشیده می‌شوند. سوماً این وزیکول‌های انتقالی تنها با اندامک‌های ویژه که در اینجا منظور اندوزوم تأخیری است و به واسطه برهمکنش‌های میان v-SNARE و t-SNAREهای اختصاصی متصل می‌شوند. در نهایت، انتقال درون سلولی گیرنده‌ها پس از جدا شدن آنها از لیگاند متصل به آنها، سبب بازیابی‌شان می‌شود.

مطالعه بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی، ترکیبات کلیدی مسیر دسته‌بندی لیزوزومی را روشن نمود

گروهی از بیماری‌های ژنتیکی که تحت عنوان **بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی**[1] خوانده می‌شوند، به دلیل فقدان یک یا چند آنزیم لیزوزومی ایجاد می‌گردند. در نتیجه گلیکولیپیدها و سایر ترکیبات خارج سلولی هضم نشده که درحالت عادی توسط آنزیمهای

1- Lysosomal storage disease



▲ **شکل ۲۲ـ۱۴ انتقال آنزیم‌های محلول لیزوزومی از شبکه ترانس گلژی و سطح سلول به لیزوزوم‌ها.** آنزیم‌های لیزوزومی تازه سنتز شده در ER در سیس گلژی دارای ریشه‌های مانوز -۶ فسفات (M6P) می‌شوند (شکل ۲۱ـ۱۴ را ملاحظه کنید). برای ساده‌تر شدن، تنها یک زنجیره اولیگوساکاریدی فسفریله شده نشان داده شده است، در حالی که در واقع آنزیم‌های لیزوزومی دارای تعداد زیادی از این زنجیره‌ها هستند. در شبکه ترانس‌گلژی، پروتئین‌های دارای پیام دسته‌بندی M6P با گیرنده‌های M6P در غشای بر همکنش کرده و به این ترتیب به داخل وزیکول‌های کلاترین/AP1 هدایت می‌گردند (مرحله ❶). پوشش احاطه‌کننده وزیکول‌ها به سرعت پس از رها شدن وزیکول دپلیمریزه می‌شود (مرحله ❷) و وزیکول‌های انتقالی فاقد پوشش با اندوزوم‌های تأخیری ادغام می‌گردند (مرحله ❸). پس از جدا شدن آنزیم‌های فسفریله از گیرنده‌های M6P، دفسفریله می‌شوند و اندوزوم تأخیری حاصل، فوراً با یک لیزوزوم ادغام می‌گردد (مرحله ❹). یادآوری می‌کنیم که پروتئین‌های پوششی و گیرنده‌های M6P بازیافت می‌شوند (مراحل 2a و 4a) و برخی از گیرنده‌ها به سطح سلول حمل می‌گردند (مرحله ❺). آنزیم‌های لیزوزومی فسفریله شده گه‌گاه بر حسب تصادف می‌توانند پس از دسته‌بندی شدن از گلژی به سطح سلول رفته و ترشح شوند. این آنزیم‌های ترشح شده می‌توانند توسط آندوسیتوز با واسطه گیرنده دوباره بازیابی شوند (مراحل ❻ - ❽) که این فرایند به‌طور تنگاتنگ به موازات فرایند انتقال آنزیم‌های لیزوزومی از شبکه ترانس‌گلژی به لیزوزوم‌ها صورت می‌گیرد.

لیزوزومی تجزیه می‌شوند، به صورت **انکلوزیونهای**[1] بزرگی در لیزوزوم‌ها تجمع می‌یابند. **بیماری سلول ـ I**[2]، نوع خاصی از بیماری ذخیره‌ای لیزوزومی است که در آن چندین آنزیم لیزوزومی وجود ندارد. سلول‌های افراد بیمار، فاقد N- استیل گلوکزآمین فسفوترانسفراز است که برای تشکیل ریشه‌های M6P روی آنزیم‌های لیزوزومی در سیس‌گلژی لازم است (شکل ۲۱ـ۱۴ را ملاحظه کنید). مقایسه بیوشیمیایی آنزیم‌های لیزوزومی افراد نرمال با افراد بیمار دچار این بیماری منجر به کشف اولیه مانوز ۶ فسفات به عنوان پیام دسته‌بندی لیزوزومی شد. فقدان پیام دسته‌بندی M6P در بیماران سلول I سبب می‌شود که آنزیم‌های لیزوزومی بیش از آن‌که دسته‌بندی شده و در لیزوزوم‌ها قرار گیرند، به خارج ترشح می‌شوند.

اگر فیبروبلاست‌های بیماران سلول I را در یک زمینه حاوی آنزیم‌های لیزوزومی حامل ریشه‌های M6P رشد دهیم، مشاهده می‌شود که سلول‌های بیمار محتوای تقریباً نرمالی از آنزیم‌های لیزوزومی را در داخل خود به دست آورده‌اند. این یافته‌ها نشان داد که غشای پلاسمایی این سلول‌ها دارای گیرنده‌های M6P است که می‌توانند آنزیم‌های لیزوزومی فسفریله شده را توسط اندوسیتوز با واسطه گیرنده، از خارج به درون سلول ببرند. این فرایند که توسط بسیاری از گیرنده‌های سطح سلولی برای بردن پروتئین‌ها یا ذرات متصل به آنها به داخل سلول انجام می‌شود، با جزئیات بیشتری در بخش بعدی شرح داده خواهد شد. هم‌اکنون می‌دانیم که حتی در سلول‌های سالم هم تعدادی از گیرنده‌های M6P به غشای پلاسمایی منتقل می‌شوند و تعدادی از آنزیم‌های لیزوزومی ترشح می‌گردند (شکل ۲۲ـ۱۴ را ملاحظه کنید). آنزیم‌های ترشح شده می‌توانند توسط آندوسیتوز با واسطه گیرنده بازیابی شده و به لیزوزوم‌ها هدایت شوند. بنابراین این مسیر تمامی آنزیم‌های لیزوزومی که از مسیر معمولی دسته‌بندی M6P منحرف شده‌اند را به اصطلاح **پاکسازی**[3] می‌کند.

هپاتوسیت‌های افراد دچار بیماری سلول I، اگرچه دچار نقص در فسفریلاسیون مانوز هستند اما دارای مقادیر عادی از آنزیم‌های لیزوزومی بوده و فاقد اجسام انکلوزیونی هستند. این یافته‌ها نشان‌دهنده این مطلب است که هپاتوسیت‌ها (انواعی از سلول‌های کبدی که به مقادیر زیاد وجود دارند) از یک مسیر غیر وابسته به M6P برای دسته‌بندی آنزیم‌های لیزوزومی استفاده می‌کنند. ماهیت این مسیر که احتمالاً در انواع دیگری از سلول‌ها نیز صورت می‌گیرد، هنوز شناسایی نشده است.

تجمع پروتئین در ترانس‌گلژی ممکن است برای هدایت پروتئین‌ها به سمت وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده، به کار رود

همان‌طور که در فصل مقدمه گفتیم، تمامی سلول‌های یوکاریوتی توسط فرایندی که معمولاً **ترشح پایدار**[4] نام دارد، پروتئین‌های خاصی را به‌طور مداوم ترشح می‌کنند. سلول‌های ترشحی تخصص یافته نیز پروتئین‌های دیگر را در وزیکول‌ها ذخیره کرده و فقط زمانی آنها را ترشح می‌کنند که با یک محرک ویژه تحریک شوند. یک مثال از چنین **ترشح تنظیم شده**[5] در سلول‌های β پانکراس رخ می‌دهد که در آن انسولین تازه سنتز شده در وزیکول‌های ترشحی ویژه ذخیره می‌شود و سپس انسولین را در پاسخ به افزایش گلوکز در خون ترشح می‌کند (شکل ۳۳ـ۱۵ را ملاحظه کنید). این سلول‌ها و سایر سلول‌های ترشحی به‌طور همزمان دو نوع وزیکول مختلف را برای انتقال پروتئین‌ها از شبکه ترانس‌گلژی به سطح سلول به کار می‌گیرند: وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده که اغلب به‌طور ساده وزیکول‌های ترشحی خوانده می‌شوند و وزیکول‌های انتقالی تنظیم نشده که وزیکول‌های ترشح پایدار هم خوانده می‌شوند.

به نظر می‌رسد که یک مکانیسم مشترک سبب هدف‌گیری برخی هورمون‌ها مثل ACTH (هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک)، انسولین و تریپسینوژن به داخل وزیکول‌های ترشح تنظیم شده می‌شود. توسط آزمایشاتی که از تکنیک‌های DNA نوترکیب به منظور القاء سنتز انسولین و تریپسینوژن در سلول‌های سرطانی هیپوفیز که پیش از این ACTH سنتز می‌کردند، استفاده می‌کنند، مدارکی به دست می‌دهد که حاکی از وجود یک مکانیسم مشترک است. در این سلول‌ها که در شرایط عادی انسولین یا تریپسینوژن را بیان نمی‌کنند، هر سه این پروتئین‌ها به داخل وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده، یکسان وارد شده و زمانی که یک هورمون به گیرنده موجود بر روی سلول‌های هیپوفیزی متصل می‌شود و سبب افزایش Ca^{2+} سیتوزولی می‌گردند، با هم به خارج ترشح می‌شوند. گرچه در این سه پروتئین توالی‌های آمینواسیدی یکسانی به عنوان یک توالی دسته‌بندی وجود ندارد، اما بدیهی است که ترکیبات مشترکی دارند که سبب ورود آنها به درون وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده می‌شود. شواهد مورفولوژیک پیشنهاد می‌کنند که ورود به داخل مسیر

1- Inclusion
2- I-cell disease
3- Scavenge
4- Constitutive secretion
5- Regulated secretion

تنظیم شده به وسیله تجمع انتخابی پروتئین‌ها کنترل می‌شود. به عنوان مثال وزیکول‌های نابالغ در این مسیر (آنهایی که فقط از شبکه ترانس‌گلژی جوانه زده‌اند) حاوی تجمعات پراکنده‌ای از پروتئین‌های ترشح شده‌اند که در زیر میکروسکوپ الکترونی قابل رؤیت می‌باشند. چنین تجمعاتی را می‌توان در وزیکول‌هایی که در فرایند جوانه‌زنی وجود دارند نیز مشاهده کرد و نشان‌دهنده پروتئین‌های در نظر گرفته شده برای وزیکول‌های تنظیم شده است که قبل از آن‌که به داخل وزیکول‌ها منتقل گردند به طور انتخابی با هم تجمع می‌یابند.

سایر مطالعات نشان داده‌اند که اگر در وزیکول‌های ترشحی تنظیمی حاصل از سلول‌های ترشحی پستانداران را که حاوی سه پروتئین کروموگرانین A، کروموگرانین B و سکرتوگرانین II هستند، شرایط یونی (pH=۶/۵ و غلظت $1mM\ Ca^{2+}$) انکوبه کنیم، این سه پروتئین در شبکه ترانس‌گلژی با هم تجمع ایجاد می‌کنند.

چنین تجمعاتی در pH خنثی ER تشکیل نمی‌شوند. تجمع انتخابی پروتئین‌های ترشحی تنظیم شده به همراه کروموگرانین A، کروموگرانین B یا سکرتوگرانین II می‌تواند بر اساس دسته‌بندی این پروتئین‌ها در داخل وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده باشد. پروتئین‌های ترشحی که به این پروتئین‌ها متصل نمی‌شوند، به صورت تجمع یافته در نمی‌آیند و بنابراین به سمت وزیکول‌های انتقالی تنظیم نشده، هدف‌گیری می‌شوند.

برخی پروتئین‌ها پس از ترک ترانس‌گلژی، تحت اثر پردازش پروتئولیتیکی قرار می‌گیرند

در تعدادی از پروتئین‌های ترشحی (مثل هورمون رشد) و پروتئین‌های خاص غشای ویروسی (مثل گلیکوپروتئین VSV)، برداشت توالی پیام ER در قسمت N- ترمینال از زنجیره نوظهور تنها فرایند قطع پروتئولیتیکی می‌باشد که نیازمند ایجاد تغییر در پی‌پیتید به منظور تولید انواع بالغ و فعال می‌باشد (شکل ۶ـ۱۳ را ملاحظه کنید). بنابراین تعدادی از پروتئین‌های غشایی و بسیاری از پروتئین‌های ترشحی، در ابتدا به صورت پیش‌سازهای اولیه بلند و غیر فعال که **پروپروتئین**[1] نام دارند، سنتز می‌شوند که نیازمند پردازش‌های پروتئولیتیکی بیشتر برای تولید پروتئین‌های غشایی از جمله هماگلوتینین آنفلوانزا (HA)، و پروتئین‌های ترشحی از قبیل آلبومین سرم، انسولین، گلوکاگون و فاکتور جفت‌یابی α مخمر می‌باشد. به‌طور کلی تغییر پروتئولیتیکی یک پروپروتئین به پروتئین بالغ مورد نظر، پس از هدف‌گیری پروپروتئین از شبکه ترانس‌گلژی به وزیکول‌های مناسب صورت می‌گیرد.

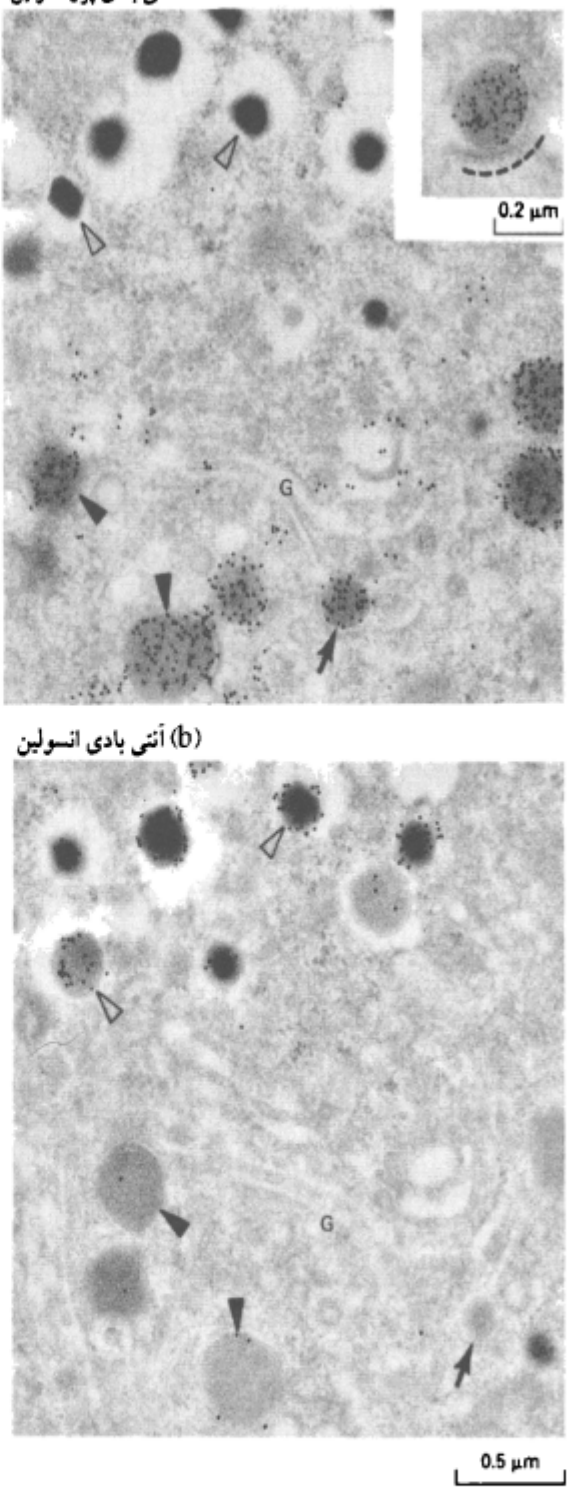
در مورد آنزیم‌های محلول لیزوزومی، پروپروتئین‌ها را **پروآنزیم**[2] می‌نامیم که همان آنزیم‌های غیر فعال از لحاظ کاتالیتیکی هستند و توسط گیرنده M6P دسته‌بندی می‌گردند. در اندوزوم تأخیری یا لیزوزوم، یک پروآنزیم تحت تأثیر قطع پروتئولیتیکی، یک پلی‌پپتید کوتاه‌تر اما فعال از لحاظ کاتالیتیکی تولید می‌کند. وجود این وقفه در فعال‌سازی پروآنزیم‌های لیزوزوم تا زمانی که به لیزوزوم برسند، مانع از هضم ماکرومولکول‌ها در بخش‌های ابتدایی‌تر مسیر ترشحی توسط آنها می‌شود.

به‌طور معمول، وزیکول‌های بالغ حمل‌کننده پروتئین‌های ترشحی به سطح سلول به وسیله ادغام تعدادی از وزیکول‌های غیر بالغ که حاوی پروپروتئین هستند، تشکیل می‌گردند. قطع پروتئولیتیکی پروپروتئین‌ها از قبیل پروانسولین در وزیکول، پس از انتقال آنها از شبکه ترانس‌گلژی صورت می‌گیرد (شکل ۲۳ـ۱۴). پروپروتئین‌های مربوط به اکثر پروتئین‌های ترشحی پایدار (مثل آلبومین) تنها یک بار و در جایگاه حاوی توالی شناسایی دی‌بازی مثل Arg-Arg یا Lys-Arg در C- ترمینال شکسته می‌شوند (شکل ۲۴a ـ۱۴).

پردازش پروتئولیتیکی پروتئین‌هایی که ترشح آنها به صورت تنظیم شده است، معمولاً موجب قطع شدن‌های اضافی می‌گردند. در مورد پروانسولین، برش‌های چندگانه زنجیره پلی‌پپتیدی منفرد، منجر به تولید زنجیر B دارای N- ترمینال و زنجیره A دارای C- ترمینال در انسولین بالغ می‌شود که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی و پپتید C مرکزی به هم متصل می‌شوند که پپتید C قطع و سپس تجزیه می‌گردد (شکل ۲۴b ـ۱۴).

شناسایی پروتئازهای مسئول پردازش پروتئین‌های ترشحی به وسیله بررسی مخمرهایی که در ژن KEX2 جهش یافته‌اند، میسر گردید. این سلول‌های جهش یافته پیش‌ساز فاکتور جفت‌یابی α را سنتز می‌کردند، اما قادر به پردازش پروتئولیتیکی آن به منظور تشکیل شکل عملکردی نبودند و بنابراین قدرت جفت‌گیری با سلول‌های نوع مخالف را نداشتند (شکل ۱۹ـ۲۱). تیپ وحشی ژن KEX2، اندوپروتئازی را کد می‌کند که پیش‌ساز فاکتور α را در جایگاه میان Arg-Arg و Lys-Arg واقع در C- ترمینال می‌شکند. با استفاده از ژن KEX2 به عنوان یک **پروب**[3] DNA، محققان موفق به تولید کلونی از یک خانواده از پروتئازهای

1- Proprotein
2- proenzyme
3- Probe



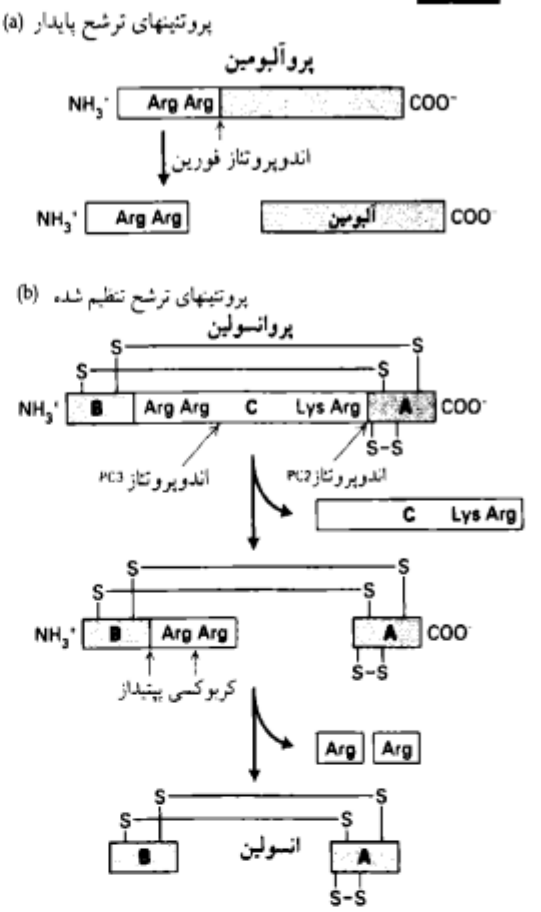
◀ **شکل تجربی ۲۳-۱۴ قطع پروتئولیتیکی انسولین در وزیکول‌های ترشحی زمانی اتفاق می‌افتد که وزیکول از شبکه ترانس‌گلژی جوانه زده باشد.** بخش‌های پشت سر هم در یک ناحیه از گلژی در یک سلول ترشح‌کننده انسولین که با آنتی‌بادی منوکلونال شناسایی‌کننده پروانسولین و نه انسولین (a) یا یک آنتی‌بادی شناسایی‌کننده انسولین و نه پروانسولین (b) رنگ‌آمیزی شده است. آنتی‌بادی‌هایی متصل به **ذرات طلا که در مقابل الکترون تیره**[۲] می‌شوند، در این میکروگراف الکترونی به صورت نقاط تیره دیده می‌شوند (شکل ۲۱-۹). وزیکول‌های ترشحی نابالغ (پیکان‌های توپُر) و وزیکول‌های در حال جوانه زدن از گلژی ترانس (فلش‌ها) با آنتی‌بادی پروانسولین و نه آنتی‌بادی انسولین رنگ شده‌اند. این وزیکول‌ها حاوی تجمعات پروتئینی پراکنده می‌باشند که حاوی پروانسولین و سایر پروتئین‌های ترشح تنظیمی است. وزیکول‌های بالغ (پیکان‌های توخالی) با آنتی‌بادی انسولین و نه آنتی‌بادی پروانسولین رنگ شده‌اند و دارای یک هسته متراکم حاوی انسولین کریستالی است. در حین جوانه زدن و بلوغ وزیکول‌های ترشحی حاوی پروانسولین (و نه انسولین)، تغییرات پروتئولیتیکی پروانسولین به انسولین پس از جوانه زدن وزیکول از شبکه ترانس‌گلژی در داخل وزیکول رخ می‌دهد. تصویر کوچک موجود در گوشه بالایی سمت راست نشان‌دهنده یک وزیکول ترشحی غنی از پروانسولین است که به وسیله یک پوشش پروتئینی احاطه شده است (خط نقطه‌چین).

پستانداران شدند که همگی‌شان زنجیره پروتئینی را روی توالی Arg-Arg یا Lys-Arg در سمت C- ترمینال می‌شکنند. یکی از آنها که **فورین**[۱] نام دارد در تمامی سلول‌های پستانداران یافت می‌شود و سبب پردازش پروتئین‌هایی از قبیل آلبومین می‌شوند که توسط مسیر پایدار ترشح می‌گردند. برعکس، اندوپروتئازهای PC3, PC2 تنها در سلول‌هایی وجود دارند که ترشح تنظیم شده را نشان می‌دهند. این آنزیم‌ها داخل وزیکول‌های ترشحی تنظیمی قرار دارند و سبب قطع پروتئولیتیکی بسیاری از پیش‌سازهای مربوط به هورمون‌ها در جایگاه‌های اختصاصی می‌گردند.

چندین مسیر سبب هدف‌گیری پروتئین‌های غشایی به سمت ناحیه رأسی یا بازولترال سلول‌های قطبی می‌شوند

غشای پلاسمایی سلول‌های قطبی اپیتلیال به دو بخش **رأسی**[۳] و **بازولترال**[۴] تقسیم می‌شوند. وجود اتصالات محکم میان این دو قسمت، مانع حرکت پروتئین‌های غشای پلاسمایی میان آنها می‌شود (شکل ۹-۱۹ را ملاحظه کنید). مکانیسم‌های دسته‌بندی متعددی، پروتئین‌های غشایی تازه سنتز شده را به قسمت‌های رأسی یا بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال می‌برد و هر یک از پروتئین‌ها می‌توانند توسط چندین مکانیسم، هدف‌گیری کنند. گرچه بخش‌های کلی این مکانیسم‌های دسته‌بندی شناسایی شده است اما پیام‌های

1- Furin
2- Electron opage gold particles
3- Apical 4- Basolateral



▲ **شکل ۱۴-۲۴ پردازش پروتئولیتیکی پروپروتئین‌ها در مسیرهای ترشحی پایدار و تنظیم شده.** پردازش پروآلبومین و پروانسولین به ترتیب دو مسیر معمول ترشح پایدار و تنظیم شده را نشان می‌دهد. اندوپروتئازهای شرکت‌کننده در این فرایندهای پردازشی، برش را در منطقه حاوی دو اسید آمینه متوالی واقع در C ترمینال ایجاد می‌کنند. (a) اندوپروتئاز فورین بر روی پیش‌سازهای پروتئین‌های ترشحی پایدار عمل می‌کند. (b) دو اندوپروتئاز PC2 و PC3، بر روی پیش‌سازهای مربوط به پروتئین‌های ترشحی تنظیم شده اثر می‌گذارند. پردازش نهایی این پروتئین‌ها، توسط یک کربوکسی پپتیداز صورت می‌گیرد که به‌طور متوالی، دو ریشه اسید آمینه‌ای بازی را در انتهای C- ترمینال برمی‌دارد.

مولکولی که بر انتقال پروتئین‌های غشایی به واسطه وزیکول در سلول‌های قطبی شده اثر می‌گذارند، هنوز شناخته نشده است. در نتیجه این دسته‌بندی و محدود شدن حرکت پروتئین در داخل غشای پلاسمایی ناشی از اتصالات محکم، دسته‌های متفاوتی از پروتئین‌ها در بخش رأسی و بازولترال به چشم می‌خورند. موضع‌گیری ترجیحی پروتئین‌های انتقالی ویژه برای تعداد زیادی از اعمال فیزیولوژیکی مهم از قبیل جذب مواد غذایی از لومن روده و اسیدی شدن لومن معده حیاتی است (شکل‌های ۱۱-۲۹ و ۱۱-۳۰ را ببینید).

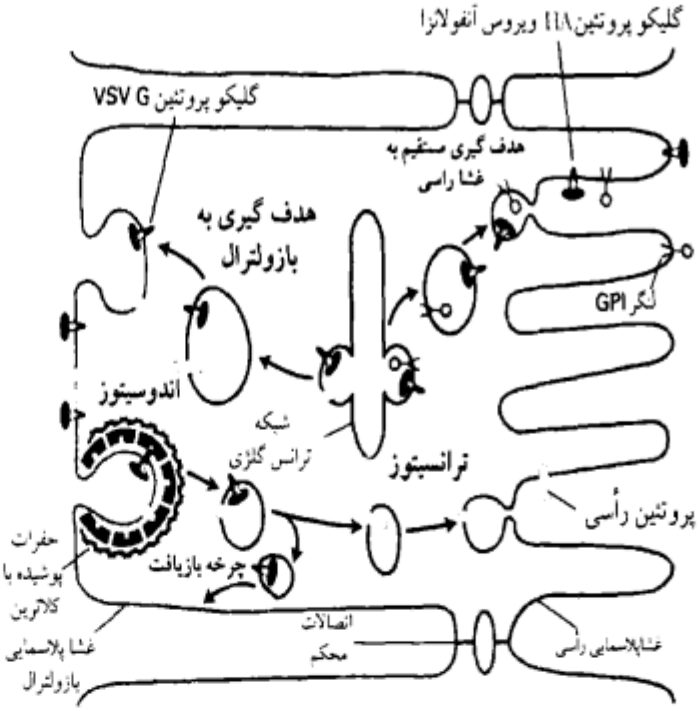
مطالعات میکروسکوپی و **تجزیه کردن سلول**[1] نشان داد پروتئین‌هایی که برای رسیدن به غشاهای رأسی یا بازولترال جدا شده‌اند، در ابتدا با هم در داخل غشاهای شبکه ترانس‌گلژی قرار می‌گیرند. در برخی حالات، پروتئین‌هایی که باید به غشای رأسی بروند، به داخل وزیکول‌های انتقالی مربوط به خودشان می‌روند که از شبکه ترانس‌گلژی جوانه زده و سپس به سمت ناحیه رأسی حرکت می‌کنند، در حالی که پروتئین‌های هدف‌گیری شده برای غشای بازولترال به داخل وزیکول‌های دیگری وارد می‌شوند که به سمت ناحیه بازولترال حرکت می‌کنند. انواع متفاوت وزیکول‌ها را می‌توان به واسطه محتویات پروتئینی تشکیل‌دهنده آنها که شامل پروتئین‌های Rab و v-SNARE مجزا می‌باشد، شناسایی کرد که ظاهراً این پروتئین‌ها، وزیکول را به سمت بخش‌های مناسب غشایی هدایت می‌کنند. در این مکانیسم، تفکیک پروتئین‌های مشخص شده برای غشاهای رأسی یا بازولترال از هم، توسط پروتئین‌های کارگو انجام می‌شود که در ساختمان انواع خاصی از وزیکول‌های در حال جوانه زدن از شبکه ترانس‌گلژی وجود دارد.

چنین هدف‌گیری‌های مستقیم به سمت غشای رأسی - بازولترال در سلول‌های کشت داده شده **مادین - داربی کانین کلیه**[2] (MDCK) که یک دودمان از سلول‌های قطبی اپی‌تلیومی کشت داده شده‌اند، مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت (شکل ۹-۳۴ را ملاحظه کنید). در سلول‌های MDCK آلوده به ویروس آنفلوانزا، ویروس‌های تکثیر شده، تنها از غشای رأسی جوانه می‌زنند، در حالی که در سلول‌های آلوده به ویروس استوماتیتیس وزیکولار (VSV)، ویروس‌های تکثیر شده فقط از غشای بازولترال جوانه می‌زنند. این تفاوت‌ها ناشی از این است که گلیکوپروتئین HA ویروس آنفلوانزا اکثراً از کمپلکس گلژی به سمت غشای رأسی منتقل شده و پروتئین VSVG فقط به سمت غشای بازولترال انتقال داده می‌شود (شکل ۱۴-۲۵). علاوه بر این، زمانی که ژن‌های کدکننده پروتئین HA توسط تکنیک‌های DNA نوترکیب، به داخل سلول‌های غیر آلوده تزریق می‌گردد، تمامی HAهای بیان شده در غشای رأسی تجمع می‌یابند که پیام دسته‌بندی در داخل خود گلیکوپروتئین HA قرار دارد و در سایر پروتئین‌های ویروسی که در طی عفونت ویروسی تولید می‌شوند، وجود ندارد.

در میان پروتئین‌های سلولی که تحت تأثیر چنین دسته‌بندی رأسی - بازولترال در گلژی قرار می‌گیرند، می‌توان انواع دارای یک لنگر غشایی گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) را نام برد. در

1- Cell-fractionation

2- Madin-Darby canine kidney (MDCK)



شکل ۲۵ـ۱۴ (شکل رنگی) هدف‌گیری پروتئین‌های مربوط به غشاهای پلاسمایی رأسی و بازولترال در سلول‌های قطبی. در سلول‌های کشت داده شده MDCK که به‌طور همزمان با ویروس‌های VSV و آنفلوانزا آلوده شده است، گلیکوپروتئین VSVG (بنفش) تنها در غشای بازولترال یافت می‌شود در حالی که گیکوپروتئین HA آنفلوانزا (سبز) تنها در غشای رأسی وجود دارد. برخی از پروتئین‌های سلولی (دایره‌های نارنجی) خصوصاً آنهایی که دارای یک لنگر GPI هستند، به وسیله وزیکول‌های انتقالی خاصی که از شبکه ترانس‌گلژی جوانه می‌زنند، برخی آنها به‌طور مستقیم به سمت غشای رأسی و بازولترال به همراه هم به سطح بازولترال منتقل می‌شوند و سپس پروتئین‌های رأسی (زرد و بیضی‌شکل) به‌طور انتخابی، توسط اندوسیتوز و ترانسیتوز به غشای رأسی برده می‌شوند.

سلول‌های MDCK و اکثر انواع سلول‌های اپی‌تلیالی، پروتئین‌های با لنگر GPI، به سمت غشای رأسی هدف‌گیری می‌شوند. پروتئین‌هایی که با لنگر GPI در غشای قرار می‌گیرند به صورت کلاسترهایی در ساختمان **رَفتهای لیپیدی**[1] که غنی از اسفنگولیپیدهاست، وارد می‌شوند (فصل ۱۰ را ملاحظه کنید). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که رَفتهای لیپیدی به همراه پروتئین‌هایی که به‌طور ترجیحی آنها را در بسیاری از سلول‌ها از سایر بخش‌ها جدا می‌کنند در سمت رأسی غشای قرار می‌گیرند. بنابراین، لنگر GPI یک پیام دسته‌بندی رأسی در همه سلول‌های قطبی نمی‌باشد. به عنوان مثال در سلول‌های تیروئید، پروتئین‌های دارای لنگر GPI در غشای بازولترال قرار می‌گیرند. به غیر از لنگرهای GPI، توالی منحصر به فرد دیگری وجود ندارد که به عنوان یک عامل ضروری و کافی برای هدف‌گیری پروتئین‌ها به سمت ناحیه رأسی یا بازولترال ایفای نقش کند. برعکس، هر پروتئین غشایی می‌تواند دارای پیام‌های دسته‌بندی چندگانه‌ای باشد که هر کدام از آنها پروتئین را به یک ناحیه مناسب در غشای پلاسمایی هدایت می‌کنند. به منظور مشخص نمودن این پیام‌های پیچیده و پروتئین‌های پوشش وزیکولی شناسایی‌کننده آنها، تعدادی از پروتئین‌های مختلف که به سمت نواحی خاص غشای پلاسمایی سلول‌های قطبی اپی‌تلیال هدایت می‌شوند را تحت تعقیب و بررسی قرار دادند.

مکانیسم دیگری برای هدف‌گیری پروتئین‌های رأسی و بازولترال در هپاتوسیت‌ها رخ می‌دهد که در شکل ۲۵ـ۱۴ نشان داده شده است. غشای بازولترال هپاتوسیت‌ها به سمت خون (همانند سلول‌های اپی‌تلیوم در روده) قرار دارد و غشاهای رأسی، کانال‌های کوچک بین سلولی را که از آنها صفرا ترشح می‌گردد، آستر می‌کنند. در هپاتوسیت‌ها، پروتئین‌های رأسی و بازولترال تازه سنتز شده، ابتدا توسط وزیکول‌ها از شبکه ترانس‌گلژی به ناحیه بازولترال منتقل شده و سپس توسط اگزوسیتوز به داخل پلاسما می‌روند (مثل ادغام غشای وزیکول با غشای پلاسمایی). اگرچه هم پروتئین‌های رأسی و هم بازولترال به داخل وزیکول‌های یکسان اندوسیتوز می‌شوند، اما سپس مسیرشان از هم جدا می‌شود. پروتئین‌های دسته‌بندی شده بازولترال، به داخل وزیکول‌های انتقالی هدایت می‌شوند که آنها را به غشای بازولترال می‌برند و برعکس پروتئین‌های اندوسیتوز شده مربوط به بخش رأسی به داخل وزیکول‌های انتقالی منتقل می‌شوند که توسط فرایند **ترانس‌سیتوز**[2] از عرض سلول عبور کرده و با غشای رأسی ادغام می‌گردد. این فرایند هم‌چنین در انتقال مواد خارج سلولی از یک سمت اپی‌تلیوم به سمت دیگر نیز به کار می‌رود. حتی در سلول‌هایی از قبیل MDCK که در آنها هدف‌گیری پروتئین‌های رأسی ـ بازولترال در گلژی صورت می‌گیرد، ترانس‌سیتوز می‌تواند یک مکانیسم دسته‌بندی "Fail-Safe" را فراهم کند. بنابراین اگر یک پروتئین رأسی اشتباهاً به غشای بازولترال منتقل شود، در معرض اندوسیتوز قرار گرفته و سپس به‌طور صحیح به غشای رأسی منتقل می‌شود.

1- Lipid rafts 2- Transcytosis

نکات کلیدی بخش ۴-۱۴

مراحل نهایی مسیر ترشحی

■ شبکه ترانس گلژی (TGN) نقطه شاخه عمده در مسیرهای ترشحی است که در آن پروتئین‌های ترشحی محلول پروتئین‌های لیزوزومی و پروتئین‌های غشایی برخی از سلولهایی که برای غشای بازولترال یا سطحی در نظر گرفته شده‌اند در وزیکولهای انتقالی مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند.

■ بسیاری از وزیکولهایی که از شبکه ترانس گلژی جوانه می‌زنند مانند وزیکولهای آندوسیتوزی از پوشش متشکل از کمپلکس‌های AP (پروتئین آداپتور) و کلاترین پوشیده می‌شوند (شکل ۱۸-۱۴ را ملاحظه کنید).

■ عملکرد وزیکولهای پوشیده از کلاترین به دینامین نیاز دارد که یک پوششی را در گردن جوانهٔ وزیکولی تشکیل داده و GTP را هیدرولیز می‌کند (شکل ۱۹-۱۴ را ملاحظه کنید).

■ آنزیمهای محلول در نظر گرفته شده برای لیزوزومها در سیس - گلژی دچار تغییر شده و چندین ریشهٔ مانوز ۶ - فسفات (M6P) بر روی زنجیره‌های الیگوساکاریدی کسب می‌کند.

■ گیرنده‌های M6P در غشای شبکه ترانس گلژی به پروتئین‌های حاوی ریشه‌های M6P متصل شده و انتقال آنها را به لیزوزومها انجام می‌دهند که در آنجا گیرنده‌ها و پروتئین‌های لیگاندی آنها از هم جدا می‌شوند. سپس گیرنده‌ها به گلژی یا غشای پلاسمایی بازگردش می‌کنند و آنزیمهای لیزوزومی وارد لیزوزومها می‌شوند (شکل ۲۲-۱۴ را ملاحظه کنید)

■ پروتئین‌های ترشحی تنظیمی در وزیکول‌های ترشحی تغلیظ و ذخیره می‌شوند و منتظر یک پیام عصبی یا هورمونی برای اگزوسیتوز می‌شوند. تجمع پروتئین در شبکه ترانس گلژی ممکن است نقش مهمی در هدایت پروتئینهای ترشحی به مسیر تنظیم‌شده داشته باشد.

■ بسیاری از پروتئین‌های منتقل شده از بین مسیر ترشحی متحمل قطع پروتئولیتیکی پس از گلژی می‌شوند که باعث تولید پروتئین‌های فعال و بالغ می‌شود. در حالت کلی بلوغ پروتئولیتیکی می‌تواند در وزیکول‌های حامل پروتئین‌ها از شبکه ترانس گلژی به سطح سلول، در اندوزوم تأخیری یا در لیزوزوم اتفاق بیفتد.

■ در سلولهای اپی‌تلیال قطبی، پروتئین‌های غشایی که برای غشای پلاسمایی بازولترال یا رأسی در نظر گرفته شده‌اند در شبکه ترانس گلژی به وزیکول‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۲۵-۱۴ را ملاحظه کنید). لنگر GPI تنها پیام شناخته شده برای قرارگیری در سطح بازولترال - رأسی است.

■ در هپاتوسیت‌ها و سایر سلول‌های قطبی، تمام پروتئین‌های غشای پلاسمایی در مرحله اول به سمت غشای بازولترال هدایت می‌شوند. سپس پروتئین‌های مربوط به سطح رأسی آندوسیتوز شده و از عرض سلول عبور کرده و به غشای رأسی می‌رسند (ترانس سیتوز).

۱۴-۵ آندوسیتوز با واسطه گیرنده

در بخش‌های قبلی به شرح مسیرهای اصلی پرداختیم که توسط آنها پروتئین‌های ترشحی و غشایی سنتز شده روی ER خشن به سطح سلول یا سایر مقصدهای تعیین شده منتقل می‌شدند. سلول‌ها هم‌چنین می‌توانند مواد را از محیط اطراف گرفته و به درون خود بیاورند و آنها را به سوی مقاصد ویژه هدایت کنند. تعداد کمی از انواع سلول‌ها (مثل ماکروفاژها) می‌توانند یک باکتری کامل یا سایر ذرات بزرگ غشایی را توسط **فاگوسیتوز**[1]، یک فرایند غیر انتخابی با واسطه اکتین، بگیرند که در طی آن پوشش غشای پلاسمایی گسترش یافته و مواد را می‌بلعد و وزیکول‌های بزرگی را تشکیل می‌دهد که **فاگوزوم**[2] نام دارند (شکل ۲-۹ را ملاحظه کنید). برعکس، تمام سلول‌های یوکاریوتی به‌طور پیوسته اندوسیتوز را به کار می‌گیرند که فرایندی است که در طی آن، ناحیه کوچکی از غشای پلاسمایی برای تشکیل وزیکول پوشیده از غشای با قطر حدود ۰/۱μm - ۰/۰۵ به داخل فرو می‌رود. در نوع دیگری از اندوسیتوز به نام **پینوسیتوز**[3]، قطرات کوچک مایع خارج سلولی بدون وجود مواد غیر محلول در آن، به‌طور غیر اختصاصی به درون سلول کشیده می‌شود. در این بخش تمرکز بر روی اندوسیتوز به واسطه گیرنده است که در آن یک گیرنده ویژه موجود بر روی سطح سلول به یک لیگاند درشت مولکول خارج سلولی که توسط گیرنده شناسایی می‌شود به طور محکم متصل می‌گردد. سپس ناحیه‌ای از غشای پلاسمایی که حاوی کمپلکس گیرنده - لیگاند است، به سمت داخل جوانه زده و سپس قطع می‌شود و به یک وزیکول انتقالی تبدیل می‌شود.

برخی از ماکرومولکول‌هایی که در سلول‌های مهره‌داران به وسیله آندوسیتوز به واسطه گیرنده به درون سلول راه می‌یابند، شامل ذرات حاوی کلسترول که لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)

1- Phagocytosis 2- Phagosome
3- Pinosytosis

نـام دارد، پـروتئین مـتصل بـه آهـن تـرانسـفرین، بسیاری از هورمون‌های پروتئینی (مثل انسولین) و گلیکوپروتئین‌های ویـژه است. فرایند اندوسیتوز با واسطه گیرنده برای چنین لیگـاندهایی، عموماً توسط حفرات پوشیده از کلاترین/AP2 و وزیکول‌هایی که در یک فرایند مشابه دسته‌بندی آنزیم‌های لیزوزوم توسط مانوز -۶ فسفات (M6P) در شبکه ترانس‌گلژی دخالت مـی‌کنند، صـورت می‌گیرد (شکل ۲۲ـ۱۴ را ملاحظه کنید). همان‌طور که قبلاً ذکر شد، برخی از گیرنده‌های M6P که در سطح سـلول وجـود دارنـد، در فرایند آندوسیتوز با واسطه گیرنده آنزیم‌های لیزوزومی که اشتباهاً به بیرون ترشح شده‌اند، شرکت می‌کنند. به‌طور کلی، گـیرنده‌های پروتئینی غشای گذر که عملشان برداشت لیگاندهای خارج سلولی است، طی پدیده آنـدوسیتوز، از سـطح سـلول بـه داخـل کشـیده می‌شوند و پس از آنکه وارد سلول شدند، دوباره طی چرخه بازیابی به سطح سلول برمی‌گردند که این پدیده شباهت زیادی به بازیابی گیرنده‌های M6P به غشای پلاسمایی و ترانس‌گلژی دارد. سرعت ورود به سلول توسط مقدار گیرنده‌های مورد نظر موجود در روی سطح سلول، محدود می‌گردد.

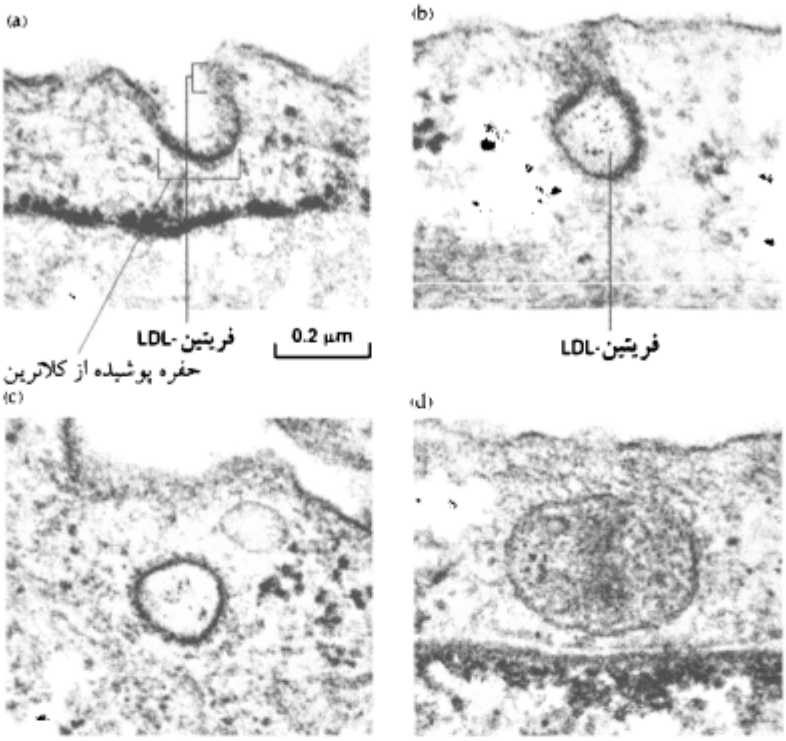
حفرات کلاترین/AP2 حدود ۲ درصد سـطح سـلول‌هایی از قبیل هـپاتوسیت‌ها و فـیبروبلاست‌ها را تشکـیل مـی‌دهند. اکـثر لیگاندهایی که توسط این حفرات و وزیکول‌ها به داخل سلول فرو رفته‌انـد، بـه عـنوان حـد واسـطهای انـدوسیتوز تـعداد کـثیری از لیگاندهایی (و نه همه آنها) که به گیرنده‌های سطح سلول متصل می‌شوند، عمل می‌کنند (شکل ۲۶ـ۱۴). برخی از گیرنده‌ها حتی در غیاب لیگاند می‌توانند روی حفرات پـوشیده از کـلاترین، اجـتماع تشکیل دهند. سایر گیرنده‌ها که به‌طور آزادانـه در سـطح غشـای پلاسمایی انتشار می‌یابند، به هنگام اتصال به لیگاند، تحت یک تغییر ساختمان فضایی قرار گرفته و در آن هنگام کمپلکس گیرنده ـ لیگاند به داخل یک حفره پوشیده از کلاترین منتشر شـده و در آنجا می‌ماند. دو یا چندین نوع از لیگاندهای متصل به گیرنده، از جـمله LDL و ترانسفرین می‌توانند در وزیکول یا حفره یکسان قرار گیرند.

سلول‌ها، لیپیدها را بـه شکـل کـمپلکس‌های بـزرگ و مـعروف لیپوپروتئین از خون دریافت می‌کنند

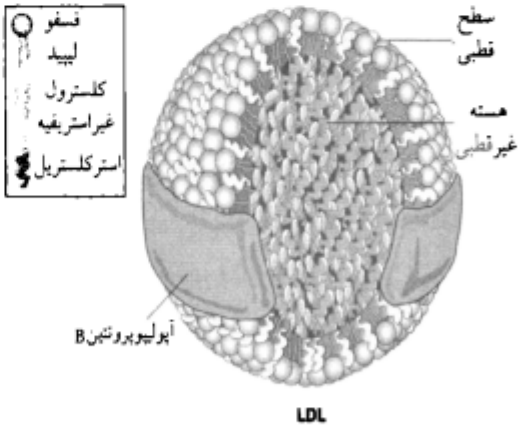
لیپیدهای جذب شده از رژیم غذایی در روده یا ذخیره شده در بافت چربی می‌توانند میان سلول‌ها در بدن توزیع شوند. برای تسهیل انتقال توده‌ای لیپیدها در میان سلول‌ها، در حیوانات یک مسیر کارآمد تکامل یافته است که سبب دسته‌بندی صدها تا هـزاران مـولکول لیپیدی به داخل حاملان ماکـرومولکولی مـحلول در آب بـه نـام **لیپوپروتئین‌ها** می‌شود و سلول‌ها می‌توانند آنها را به صورت یک مجموعه از گردش خون برداشت کنند. یک ذره لیپوپروتئینی دارای پوششی متشکل از پروتئین‌ها (آپولیپوپروتئین‌ها) و یک تک‌لایـه فسفولیپیدی حاوی کلسترول می‌باشد.

پوشش به صورت **دوگانه دوست**[1] است زیرا سطح خارجی آن آبدوست بوده و سبب می‌گردد که این ذرات در آب محلول گردند و سطح داخلی آن آبگریز است. در مجاورت سطح آبگـریز داخـلی، هسته‌ای از لیپیدهای خنثی که اکثراً حاوی اسـترهای کـلسترول، تـری‌گلیسیریدها یـا هـر دو است، وجـود دارد. لیـپوپروتئین‌های پستانداران به چند کلاس مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند که هر کلاس توسط چگالی شناوری متفاوتش از سایر کلاس‌ها، مجزا می‌شود. کلاسی که ما هم‌اکنون به آن می‌پردازیم **لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)** است. یک ذره معمولی LDL که در شکل ۲۷ـ۱۴ نشان داده شده است، کره‌ای به قطر ۲۵ـ۲۰nm می‌باشد. پوسته بیرونی آن متشکل از یک تک‌لایه فسفولیپیدی و یک مولکول منفرد از یک پروتئین بزرگ با نام apoB-100 می‌باشد؛ مرکز این ذره با کلسترول به شکل استرهای کلسترویل پر شده است. دو آزمایش کلی برای مطالعه نحوه ورود ذرات LDL به داخل سلول، به کار گرفته شده است. در روش اول از LDLهایی که توسط اتصال کوالان ^{125}I رادیواکتیو به زنجیره‌های داخلی ریشه تـیروزین در apoB-100 موجود بر سطح ذرات LDL نشاندار شده بودند، استفاده شد. پس از انکوباسیون سلول‌های کشت داده شده با چندین هزار LDL نشاندار، این امکان فراهم شد که مشخص کنیم چه تعداد LDL به سطح سلول‌ها متصل می‌شود، چه تعداد به داخل سلول می‌روند، و چه تعداد از محتویات apoB100 از LDL به وسیله هیدرولیز آنزیمی به اسیدهای آمینه سازنده‌اش تجزیه می‌گردد. تجزیه apo-B-100 را می‌توان به وسیله آزاد شدن تیروزین - ^{125}I در داخل محیط کشت، سنجش نمود. شکل ۲۸ـ۱۴ نشان‌دهنده مسیر زمانی وقایعی است که در طی پردازش سلول LDL با واسطه گیرنده رخ می‌دهند که توسط آزمایشات pulse-chase به همراه غلظت ثابتی از LDL نشاندار شده با ^{125}I مشخص می‌شود. این آزمایشات به وضوح نظم این وقایع را نشان می‌دهد: اتصال LDL به سطح سلول ← ورود به داخل سلولی ← تجزیه. آزمایش دوم شامل ذرات LDLای است که توسط برچسب مقاوم به عبور الکترون به زمینه چسبیده است و تـوسط

1- Amphipatic

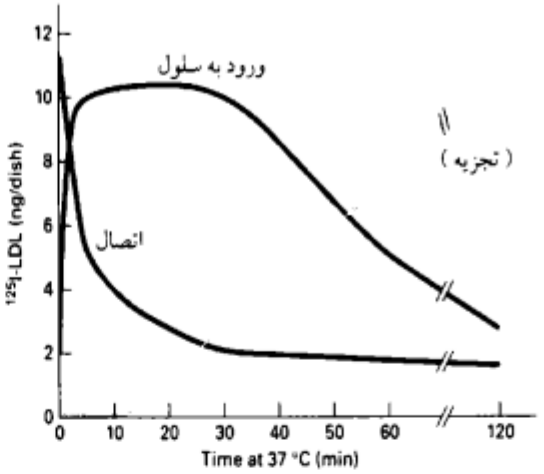


▲ **شکل تجربی ۲۶ـ۱۴ مراحل ابتدایی اندوسیتوز ذرات لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL) با واسطه گیرنده توسط میکروسکوپ الکترونی آشکار شده است.** فیبروبلاست‌های انسانی موجود در محیط کشت در یک محیط حاوی ذرات LDL که به‌طور کوالان به پروتئین آهن‌دار و متراکم به الکترون فریتین انکوبه شدند. هر ذره آهن موجود در فریتین در زیر میکروسکوپ الکترونی به صورت یک قطعه کوچک دیده می‌شود. در ابتدا سلول‌ها در دمای ۴°C انکوبه شدند که در این دما، LDL می‌تواند به گیرنده متصل شود. اما فرایند ورود به داخل سلول انجام نمی‌شود. پس از شستن LDLهای متصل نشده به سلول، سلول‌ها در دمای ۳۷°C گرم شدند و سپس در فواصل دوره‌ای زیر میکروسکوپ مشاهده گردیدند. (a) یک حفره پوشش‌دار که نشان‌دهنده پوشش کلاترین بر روی سطح داخلی (سیتوزولی) حفره است، به زودی پس از تغییر درجه حرارت، تشکیل شده است. (b) یک حفره حاوی LDL که از قرار معلوم برای تشکیل وزیکول پوشش‌دار، بسته شده است. (c) یک وزیکول پوشش‌دار حاوی ذرات LDL متصل به فریتین. (d) ذرات LDL متصل به فریتین موجود در یک اندوزوم اولیه با سطح صاف که ۶ دقیقه پس از ورود وزیکول به سلول شروع به تشکیل می‌کند.



▲ **شکل ۲۷ـ۱۴ مدلی از لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)** . این کلاس و سایر کلاس‌های لیپوپروتئینی، دارای ساختار کلی مشابه هستند: یک پوسته دوگانه دوست تشکیل شده از یک تک‌لایه فسفولیپیدی (نه دولایه)، کلسترول و پروتئین است به اضافه یک هسته آبگریز که اکثراً از استرهای کلستریل با تری‌گلیسریدها یا هر و به همراه مقادیر اندکی از سایر لیپیدهای خنثی (مثل برخی ویتامین‌ها) تشکیل شده است. این مدل از LDL بر اساس بررسی‌های صورت گرفته با میکروسکوپ الکترونی و سایر روش‌های بیوفیزیکی Low-resolution ترسیم شده است. LDL از این لحاظ منحصر به فرد است که تنها حاوی یک مولکول از یک نوع آپولیپوپروتئین (آپو B) است که به نظر می‌رسد گرداگرد سطح خارجی ذره به صورت یک حلقه پروتئینی پیچیده است. سایر لیپوپروتئین‌ها حاوی چندین مولکول آپولیپوپروتئین که اغلب انواع مختلفی دارند، می‌باشند.

میکروسکوپ الکترونی بررسی می‌گردد. چنین مطالعاتی می‌توانند به شرح جزئیات این امر بپردازند که چگونه ذرات LDL ابتدا به سطح سلول‌ها در محل ذرات اندوسیتوزی پوشیده از کلاترین متصل و سپس در حین فرو رفتن و جوانه زدن از غشای به منظور تشکیل وزیکول پوشش‌دار به صورت متصل به حفرات پوشش‌دار باقی بمانند و سرانجام به اندوزوم‌ها منتقل گردند (شکل ۲۶ـ۱۴ را ملاحظه کنید).



▲ **شکل تجربی ۲۸ـ۱۴ آزمایش pulse-chase نسبت‌های پیش‌ساز به محصول در زمان‌های مختلف پس از برداشت LDL.** سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان سالم موجود در محیط کشت در یک محیط حاوی LDL-I^{125} به مدت ۲ ساعت در ۴°C انکوبه شدند (pulse) و سپس سلول‌هایی که به LDL-I^{125} امتصل نشده بودند را شستند تا بتوانند زمان را در غیاب LDL خارجی مشخص کنند و بعد از آن سلول‌ها را در ۳۷°C انکوبه کردند (chase). مقادیر LDL-I^{125} متصل به سطح سلول، وارد شده به سلول و تجزیه شده (هیدرولیز شده) اندازه‌گیری شد. فرایند اتصال و نه ورود به سلول یا هیدرولیز apoB-100 از LDL در طی قرار گرفتن در دمای ۴°C صورت می‌گیرد. داده‌ها نشان‌دهنده سرعت بالای ناپدید شدن LDL-I^{125} از سطح سلول در طی ورود آن به سلول پس از گرم شدن سلول است که به غشای اجازه نقل و انتقال می‌دهد. پس از یک مکث ۱۵ـ۲۰ دقیقه‌ای، تجزیه لیزوزومی محتویات LDL-I^{125} وارد شده به سلول صورت می‌پذیرد.

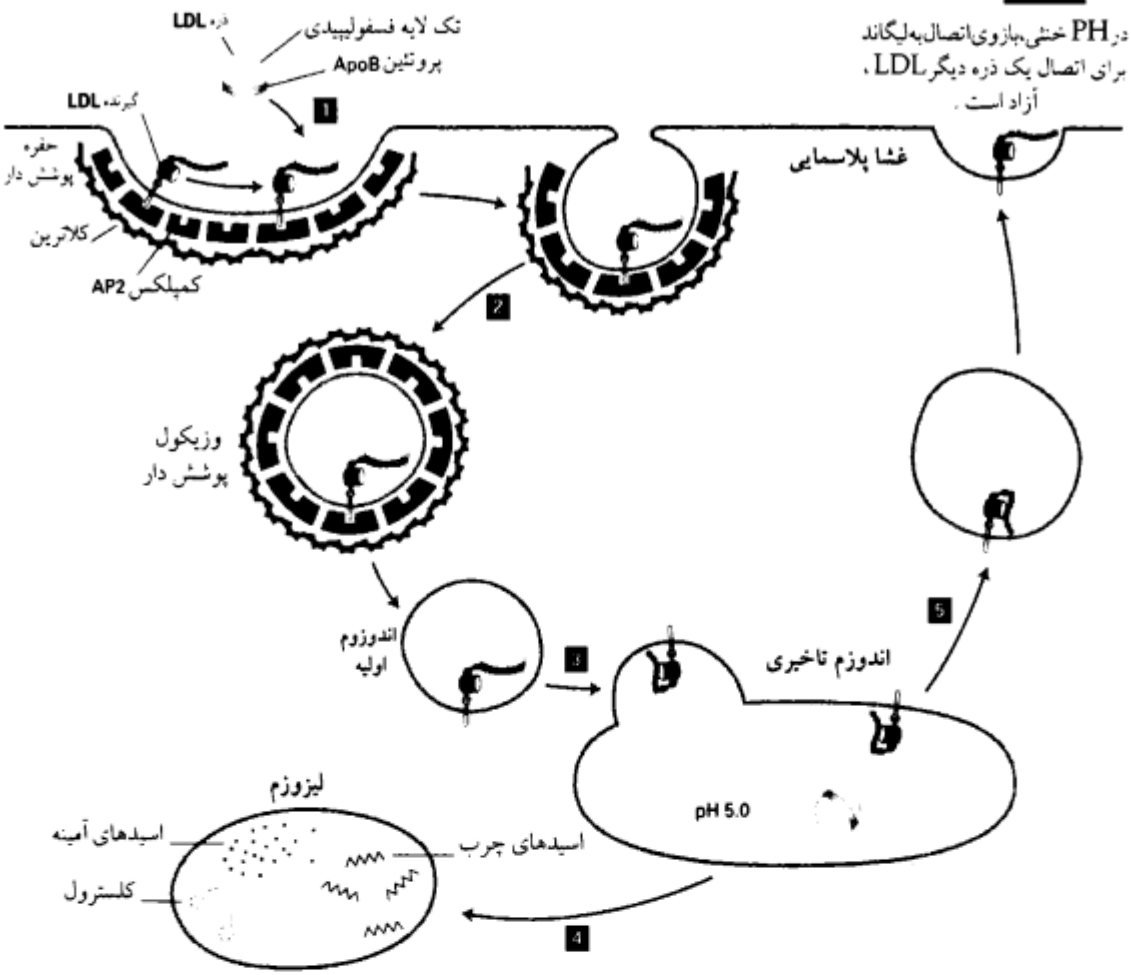
گیرنده‌های لیپوپروتئین با چگالی کم و سایر لیگاندها، حاوی پیام‌های دسته‌بندی هستند که سبب هدایت آنها به مسیر اندوسیتوز می‌شود

کلید فهم نحوه اتصال ذرات LDL به سطح سلول و ورودشان به داخل وزیکول‌های اندوسیتوزی با کشف گیرنده LDL (LDLR) روشن گردید. گیرنده LDL، گلیکوپروتئینی دارای ۸۳۹ ریشه است که یک بخش غشاگذر دارد. این پروتئین‌ها دارای یک قطعه C ترمینال سیتوزولی کوتاه و یک قطعه N ترمینال بلند خارج سلولی است که حاوی یک **دُمین ملخ‌شکل** ـ β[1] و یک دُمین اتصال به لیگاند است. هفت تکرار غنی از سیستئین، دُمین اتصال به لیگاند را تشکیل می‌دهند که با مولکول apoB-100 در یک ذره LDL برهمکنش می‌کند. شکل ۲۹ـ۱۴ نشان می‌دهد که چگونه پروتئین‌های گیرنده LDL ورود ذرات LDL را توسط آندوسیتوز با واسطه گیرنده تسهیل می‌کنند. پس از ورود LDL به سلول و رسیدن به لیزوزوم‌ها، پروتئازهای لیزوزومی، آپولیپوپروتئین‌های موجود در سطح LDL و کلسترل استرازهای لیزوزومی، استرهای کلسترل موجود در مرکز LDL را هیدرولیز می‌کنند. پس از آن کلسترول غیر استریفیه آزاد، لیزوزم را ترک کرده و در سنتز غشاها یا مشتقات‌مختلف کلسترول در سلول به‌کار گرفته می‌شود.

کشف گیرنده LDL و فهم چگونگی عملکرد آن با مطالعه سلول‌های افراد دارای بیماری هیپرکلسترولمیای خانوادگی (FH) حاصل شد. FH یک بیماری ارثی است که به واسطه افزایش غلظت کلسترول LDL در پلاسما مشخص می‌گردد. اکنون می‌دانیم که علت آن به دلیل وقوع جهش‌هایی در ژن LDLR است. در بیمارانی که یک کپی سالم و یک کپی معیوب از ژن LDLR را دارند (هتروزیگوت هستند)، کلسترول LDL خون در حد دو برابر حالت عادی افزایش یافته است. در بیمارانی که هر دو کپی ژن LDLR معیوب است (هموزیگوت) کلسترول LDL حدود چهار تا شش برابر بیشتر از افراد سالم است. در هتروزیگوت‌های FH معمولاً بیماری‌های قلبی ـ عروقی حدود ۱۰ سال زودتر از افراد نرمال اتفاق می‌افتد و هموزیگوت‌های FH معمولاً قبل از رسیدن به اواخر دهه دوم زندگیشان بر اثر حملات قلبی می‌میرند.

دسته‌ای از جهش‌های مربوط به ژن کدکننده گیرنده LDL سبب بیماری هیپرکلسترولمیای خانوادگی می‌شوند. برخی جهش‌ها مانع سنتز پروتئین LDLR می‌شوند و سایر جهش‌ها مانع تاخوردگی درست پروتئین گیرنده در ER شده که منجر به تجزیه زودرس آن می‌شود (فصل ۱۳)؛ و برخی دیگر از جهش‌ها توانایی گیرنده LDL برای اتصال محکم به LDL را کاهش می‌دهند. یک گروه ویژه از گیرنده‌های جهش یافته ناکارآمد که در سطح سلول بیان می‌شوند، می‌توانند به‌طور عادی به LDL متصل شوند، اما قادر به وساطت ورود LDL متصل به درون سلول نمی‌باشند. افرادی که چنین نقصی دارند، گیرنده‌های غشای پلاسمایی مربوط به سایر لیگاندها به‌طور نرمال مواد را به سلول وارد می‌کنند، اما گیرنده جهش یافته LDL به حفرات پوشش‌دار برنمی‌گردد. بررسی چنین گیرنده‌های جهش یافته و سایر گیرنده‌های جهش یافته LDL که در آزمایشگاه سنتز شده و در فیبروبلاست‌ها بیان می‌گردند، نشان می‌دهد که یک موتیف چهار ریشه‌ای در بخش سیتوزولی گیرنده

1- β-propler domain



▲ **شکل ۲۹ـ۱۴ مسیر اندوسیتوزی برای ورود لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) به سلول.** مرحله ❶: گیرنده‌های LDL در سطح سلولی با پروتئین آپو B که سطح خارجی فسفولیپیدها را در ذرات LDL احاطه کردند، متصل می‌شوند. برهمکنش میان پیام دسته‌بندی NPXY دنباله سیتوزولی گیرنده LDL و کمپلکس AP2 سبب می‌شود که کمپلکس لیگاند ـ گیرنده برای تشکیل وزیکول‌های اندوسیتوزی، آماده گردد. مرحله ❷: حفرات (یا جوانه‌های) پوشیده از کلاترین حاوی کمپلکس‌های گیرنده ـ LDL توسط فرایندی با مکانیسم مشابه مکانیسم وساطت شده توسط دینامین که در تشکیل وزیکول‌های کلاترین / AP1 بر روی سطح شبکه ترانس‌گلژی می‌شود، از غشای جدا می‌شوند (شکل ۱۹ـ۱۴ را ملاحظه‌کنید). مرحله ❸: پس از تخریب پوشش وزیکولی، وزیکول اندوسیتوزی فاقد پوشش (اندوزوم اولیه) با اندوزوم تأخیری ادغام می‌شود. pH اسیدی این بخش سبب تغییر ساختمان فضایی در گیرنده LDL می‌شود که نتیجه آن آزاد شدن ذرات LDL متصل است. مرحله ❹: اندوزوم تأخیری با لیزوزوم ادغام می‌شوند و پروتئین‌ها و لیپیدهای ذره LDL آزاد، توسط آنزیم‌های موجود در لیزوزوم به اجزاء پایدار خود می‌شکنند. مرحله ❺: گیرنده LDL به سطح سلول برمی‌گردد و در آنجا تحت اثر pH خنثی محیط خارجی دچار تغییرات ساختمان فضایی می‌شود که آن را قادر به اتصال به ذره LDL دیگر می‌کند.

وجود دارد که برای ورود به سلول حیاتی است: Asn-Pro-X-Tyr که X می‌تواند هر اسید آمینه‌ای باشد. این **پیام دسته‌بندی NPXY**[1] به کمپلکس AP2 می‌چسبد و سبب اتصال پوشش کلاترین/AP2 به قطعه سیتوزولی گیرنده LDL در حفرات پوشش‌دار می‌شود. جهش در یکی از ریشه‌های مرتبط با پیام NPXY، توانایی گیرنده LDL را برای ورود به حفرات پوشش‌دار از میان می‌برد.

در تعداد اندکی از افرادی که نشانه‌های معمول مرتبط با بیماری هیپرکلسترولمیای خانوادگی را نشان می‌دهند، گیرنده‌های LDL نرمال تولید می‌شود. در این افراد، ژن کدکننده زیرواحد AP2 پروتئین متصل‌شونده به پیام دسته‌بندی NPXY معیوب می‌باشد. در نتیجه، گیرنده‌های LDL نمی‌توانند در ساختمان وزیکول‌های کلاترین/AP2 وارد شوند و اندوسیتوز ذرات LDL صورت نمی‌گیرد. بررسی افراد دچار این بیماری ژنتیکی، اهمیت پروتئین‌های آداپتور را در پدیده نقل و انتقالات وابسته به

1- NPXY sorting signal

وزیکول‌های کلاترین پروتئین‌ها پُررنگ می‌کند.

مطالعه جهش‌های مختلف نشان می‌دهند که سایر گیرنده‌های سطح سلول می‌توانند به وسیله یک پیام دسته‌بندی متفاوت به سمت حفرات در حال تشکیل کلاترین / AP2 هدایت شوند. این پیام دارای توالی Tyr-X-X-Φ است که X می‌تواند هر اسید آمینه‌ای باشد و Φ اسید آمینه حجیم آبگریز است. پیام **دسته‌بندی Tyr-X-X-Φ**[1] که در قسمت سیتوزولی پروتئین گیرنده وجود دارد، با یک شکاف ویژه در یک زیرواحد پروتئینی کمپلکس AP2 متصل می‌شود. به دلیل این‌که ریشه‌های Tyr و Φ این اتصال را وساطت می‌کنند، جهش در هر کدام از آنها سبب کاهش یا از بین رفتن توانایی گیرنده برای شرکت در ساختار حفرات پوشش‌دار کلاترین / AP2 می‌شود. اگر به پروتئین HA آنفلوانزا که در حالت عادی اندوسیتوز نمی‌شود، توسط تکنیک مهندسی ژنتیک این توالی چهار ریشه‌ای به بخش سیتوزولی آن اضافه گردد، HAهای جهش یافته به درون سلول وارد می‌شوند.

همان‌گونه که در مباحث قبلی‌مان هم یادآوری کردیم، این پیام دسته‌بندی مشابه سبب دخول پروتئین‌های غشایی به درون وزیکول‌های کلاترین/AP1 می‌شود که به واسطه اتصال به یکی از زیرواحدهای AP1 از شبکه ترانس‌گلژی جوانه می‌زنند (جدول ۲ـ۱۴). تمام این مشاهدات نشان می‌دهد که Tyr-X-X-Φ پیامی است که به‌طور وسیع برای هدف‌گیری پروتئین‌های غشایی به درون وزیکول‌های پوشیده از کلاترین به کار می‌رود.

در تعدادی از پروتئین‌های سطح سلول، سایر توالی‌ها (مثل Leu-Leu) یا مولکول‌هایی که به‌طور کوالان به یوبی‌کوئیتینه متصلند، می‌توانند به عنوان پیام اندوسیتوز عمل کنند. در سایر پروتئین‌های متصل‌شونده به وزیکول‌های AP2 / کلاترین، تعدادی از آنها دارای دُمین‌هایی هستند که به‌طور اختصاصی به یوبی‌کوئیتین متصل می‌شوند که در این مورد فرض بر این است که این پروتئین‌های متصل به وزیکول، ورود انتخابی پروتئین‌های غشایی یوبی‌کوئیتینه شده را به درون وزیکول‌های اندوسیتوزی وساطت می‌کند. همان‌طور که قبلاً شرح دادیم، یوبی‌کوئیتین متصل به پروتئین‌های غشایی اندوسیتوزشونده در مرحله پایانی مسیر اندوسیتوزی شناسایی می‌گردد و نقش انتقال این پروتئین‌ها را به درون لیزوزوم (جایی که در آنجا پروتئین‌ها تجزیه می‌گردند) بازی می‌کند.

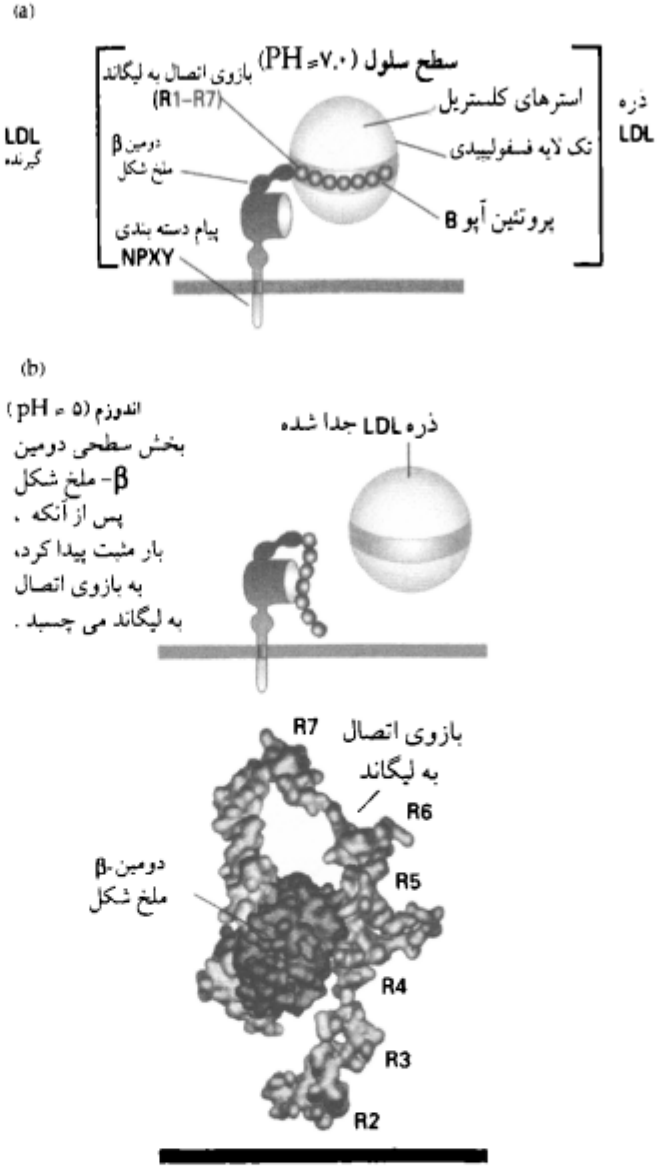
pH اسیدی اندوزوم‌های تأخیری سبب تفکیک شدن تعدادی از کمپلکس‌های گیرنده ـ لیگاند می‌شود

سرعت کلی فرایند دخول غشای پلاسمایی به داخل سلول طی مسیر اندوسیتوز بسیار بالاست: فیبروبلاست‌های کشت داده شده به‌طور منظم ۵۰ درصد پروتئین‌ها و لیپیدهای سطح سلول را در هر ساعت به درون فرو می‌برند. اکثر گیرنده‌های سطح سلول که تحت تأثیر اندوسیتوز واقع می‌شوند، به‌طور مکرر لیگاندهایشان را به درون سلول برده و در آنجا متراکم می‌کنند، سپس آنها را به غشای پلاسمایی بازمی‌گردانند و دوباره ورود مولکول‌های لیگاند را به درون سلول وساطت می‌کنند. برای مثال گیرنده LDL هر ۱۰ـ۲۰ دقیقه یک بار گردش لیگاند را به داخل و خارج سلول انجام می‌دهد. بنابراین در دوره عمر ۲۰ ساعت خود، چندین هزار گردش را انجام می‌دهد. کمپلکس‌های لیگاند ـ گیرنده وارد شده به سلول، به‌طور مشترک مسیر ترسیم شده برای گیرنده M6P در شکل ۲۲ـ۱۴ و برای گیرنده LDL در شکل ۲۹ـ۱۴ را دنبال می‌کنند. گیرنده‌های اندوسیتوز شده سطح سلول، به‌طور معمول در داخل اندوزوم تأخیری از لیگاندشان جدا می‌شوند که به صورت وزیکول‌های کروی با غشاهای لوله‌ای‌شکل و شاخه‌دار دیده می‌شوند که از سطح سلول چند میکرومتر فاصله دارند. آزمایشات اولیه‌ای که منجر به شناسایی وزیکول اندوزوم تأخیری شدند، از گیرنده آسیالوگلیکو پروتئین استفاده نمودند. این پروتئین مختص کبدی اتصال و ورود گلیکوپروتئین‌های غیر عادی را به درون سلول وساطت می‌کند که در این گلیکوپروتئین‌های غیر عادی، اولیگوساکاریدها نسبت به حالت عادی که به اسید سیالیک ختم می‌شوند، به گالاکتوز ختم شده‌اند و بنابراین به آنها آسیالوگلیکوپروتئین می‌گویند. بررسی سلول‌های کبدی با میکروسکوپ الکترونی که به آنها آسیالوگلیکو پروتئین تزریق شده است، نشان می‌دهد که ۵ـ۱۰ دقیقه پس از ورود به سلول، مولکول‌های لیگاند در **بخش مرکزی**[2] اندوزوم‌های تأخیری یافت می‌شوند در حالی که لوله‌های غشایی وسیع غنی از گیرنده و به میزان بسیار کمتری لیگاند است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اندوزوم تأخیری، اندامکی است که در آن گیرنده‌ها و لیگاندها از هم جدا می‌شوند.

تفکیک کمپلکس‌های لیگاند ـ گیرنده در اندوزوم‌های تأخیری، تنها در مسیر اندوسیتوزی رخ نمی‌دهد، بلکه در مسیر حمل آنزیم‌های محلول لیزوزومی به وسیله مسیر ترشحی هم صورت می‌گیرد (شکل ۲۲ـ۱۴ را ملاحظه کنید). همان‌طور که در فصل ۱۱ بیان شد، غشای اندوزوم‌های تأخیری و لیزوزوم‌ها، حاوی پمپ‌های

1- Try-X-X-Φ sorting signal

2- Lumen



◀ شکل ۳۰-۱۴ مدلی از اتصال وابسته به pH ذرات LDL به گیرنده LDL تصویر شماتیک گیرنده LDL در pH خنثی در سطح سلول (a) و در pH اسیدی در محیط داخلی اندوزوم تأخیری قرار می‌گیرد (b). (a) در سطح سلول، آپو B-100، موجود بر سطح یک ذره LDL به‌طور محکم به گیرنده متصل می‌شود. در تکرارهای هفت‌گانه (R7-R1) موجود در بازوی‌اتصال لیگاند، به نظر می‌رسد که R5R4 برای اتصال LDL حیاتی‌تر باشند. (b، بالا) درون اندوزوم، ریشه هیستیدین در دُمین β ملخ‌شکل گیرنده LDL، پروتونه می‌شود. بخش ملخ‌شکل دارای بار مثبت، با تمایل بالایی به بازوی اتصال به لیگاند که حاوی ریشه‌های با بار منفی است، متصل می‌شود و سبب آزادی ذره LDL می‌گردد. (b، پایین). آزمایشات چگالی الکترون و $C\alpha$، مدلی از ناحیه خارج سلولی گیرنده LDL را در pH=۵/۳ بر اساس آنالیز تصاویر کریستالی حاصل از اشعه X ترسیم کرده است. در این کنفورماسیون برهمکنش‌های یونی و آبگریز وسیع، میان β ملخ‌شکل و تکرارهای R5R4 صورت می‌گیرد.

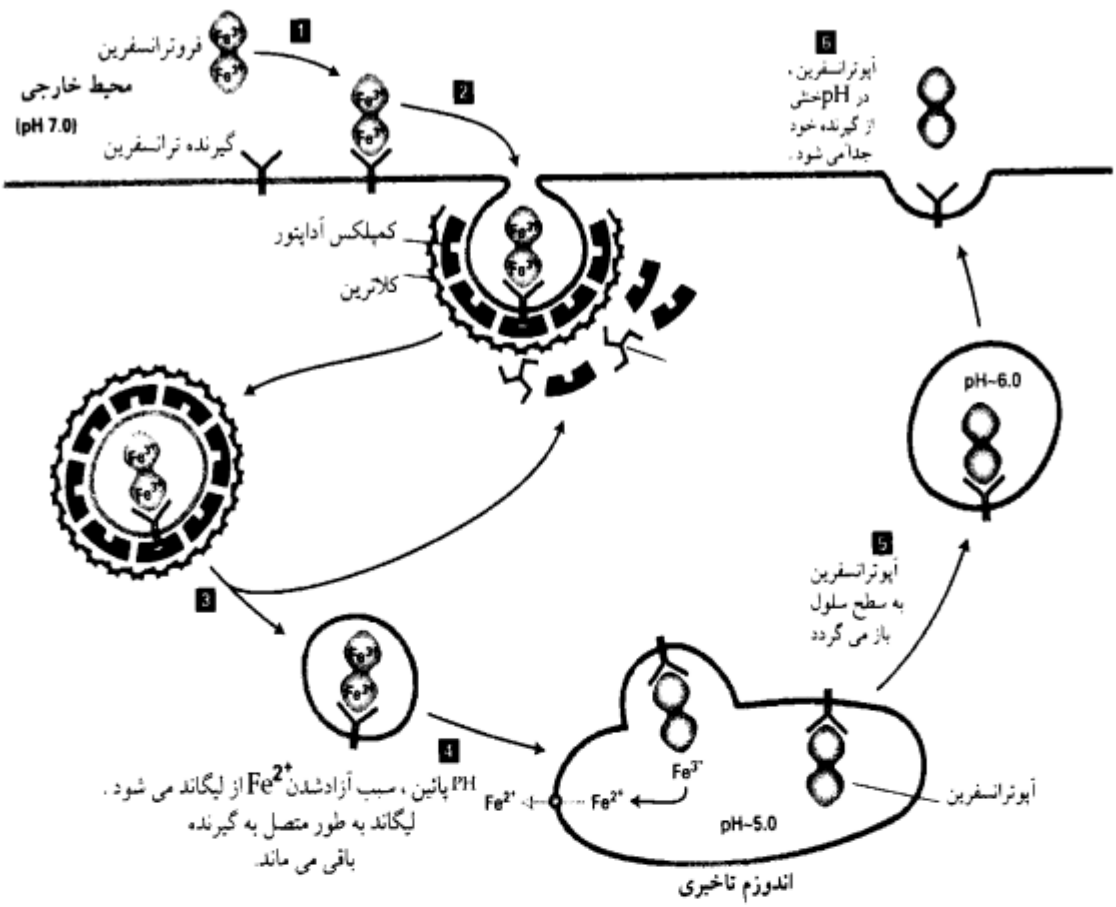
پروتونی کلاس V است که به همراه کانال‌های Cl^- در حفظ اسیدیته لومن وزیکول نقش دارند (شکل ۱۳-۱۱ را ملاحظه کنید). اکثر گیرنده‌ها، شامل گیرنده M6P و گیرنده‌های سطح سلول برای ذرات LDL و آسیالوگلیکوپروتئین، در pH خنثی به‌طور محکم به لیگاندشان می‌چسبند، اما اگر pH از ۶/۰ یا کمتر از آن کاهش یابد، لیگاندشان را رها می‌کنند.

اندوزوم تأخیری اولین وزیکولی است که در آن کمپلکس‌های گیرنده ـ لیگاند تحت اثر محیط اسیدی قرار گرفته و تفکیک اکثر گیرنده‌های اندوسیتوز شده از لیگاندهایی که به‌طور محکم به آن چسبیده‌اند، شروع می‌شود.

مکانیسمی که توسط آن گیرنده LDL از ذرات LDL متصل به آن جدا می‌شود، هم‌اکنون با جزئیات دقیقی مورد بررسی قرار گرفته است (شکل ۳۰-۱۴). در pH ۵/۵-۵/۰ اندوزومی، ریشه‌های هیستیدین در دُمین βـ ملخ شکل گیرنده، پروتونه شده و جایگاهی را تشکیل می‌دهند که می‌تواند با تمایل بالا به بارهای منفی توالی‌های تکراری در دُمین اتصال به لیگاند متصل شوند. این برهمکنش درون مولکولی، توالی‌های تکراری را در ساختمان فضایی قرار می‌دهد که به‌طور همزمان نمی‌توانند به آپو B-100 هم متصل شوند، بنابراین سبب آزادی ذره LDL متصل شده می‌گردد.

مسیر اندوسیتوزی آهن را بدون آن‌که کمپلکس ترانسفرین ـ گیرنده در اندوزوم‌ها تفکیک گردد به سلول‌ها منتقل می‌کند

مسیر اندوسیتوزی مربوط به گیرنده ترانسفرین و لیگاندش با مسیر LDL که در آن کمپلکس لیگاند ـ گیرنده در اندوزوم‌های



▲ **شکل ۱۴ـ۳۱ چرخه ترانسفرین که در تمام سلول‌های در حال رشد پستانداران صورت می‌گیرد.** مرحله ❶: دیمرترانسفرین، در حالت متصل به دو اتم Fe^{3+}، فروترانسفرین نامیده می‌شود که در این حالت به گیرنده ترانسفرین در سطح سلول اتصال می‌یابد. مرحله ❷: برهمکنش میان دم‌گیرنده ترانسفرین و کمپلکس آداپتور AP2، کمپلکس لیگاند ـ گیرنده را به درون وزیکول‌های با پوشش کلاترینی وارد می‌کند. مراحل ❸ و ❹: پوشش وزیکولی می‌ریزد و وزیکول‌های اندوسیتوزی با غشای اندوزوم ادغام می‌گردند. Fe^{3+} در محیط اسیدی اندوزوم تأخیری از کمپلکس گیرنده ـ فروترانسفرین رها می‌گردد. مرحله ❺: پروتئین آپوترانسفرین در این pH به گیرنده خود به حالت متصل باقی می‌ماند و با هم به سطح سلول باز می‌گردند. مرحله ❻: pH خنثی محیط خارجی سبب آزاد شدن آپوترانسفرین فاقد آهن می‌شود.

تأخیری از هم تفکیک نمی‌گردند، متفاوت است. با وجود این، تغییرات pH نیز هدف‌گیری گیرنده‌ها و لیگاندها را در مسیر ترانسفرین وساطت کرده و سبب حمل آهن به سلول‌ها می‌گردند.

ترانسفرین یک گلیکوپروتئین مهم در خون می‌باشد که آهن را از کبد (جایگاه مهم ذخیره آهن در بدن) و از روده (جایگاه جذب آهن) به تمامی سلول‌های بافت‌ها منتقل می‌کند. شکل بدون آهن آن آپوترانسفرین است که به‌طور بسیار محکمی به دو یون Fe^{3+} متصل می‌شود و فروترانسفرین تشکیل می‌دهد. تمام سلول‌های پستانداران حاوی گیرنده‌های سطح سلولی برای ترانسفرین هستند که این گیرنده‌ها در pH خنثی به طور محکم به فروترانسفرین می‌چسبد و پس از آن فروترانسفرین متصل به گیرنده به سمت اندوسیتوز پیش می‌رود. مانند محتویات یک ذره LDL، دو اتم Fe^{3+} متصل شده در سلول باقی می‌مانند اما بخش آپوترانسفرینی لیگاند از گیرنده جدا نمی‌شود و چند دقیقه بعد اندوسیتوز می‌گردد و آپوترانسفرین از سلول ترشح می‌شود.

مراحل نشان داده شده در شکل ۱۴ـ۳۱، رفتار کمپلکس لیگاند ـ گیرنده ترانسفرین را شرح می‌دهد که مرتبط با توانایی منحصر به فرد آپوپروتئین است که در pH ۵/۵ـ۵/۰، اندوزوم‌های تأخیری، به حالت متصل با گیرنده ترانسفرین باقی می‌ماند.

در pH کمتر از ۶/۰، دو اتم Fe^{3+} اتصال یافته از فروترانسفرین جدا می‌شوند و توسط یک مکانیسم ناشناخته به Fe^{2+} احیاء شده و سپس به واسطه یک انتقال‌دهنده اندوزومی ویژه برای یون‌های فلزی دو ظرفیتی، به درون سیتوزل وارد می‌شوند. کمپلکس گیرنده ـ آپوترانسفرین، پس از جدا شدن اتم‌های آهن به سطح سلول

برمی‌گردد. اگرچه آپوترانسفرین در pH ۵/۰ یا ۶/۰ به صورت محکمی به گیرنده‌اش متصل می‌شود، اما در pH خنثی به آن اتصال نمی‌یابد. بنابراین، آپوترانسفرین متصل زمانی که وزیکول‌های برگشتی، با غشای پلاسمایی ادغام شده و کمپلکس گیرنده ـ لیگاند با pH خنثی حاکم بر مایع بین سلولی یا محیط رشد، مواجه شود از گیرنده ترانسفرین جدا می‌شود. گیرنده‌های بازیافت شده برای اتصال به مولکول فروترانسفرین دیگر، آزاد می‌شوند و آپوترانسفرین آزاد شده توسط جریان خون به کبد یا روده رفته تا دوباره آهن‌دار شود.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۴

آندوسیتوز با واسطهٔ گیرنده

■ بعضی از لیگاندهای خارج سلولی که به گیرنده‌های ویژه‌ای بر روی سطح سلول وصل می‌شوند به داخل سلول وارد می‌گردند و وزیکولهای پوششی آنها علاوه بر کلاترین دارای پوشش AP2 نیز هستند.

■ پیامهای ویژه در دُمین سیتوزولی گیرنده‌های سطح سلولی، آنها را به حفره‌های پوشیده از کلاترین / AP2 برای ورود به سلول هدف‌گیری می‌کنند. پیامهای شناخته شده شامل Asn-Pro-X-Tyr، Try-X-X-Q و توالیهای Leu-Leu هستند (جدول ۲-۱۴ را ملاحظه کنید).

■ مسیر اندوسیتوزی بعضی از لیگاندها (مثل LDL) را به لیزوزومها وارد می‌کند که در آن تجزیه می‌شوند. وزیکول‌های انتقالی از سطح سلول در مرحله نخست با اندوزومهای تأخیری ادغام می‌شوند که در مرحله بعد با لیزوزوم ادغام می‌شوند.

■ بسیاری از کمپلکس‌های گیرنده - لیگاند در محیط اسیدی اندوزوم تأخیری از هم جدا می‌شوند؛ گیرنده‌ها به غشای پلاسمایی بازگشته در حالیکه لیگاندها وارد لیزوزومها می‌شوند (شکل ۲۹-۱۴ ملاحظه کنید).

■ آهن توسط مسیر آندوسیتوز وارد سلول‌ها می‌شود که در آن یونهای Fe^{3+} از فروترانسفرین به اندوزوم تأخیری آزاد می‌شوند. کمپلکس گیرنده - آپوترانسفرین دوباره به سطح سلول بازگشته و در آنجا از هم جدا می‌شوند که نتیجه آن استفاده مجدد از هر دو گیرنده و آپوترانسفرین می‌باشد.

۶-۱۴ هدایت پروتئین‌های غشایی و مواد سیتوزولی به سوی لیزوزوم

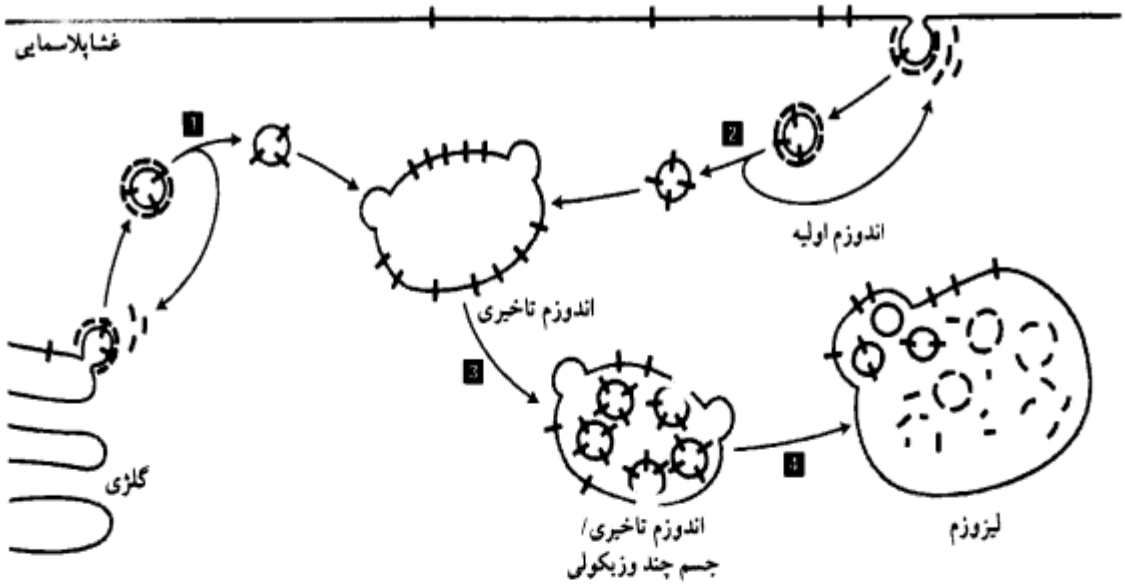
عمل اصلی لیزوزومها، تجزیه مواد خارج سلولی برداشت شده توسط سلول و محتویات داخل سلولی تحت شرایط مشخص می‌باشد. موادی که قرار است تجزیه شوند، باید به لومن لیزوزوم‌ها که دارای آنزیم‌های تجزیه‌کننده مختلف است، حمل گردند. همان‌طور که گفتیم، لیگاندهای اندوسیتوز شده‌ای (مثل LDL) که در اندوزوم تأخیری از گیرنده‌شان جدا شده‌اند، متعاقباً پس از ادغام غشای اندوزوم تأخیری با غشای لیزوزوم‌ها به لومن لیزوزومی وارد می‌شوند (شکل ۲۹-۱۴ را ملاحظه کنید). به این ترتیب، فاگوزوم‌های حمل‌کننده باکتری یا سایر ذرات ویژه می‌توانند با لیزوزوم ادغام شده و محتویاتشان را به منظور تجزیه شدن به درون لیزوزوم آزاد کنند.

واضح است که می‌توان توسط مکانیسم انتقال وزیکولی که در این فصل شرح دادیم، چگونگی حمل محتویات لومنی یک اندامک اندوزومی به سمت لومن لیزوزوم به منظور تجزیه شدن را نیز توضیح داد. با این حال نقل و انتقالات وزیکولی نمی‌تواند فرایند حمل پروتئین‌های غشایی یا مواد سیتوزولی را به سمت لومن لیزوزوم پاسخ‌دهی کند. همان‌طور که در این بخش دیدیم، سلول دارای دو مسیر تخصص یافتهٔ متفاوت برای حمل این وزیکول‌ها به داخل لیزوزومها برای تجزیه شدن دارد. مسیر اول که برای تجزیه پروتئین‌های غشایی اندوسیتوز شده به کار می‌رود و از نوع غیر معمولی از وزیکول‌ها استفاده می‌کند که به سمت لومن اندوزوم جوانه می‌زنند تا یک اندوزوم چند وزیکولی تولید کنند. مسیر دوم که تحت عنوان **اتوفاژی**[1] شناخته می‌شود شامل تشکیل ازنوی یک اندامک دارای غشای دوتایی است که اتوفاگوزوم نام دارد و مواد سیتوزولی از قبیل پروتئین‌های محلول سیتوزولی یا گاهی اندامک‌هایی از جمله پروکسیزوم‌ها یا میتوکندری‌ها را احاطه می‌کند. هر دو مسیر منجر به ادغام اندوزوم چندوزیکولی یا اتوفاگوزوم با لیزوزوم می‌شود که سبب تخلیه محتویات این اندامک‌ها به درون لومن لیزوزوم برای تجزیه شدن می‌گردد.

اندوزوم‌های چندوزیکولی، پروتئین‌های غشایی هدف‌گیری شده برای غشاهای لیزوزومی را از پروتئین‌های هدف‌گیری شده برای تجزیه لیزوزومی جدا می‌کنند

پروتئین‌های مقیم در لیزوزوم، مثل پمپ‌های پروتئین کلاس V و انتقال‌دهنده‌های اسیدهای آمینه می‌توانند اعمالشان را انجام داده و در غشای لیزوزومی باقی بمانند و ضمناً از تجزیه شدن توسط آنزیم‌های محلول لیزوزومی موجود در لومن محفوظ بمانند. این

1- Autophagy



▲ **شکل ۳۲ـ۱۴ (شکل رنگی) انتقال پروتئین‌های غشای پلاسمایی به درون لیزوزوم برای تجزیه.** اندوزوم‌های اولیه حامل پروتئین‌های غشای پلاسمایی اندوسیتوز شده (آبی) و وزیکول‌های حامل پروتئین‌های غشای لیزوزومی (سبز) از شبکه ترانس‌گلژی، با اندوزوم تأخیری ادغام شده و پروتئین‌های غشایی‌شان را به غشای اندوزوم منتقل می‌کنند (مراحل ❶و ❷). پروتئین‌های تفکیک شده از قبیل آنهایی که از اندوزوم اولیه آمده‌اند، در ساختار وزیکول‌هایی که به داخل محیط درونی اندوزوم تأخیری جوانه می‌زنند، شرکت می‌کنند و سرانجام یک اندوزوم چندوزیکولی را تشکیل می‌دهند که شامل تعداد زیادی از این وزیکول‌های داخلی است (مرحله ❸). ادغام یک اندوزوم چندوزیکولی به‌طور مستقیم با یک لیزوزوم، وزیکول‌های داخلی را به لومن لیزوزوم آزاد می‌کند و در آنجا این وزیکول‌ها تجزیه می‌شوند (مرحله ❹). دلیل این که پمپ‌های پروتونی و سایر پروتئین‌های غشای لیزوزوم، در حالت عادی به ساختار وزیکول‌های اندوزومی داخلی وارد نمی‌شوند، این است که آنها به غشای لیزوزومی حمل می‌شوند تا از تجزیه شدن محافظت گردند.

پروتئین‌ها توسط وزیکول‌های انتقالی که از شبکه گلژی‌ترانس توسط مکانیسم‌های اساسی مشابهی که در بخش‌های جلوتر شرح دادیم، جوانه می‌زنند و به غشای لیزوزومی انتقال می‌یابند. برعکس، پروتئین‌های غشایی اندوسیتوز شده از قبیل پروتئین‌های گیرنده‌ای که تفکیک شده‌اند، توسط یک مکانیسم انتقالی تخصص یافته به مقصد نهایی خود در محیط داخلی لیزوزوم، منتقل می‌گردند. تجزیه لیزوزومی گیرنده سطح سلول در پاسخ به مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی، یک مکانیسم مشترک برای کنترل حساسیت سلول‌ها به چنین پیام‌هایی است (فصل ۱۵). گیرنده‌های آسیب‌دیده هم برای تجزیه لیزوزومی هدف‌گیری می‌شوند.

شواهد اخیر مبنی بر این‌که غشاها هم می‌توانند به لومن بخش‌های مجزا منتقل شوند، توسط بررسی میکروگراف‌های الکترونی حاصل شده است که وزیکول‌های غشایی و بخش‌های غشایی را در داخل اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها نشان می‌دهند (شکل ۲۲ـ۹ را ملاحظه کنید). آزمایشات دیگری نیز به موازات این آزمایش‌ها در مخمر صورت گرفته که نشان می‌دهند پروتئین‌های گیرنده اندوسیتوز شده به واکوئل (اندامکی در مخمر که مطابق لیزوزوم است) هدف‌گیری می‌کنند که در آنجا بیش از آن‌که به غشاهای سطح واکوئل متصل شوند، به بخش‌های غشایی و وزیکول‌های کوچک موجود در بخش داخلی واکوئل می‌چسبند.

این یافته‌ها، پیشنهاد می‌کنند که پروتئین‌های غشایی اندوسیتوز شده می‌توانند به داخل وزیکول‌های ویژه‌ای وارد شوند که در غشای اندوزومی تشکیل شده‌اند (شکل ۳۲ـ۱۴). اگرچه این وزیکول‌ها از لحاظ اندازه و حضور در وزیکول‌های انتقالی به هم شبیهند، اما از لحاظ توپولوژیک با هم فرق دارند. وزیکول‌های انتقالی به طرف خارج از سطح غشای دهنده و به داخل سیتوزول جوانه می‌زنند، در حالی که وزیکول‌های اندوزومی به سمت داخل سطح غشای و به داخل لومن (دور از سیتوزول) جوانه می‌زنند. اندوزوم‌های بالغ حاوی تعداد زیادی وزیکول در بخش داخلی‌شان هستند که معمولاً اندوزوم‌های چندوزیکولی (یا اجسام) نامیده می‌شوند، همین‌طور که غشای احاطه کننده یک اندوزوم چند وزیکولی با غشای یک لیزوزوم ادغام می‌شود، وزیکول‌های داخلی آن و پروتئین‌های غشایی موجود در آنها به بخش داخلی لیزوزوم منتقل می‌شوند تا تجزیه گردند. بنابراین به این ترتیب دسته‌بندی پروتئین‌ها در داخل

غشای اندوزومی مشخص می‌کند که کدام‌یک از آنها در سطح لیزوزوم باقی بماند (مثل پمپ‌ها و انتقال‌دهنده‌ها) و کدام‌یک از وزیکول‌های داخلی رفته و سرانجام در لیزوزوم‌ها تجزیه خواهد شد.

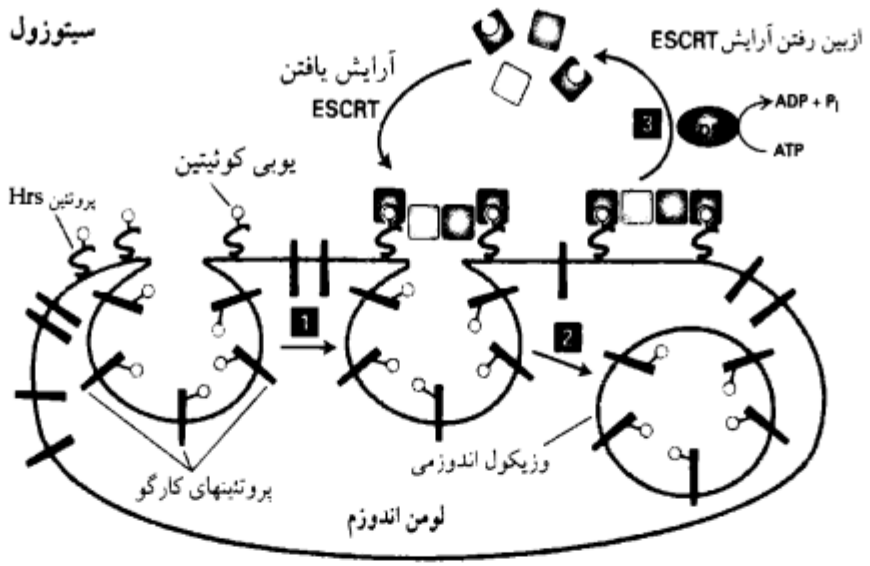
کثیر پروتئین‌هایی که برای جوانه زدن غشای اندوزومی به سمت درمخمر مورد نیازند، در ابتدا توسط بررسی جهش یافته‌ها در مخمر که مسیر انتقال پروتئین‌های غشایی به درون واکوئل مسدود شده بود، مشخص شدند. بیش از ۱۰ عدد از چنین پروتئین‌های «جوانه‌ای» در مخمر شناسایی شده‌اند که اغلب دارای تشابهات بارزی با پروتئین‌های پستانداران که در سلول‌ها همان عمل را انجام می‌دهند، می‌باشند. طرح مدل‌های واضح از جوانه‌های اندوزومی که تشکیل اندوزوم‌های چندوزیکولی در سلول‌های پستانداران می‌دهند، ابتدا به واسطه مطالعات صورت گرفته درمخمر، امکان‌پذیر گردید (شکل ۱۴-۳۳). اکثر پروتئین‌های کارگو که به اندوزوم چند وزیکولی وارد می‌شوند با یوبی‌کوئیتین به سطح غشای متصل می‌گردند. پروتئین‌های کارگویی که برای ورود به اندوزوم چند وزیکولی منظور شده‌اند، اغلب برچسب یوبی‌کوئیتین خود را ر غشای پلاسمایی TGN و یا غشای اندوزومی به دست می‌آورند. ما به‌طور کامل شرح دادیم که چگونه برچسب یوبی‌کوئیتین می‌تواند به عنوان پیامی برای تجزیه پروتئین‌های سیتوزولی یا پروتئین‌هایی با تاخوردگی نامناسب در ER به وسیله پروتئازم عمل کند (فصل‌های ۳ و ۱۳ را ملاحظه کنید). زمانی که برچسب یوبی‌کوئیتین به عنوان پیامی برای تجزیه پروتئازومی عمل می‌کند، معمولاً به صورت یک زنجیره از مولکول‌های یوبی‌کوئیتین که با اتصال کوالان به هم چسبیده‌اند، درمی‌آید (پلی‌یوبی‌کوئیتین)، در حالی که اگر به عنوان برچسبی برای ورود پروتئین به داخل اندوزوم چند وزیکولی بکار رود، معمولاً به شکل یک مولکول تنها (مونویوبیکوئیتین) خواهد بود. در غشای اندوزوم، یک پروتئین سطحی غشای که دارای برچسب یوبی‌کوئیتین بوده و تحت عنوان Hrs خوانده می‌شود، سبب تسهیل بارگیری پروتئین‌های کارگوی غشایی که به‌طور اختصاصی یوبی‌کوئیتینه شده‌اند به داخل جوانه‌های وزیکولی می‌شود که به سوی بخش داخل اندوزوم جهت‌گیری شده‌اند، سپس پروتئین Hrs یوبی‌کوئیتیته شده، دسته‌ای از سه کمپلکس پروتئینی متفاوت را به غشای بازمی‌گرداند. این پروتئین‌های ESCRT (کمپلکس دسته‌بندی اندزومی مورد نیاز برای انتقال) شامل پروتئین اتصال‌یابنده به یوبی‌کوئیتین است که Tsg101 نام دارد. پروتئین‌های ESCRT متصل به غشای در تکمیل وزیکول در حال جوانه زدن نقش دارند که منجر به آزادی وزیکول حامل کارگوی غشایی ویژه به درون اندوزوم‌ها می‌شود. سرانجام یک ATPase که تحت عنوان Vps4 شناسایی شده است، از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای جداسازی ESCRT استفاده می‌کند که منجر به آزادی آنها در سیتوزل و برای انجام یک دوره دیگر جوانه‌زنی می‌شود. در طی فرایند ادغام که یک وزیکول اندوزومی کامل شده از غشای جدا می‌شود، پروتئین‌های ESCRT و Vps4 عملی مشابه SNAREها و NSF در طی فرایند معمول ادغام غشایی که قبلاً شرح دادیم، ایفا می‌کنند (شکل ۱۰-۱۴ را ملاحظه کنید).

رتروویروس‌ها، به واسطه فرایندی مشابه با تشکیل اندوزوم‌های چندوزیکولی، از غشای پلاسمایی جوانه می‌زنند

وزیکول‌هایی که به داخل اندوزوم‌ها جوانه می‌زنند، از لحاظ توپولوژی مشابه ذرات ویروسی پوشش‌داری هستند که از غشای پلاسمایی سلول‌های آلوده به ویروس جوانه می‌زنند. به هر حال آزمایشات اخیر مشخص می‌کند که برای انجام هر دو نوع فرایند جوانه زدن از غشای، نیاز به گروه مشترکی از پروتئین‌ها می‌باشد. در حقیقت وجود چنین ارتباط تنگاتنگی میان جزئیات مکانیسمی این دو فرایند، پیشنهاد می‌کند که ویروس‌های پوشش‌دار، مکانیسم‌های تکامل یافته مربوط به بازیابی پروتئین‌های سلولی را که سبب جوانه زدن اندوزومی به سمت داخل می‌شود برای مقاصد خودشان به کار می‌گیرند.

ویروس نقص ایمنی در انسان (HIV) یک **رتروویروس** پوشش‌دار است که توسط یک فرایند وابسته به **پروتئین Gag**[1] ویروسی، از غشای پلاسمایی سلول‌های آلوده جوانه می‌زند که این پروتئین یکی از محتویات ساختاری اصلی ذرات ویروسی کامل شده می‌باشد. پروتئین Gag به غشای پلاسمایی یک سلول آلوده می‌چسبد و حدود ۴۰۰۰ عدد از این مولکول‌های Gag در کنار هم پلیمریزه شده و یک پوسته کروی‌شکل را تشکیل می‌دهند که ساختاری را ایجاد می‌کند که شبیه یک جوانه وزیکولی بوده و به سمت خارج از غشای پلاسمایی در حال برآمدگی است. مطالعات انجام شده بر روی HIVهای جهش یافته نشان داده‌اند که قطعه N ترمینال پروتئین Gag، برای اتصال به غشای پلاسمایی لازم است، در حالی که قطعه C- ترمینال برای جدا شدن ذرات HIV کامل شده از غشای ضروری است. برای مثال اگر قسمتی از ژنوم ویروسی کدکننده انتهای

1- Gag protein



▲ **شکل ۳۳-۱۴ مدلی از مکانیسم تشکیل اندوزوم‌های چندوزیکولی.** طی فرایند جوانه زدن اندوزومی Hrs یوبی‌کوئیتینه شده به روی غشای اندوزومی، بارگیری پروتئین‌های غشایی کارگوی خاص (آبی) را به درون جوانه‌های وزیکولی هدایت کرده و سپس ESCRT سیتوزولی را به غشای برمی‌گرداند (مرحله ❶). یادآوری می‌کنیم که هم Hrs و هم پروتئین‌های کارگوی بازیافت شده به یوبی‌کوئیتین چسبیده‌اند. پس از اتصال دسته‌ای از کمپلکس‌های ESCRT و وساطت نمودن ادغام و انفصال وزیکول کامل شده (مرحله ❷)، توسط ATP از Vps4 از هم جدا شده و به سیتوزول برمی‌گردند (مرحله ❸).

پروتئین Gag برداشته شود، جوانه‌های HIV در سلول آلوده تشکیل خواهند شد اما پدیده قطع شدن صورت نمی‌گیرد و بنابراین ذرات ویروسی آزاد نمی‌شوند.

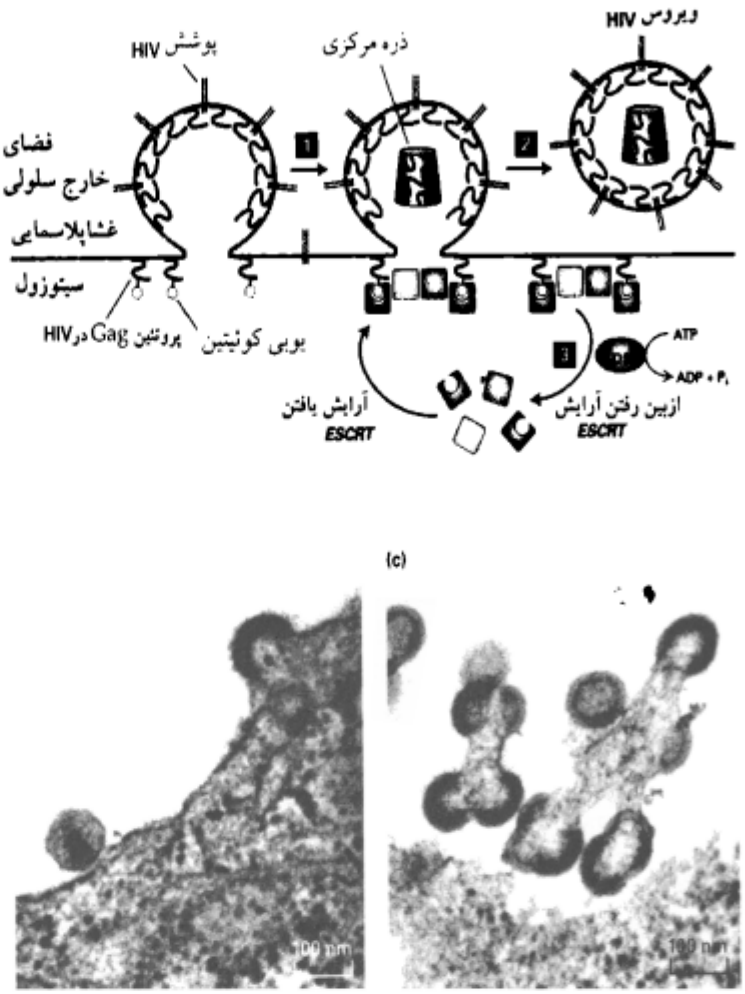
یافته‌های اولیه مبنی بر این‌که HIV در حال جوانه زدن از ماشین مولکولی مشابه با وزیکول‌های در حال جوانه زدن به درون اندوزوم استفاده می‌کنند، توسط مشاهداتی حاصل شد که بیان می‌کرد Tsg101، یک پروتئین ESCRT، به C- ترمینال پروتئین Gap می‌چسبد. مشاهدات بعدی، هماهنگی میان مکانیسم این دو فرآیند را به وضوح نشان دادند. برای مثال Gap به عنوان بخشی از فرایند جوانه‌زنی ویروس یوبی‌کوئیتینه می‌شود و در سلول‌های جهش یافته در Tsg101 یا Vps4، جوانه‌های ویروس HIV مشارکت دارند، اما نمی‌توانند از غشای جدا شوند (شکل ۳۴-۱۴). به این ترتیب هنگامی که یک قطعه از پروتئین Hrs سلولی به یک پروتئین Gag ناقص اضافه می‌شود، فرایند جوانه زدن و آزاد شدن ذرات ویروسی دوباره به صورت صحیح صورت می‌پذیرد. با کنار هم گذاشتن این نتایج، مشخص می‌شود که پروتئین Gag با تقلید کردن از عمل Hrs، ESCRT را دوباره به غشای پلاسمایی هدایت کرده و در آنجا در جوانه‌زنی ذرات ویروسی شرکت می‌کند.

سایر رتروویروس‌های پوشش‌دار از قبیل **ویروس لوکمیای تیره موشی**[1] و **ویروس سارکومای راس**[2] نیز برای جوانه زدن نیاز به کمپلکس‌های ESCRT دارند. با این حال به نظر می‌رسد که هر ویروس از مکانیسم متفاوتی برای بازگرداندن کمپلکس‌های ESCRT به جایگاه جوانه زدن ویروس، استفاده می‌کند.

مسیر اتوفاژی، پروتئین‌های سیتوزولی یا اندامک‌های کامل را به سوی لیزوزوم‌ها حمل می‌کنند

زمانی که سلول‌ها در برابر استرس‌هایی از جمله شرایط قحطی قرار می‌گیرند، قدرت این را دارند که ماکرومولکول‌ها را به عنوان مواد غذایی توسط فرایند تجزیه لیزوزومی که **اتوفاژی**[3] (خودخواری) نامیده می‌شود، بازیابی کنند. مسیر اتوفاژی شامل تشکیل یک ساختمان پهن دو غشایی با شکل شبیه جام است که ناحیه‌ای از سیتوزول یا کل یک اندامک را (مثل میتوکندری) می‌تواند احاطه کند و یک اتوفاگوزوم یا وزیکول اتوفاژی تشکیل دهد (شکل ۳۵-۱۴). غشای خارجی وزیکول اتوفاژی می‌تواند با لیزوزوم ادغام شده و یک وزیکول بزرگ را که توسط یک غشای لایه‌ای منفرد احاطه شده است

1- Murine leukemia virus
2- Rous sarcoma Virus
3- Autophagy



شکل ۱۴-۳۴ مکانیسم جوانه‌زنی HIV از غشای پلاسمایی. پروتئین‌های مورد نیاز برای تشکیل اندوزوم‌های چندوزیکولی به منظور جوانه زدن ویروس از غشای پلاسمایی، توسط HIV به‌کار گرفته می‌شوند. (a) جوانه زدن ذرات HIV از سلول‌های آلوده به HIV مشابه مکانیسمی که در شکل ۱۴-۳۳ نشان داده شده است، رخ می‌دهد که در طی آن، پروتئین Gag کد شده توسط ویروس ESCRT و Vps4 سلولی استفاده می‌شوند (مراحل ❶-❸). Gag یوبی‌کوئیتینه شده موجود در مجاورت ذره در حال جوانه زدن نقشی همانند Hrs ایفا می‌کند. برای شرح بیشتر به متن رجوع شود. (b) در سلول‌های تیپ وحشی آلوده به HIV، ذرات ویروسی از غشای پلاسمایی جوانه زده و به سرعت به داخل فضای خارج سلولی آزاد می‌شوند. (c) در سلول‌های فاقد پروتئین Tsg101 عملکردی از دسته ESCRTها، پروتئین Gag ویروسی ساختارهای متراکم ویروسی‌شکل را تشکیل می‌دهد، اما این ساختارها نمی‌توانند به‌طور کامل از غشای جوانه بزنند و زنجیره‌ای از جوانه‌های ویروسی که هنوز به غشای پلاسمایی متصل‌اند، تجمع می‌یابند.

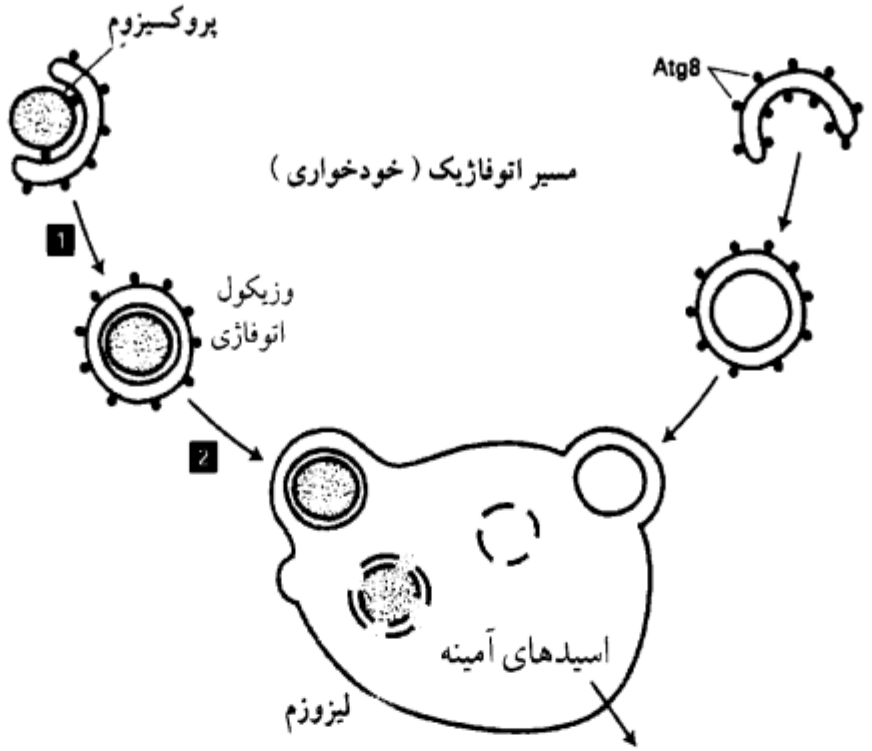
به داخل لیزوزوم برساند. مشابه وضعیتی که هنگام حمل اندوزوم‌های چندوزیکولی به لیزوزوم اتفاق می‌افتد لیپازها و پروتئازهای داخل لیزوزوم، وزیکول اتوفاژی و محتویات آن را به اجزاء مولکولی‌شان تجزیه می‌کند. سپس آمینواسید پرمئازهای موجود در غشای لیزوزوم، اسیدهای آمینه آزاد را به سیتوزول برمی‌گردانند تا در سنتز پروتئین‌های جدید مورد استفاده قرار گیرند.

به نظر می‌رسد که تشکیل و ادغام وزیکول‌های اتوفاژی طی سه مرحله انجام می‌شود. گرچه مکانیسم‌های اساسی برای هر کدام از این مراحل هنوز به خوبی شناسایی نشده‌اند، اما به نظر می‌رسد که با مکانیسم‌های پایه‌ای نقل و انتقالات وزیکولی شرح داده شده در این فصل مرتبط می‌باشد.

تشکیل وزیکول اتوفاژی: به نظر می‌رسد که وزیکول اتوفاژی از بخشی از غشای احاطه‌کننده اندامک منشأ می‌گیرد. اگرچه منشأ این غشای مشخص نیست، اما اکثر مطالعات پیشنهاد می‌کنند که وزیکول اتوفاژی در ابتدا از یک بخش ER مشتق می‌شود. اغلب به نظر می‌رسد که اتوفاژی یک فرایند غیر اختصاصی است که در آن بخشی از سیتوپلاسم به‌طور اتفاقی توسط یک اتوفاگوزم احاطه می‌گردد. در این حالت جایگاه تشکیل نیز احتمالاً به صورت اتفاقی است. در سایر موارد، اتوفاگوزوم‌ها، اندامک‌های ویژه‌ای را احاطه می‌کنند. برای مثال، در فرایندی که تحت عنوان **پکسوفاژی**[1] خوانده می‌شود، پراکسی‌زوم‌ها در زمانی که نیازی به آنها نیست، توسط غشای احاطه شده و تجزیه می‌گردند. در این حالات که اتوفاژی به صورت اختصاصی برای اندامک‌هاست، انواعی از پیام‌ها یا جایگاه‌های اتصال بر سطح اندامک باید وجود داشته باشد که آن را برای تشکیل وزیکول اتوفاژی هدف‌گیری کند.

رشد و تکمیل وزیکول اتوفاژی: به منظور رشد این اندامک جامی‌شکل، غشای‌های جدید باید به غشای اتوفاگوزوم حمل گردند. این رشد بسیار مشابه ادغام برخی از انواع وزیکول انتقالی با غشای اتوفاگوزوم می‌باشد. اگرچه منشأ چنین وزیکول‌هایی معلوم نیست، اما اندوزوم به عنوان یک داوطلب قوی مورد نظر است. برخی از

1- Pexophagy



▲ **شکل ۳۵ـ۱۴ مسیر اتوفاژی (خودخواری).** مسیر اتوفاژی سبب انتقال پروتئین‌های سیتوزولی و اندامک‌ها به محیط داخل لیزوزوم به منظور تجزیه شدن می‌گردد. در مسیر اتوفاژی، یک ساختار جامی‌شکل در اطراف بخشی از سیتوزول یا اندامکی از قبیل پروکسیزوم به همان صورتی که در شکل نشان داده شده است، تشکیل می‌گردد. اضافه شدن مداوم غشای منجر به تشکیل یک وزیکول اتوفاگوزوم می‌شود که محتویات خود را توسط دو غشای کامل می‌پوشاند (مرحله ❶). ادغام غشای خارجی با غشای لیزوزوم سبب آزادسازی یک وزیکول تک‌لایه و محتویاتش به درون لیزوزوم می‌شود (مرحله ❷). پس از تجزیه شدن پروتئین و لیپید توسط هیدرولازهای داخل لیزوزوم، اسیدهای آمینه آزاد شده از عرض غشای لیزوزوم به سیتوزل منتقل می‌شود. پروتئین‌های شناخته شده موجود در مسیر اتوفاژی شامل Atg8 است که یک ساختار پوشش‌مانند را در اطراف اتوفاگوزوم تشکیل می‌دهد.

پروتئین‌های شرکت‌کننده در تشکیل اتوفاگوزوم‌ها، طی غربال‌گری‌های ژنتیکی مخمرها به منظور جداسازی جهش یافته‌هایی که در پدیده اتوفاژی دچار نقص شده‌اند، شناسایی گردیدند. به نظر می‌رسد که یک زیر دسته از این پروتئین‌ها یک ساختار پوشش‌مانند را بر روی سطح اتوفاگوزوم تشکیل می‌دهند. یکی از این پروتئین‌ها Atg8 است که همان‌گونه که در شکل ۳۵ـ۱۴ نشان داده شده است، به‌طور کوالان‌به لیپید فسفاتیدیل اتانول‌آمین متصل شده و به این ترتیب به صفحه سیتوپلاسمی وزیکول اتوفاژیک اتصال می‌یابد. این پوشش به اتوفاگوزوم ساختار جامی شکل می‌دهد.

هدف‌گیری و ادغام وزیکول اتوفاژی: غشای خارجی اتوفاگوزوم تکمیل شده حاوی دسته‌ای از پروتئین‌هاست که سبب ادغام شدن با غشای لیزوزوم می‌شوند. دو پروتئین جدا شده از وزیکول برای ادغام اتوفاگوزوم با لیزوزوم ضروری هستند، اما در این ارتباط نقشی برای پروتئین‌های SNARE در نظر گرفته نشده است. ادغام اتوفاگوزوم با لیزوزوم، پس از جدا شدن Atg8 از غشای به واسطه قطع پروتئولیتیکی رخ می‌دهد و این مرحله پروتئولیز تنها یک بار و آن هم زمانی که وزیکول اتوفاژیک به صورت یک سیستم دو غشایی و محکم به‌طور کامل شکل گرفت صورت می‌پذیرد. بنابراین به نظر می‌رسد که پروتئین Atg8، پروتئین‌های ادغامی را فراهم می‌کند و مانع از ادغام زودرس اتوفاگوزوم با لیزوزوم می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۴

هدایت پروتئین‌های غشایی و مواد سیتوزولی به لیزوزوم

■ پروتئین‌های غشایی اندوسیتوز شده که برای تجزیه‌شدن دو لیزوزوم در نظر گرفته می‌شوند در وزیکولهایی شرکت می‌کنند که در سمت داخلی اندوزوم جوانه می‌زنند. اندوزوم‌های دارای چندین وزیکول، که حاوی بسیاری از این وزیکول‌های داخلی هستند،

می‌توانند با لیزوزوم‌ها ادغام شده و وزیکولها را به سمت داخلی لیزوزوم هدایت کنند (شکل ۳۲-۱۴ را ملاحظه کنید).

- بعضی از اجزای سلولی (مثل ESCRT) که جوانه‌زنی غشاهای اندوزومی را واسطه‌گری می‌کنند در جوانه‌زنی ویروسهای پوشش‌دار مثل HIV از غشای پلاسمایی سلولهای آلوده شده به ویروس استفاده می‌شوند (اشکال ۳۳-۱۴ و ۳۴-۱۴ را ملاحظه کنید).
- بخشی از سیتوپلاسم یا کل ارگانل (مثل پروکسیزوم) می‌تواند توسط یک غشایی پوشیده شود و در وزیکول‌های اتوفاژی دوغشایی مشارکت کند. ادغام غشای خارجی وزیکول با لیزوزوم محتویات پوشیده را به سمت داخل لیزوزوم برای تجزیه هدایت می‌کند (شکل ۳۵-۱۴ را ملاحظه کنید).

چشم‌اندازی به آینده

اطلاعات بیوشیمیایی، ژنتیکی و ساختاری که در این فصل آمده است نشان می‌دهد که ما هم اکنون یک درک پایه‌ای از این مطلب داریم که چگونه رفت و آمد پروتئین از یک بخش محصور در غشا به دیگری صورت می‌گیرد. اطلاعات ما در مورد این فرایند ها به میزان زیادی از آزمایشات صورت گرفته بر روی عملکرد انواع مختلف وزیکول‌های انتقالی حاصل شده است. این مطالعات منجر به شناسایی بسیاری از اجزاء وزیکولی و کشف این امر که چگونه این اجزا با هم کار می‌کنند تا جوانه زنی وزیکول انجام شود و چگونه دسته‌های صحیح از مولکول‌های کارگوی مولکول دهنده در این امر به کار گرفته می‌شوند و سپس چگونه الحاق یک وزیکول کامل نشده با غشا یک اندامک هدف وساطت می‌گردد.

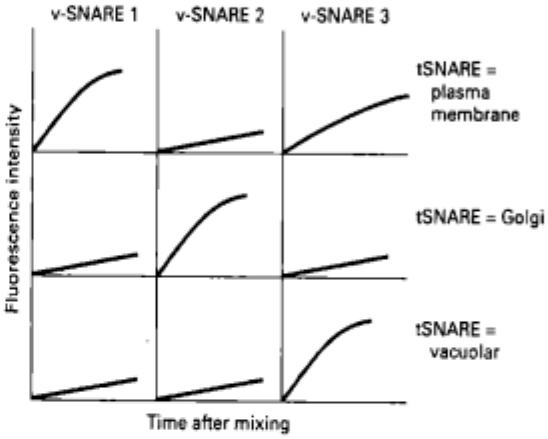
علیرغم چنین پیشرفت‌هایی در مورد مراحل مهم مسیرهای ترشحی و اندوسیتوزی، هنوز اطلاعات ما اندک است. به عنوان مثال، ما هنوز نمی‌دانیم که چه نوع پروتئین‌هایی پوشش‌های وزیکول‌های ترشح تنظیم شده یا پیوسته را که از شبکه ترانس گلژی جوانه می‌زنند تشکیل می‌دهند. به این ترتیب انواع پیام‌های موجود در پروتئین‌های کارگو که ممکن است آن ها را برای فشرده شدن به داخل وزیکول‌های ترشحی هدف‌گیری کنند هنوز مشخص نشده است. فرایند مجهول دیگر، تشکیل وزیکول‌هایی است که به خارج از سیتوزول جوانه می‌زنند از جمله وزیکول‌هایی که به اندوزوم‌های چند وزیکولی وارد می‌شوند، می‌باشد. اگرچه برخی از پروتئین‌هایی که در تشکیل این وزیکول‌های اندوزومی «داخلی» شرکت می‌کنند شناسایی شده‌اند، اما ما هنوز نمی‌دانیم که چه عواملی شکل آن ها را مشخص می‌کنند یا چه نوع فرایندی سبب می‌شود که آن ها از غشاهای دهنده کنده شوند. به طور مشابه منشأ و رشد غشای وزیکول اتوفاژی نیز به میزان بسیار کمی شناخته شده است. در آینده امکان تشریح این موارد و سایر مراحل رفت و آمد وزیکولی که به میزان بسیار کمی شناخته شده‌اند توسط به کارگیری روش‌های مشابه و قدرتمند ترکیبی بیوشیمیایی و ژنتیک فراهم می‌شود که ترسیمی از بخش‌های کاری وزیکول‌های COPI، COPII و وزیکول‌های کلاترین/ AP می‌باشد.

هنوز سؤالاتی در مورد مراحل انتقالی که به خوبی مشخص شده‌اند و شامل رفت و آمد وزیکولی میان ER و سیس گلژی، میان کیسه‌های گلژی و میان ترانس گلژی و اندوزوم هاست باقی مانده است. به ویژه اطلاعات ما در مورد چگونگی دسته‌بندی پروتئین ها میان این اندامک ها هنوز ناکامل است که علت آن، طبیعت پویای اندامک ها در طی مسیر ترشحی است. گرچه ما هم اکنون جزئیات بسیاری از چگونگی عملکرد اجزاء وزیکولی ویژه را می‌دانیم، اما نمی‌توانیم بیان کنیم که کدام یک از عملکردهای آنان برای مراحل ویژه در جریان کلی مراحل انتقال رفت و برگشت اختصاصی است. به عنوان مثال ما نمی‌توانیم شرح دهیم که چرا وزیکول‌های COPII به هم ملحق می‌شوند تا یک کیسه سیس ـ گلژی جدید را تشکیل دهند، در حالی که وزیکول‌های COPI با غشا ER ادغام می‌شوند. با توجه به اینکه به نظر می‌رسد هر دو نوع وزیکول حاوی دسته‌های مشابهی از پروتئین‌های v-SNARE هستند. در این راستا، ما نمی‌دانیم که چه ترکیبی از غشای گلژی حقیقتاً مشخص‌کننده وزیکول پوشیده COPI ای است که از یک جوانه پوشش‌دار کلاترین / AP جوانه می‌زند. در هر دو مورد، به نظر می‌رسد که اتصال پروتئین ARF به غشای گلژی، جوانه زدن وزیکول را آغاز می‌کند. حال این مسائل نیازمند یک فهم دقیق‌تر از جریان رفت و آمد وزیکولی در زمینه کل مسیر ترشحی است. بهبودی‌های اخیر در مشاهدات، توانایی به تصویر کشیدن انتقال وزیکولی پروتئین‌های کارگو را در سلول‌های زنده فراهم کرده و این امید را ایجاد می‌کند که برخی از جنبه‌های دقیق‌تر عملکرد وزیکول در آینده‌ای نزدیک روشن شود.

تجزیه و تحلیل داده ها

به منظور آزمایش نمودن ویژگی ادغام غشایی که توسط v-SNAREs و t-SNAREs‌های ویژه، لیپوزوم‌ها (غشاهای لیپیدی مصنوعی) حاصل شده است، به همراه آن ها کمپلکس‌های ویژه t-SNAREs یا v-SNAREs را به کار بردیم. به منظور اندازه‌گیری ادغام، لیپوزوم‌های v-SNAREs نیز حاوی یک لیپید فلورسنت در یک غلظت نسبتاً بالایی شدند که فلورسانس آن سفید شده است (سفید شدن، فلورسانس کاهش یافته‌ای مرتبط با آنچه که

انتظار داریم می‌باشد). در این مورد، سفید شدن به دلیل اینکه لیپیدهای فلورسنت بسیار غلیظ هستند و با توانایی سایرین در تحریک شدن تداخل می‌کنند، رخ می‌دهد. ادغام این لیپوزوم ها با انواعی که فاقد لیپید فلورسنت هستند، لیپیدهای فلورسنت آن ها رقیق شده و سفید شدن در آن ها کاهش یافته است. سه دسته از لیپوزوم ها با بکارگیری کملکس‌های t-SNARE مخمری تهیه شد: انواعی که حاوی t-SNAREs غشای پلاسمایی هستند، انواعی که t-SNAREs گلژی را دارند و انواعی که t-SNAREs واکوئلی را دارند. هر کدام از این سه لیپوزوم‌ها با لیپوزوم‌های فلورسنت حاوی یک یا سه v-SNAREs مختلف مخمری ادغام شدند و داده‌های زیر بدست آمد.



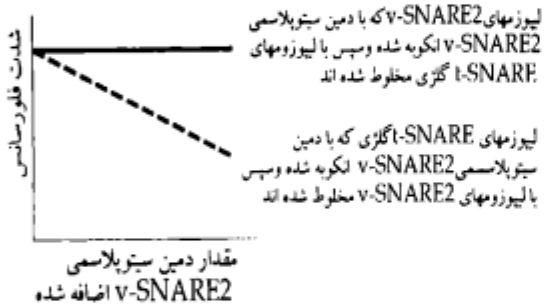
a. در مورد ویژگی وقایع ادغام شدن غشایی از این داده ها چه نتایجی را می‌توان استنباط نمود؟

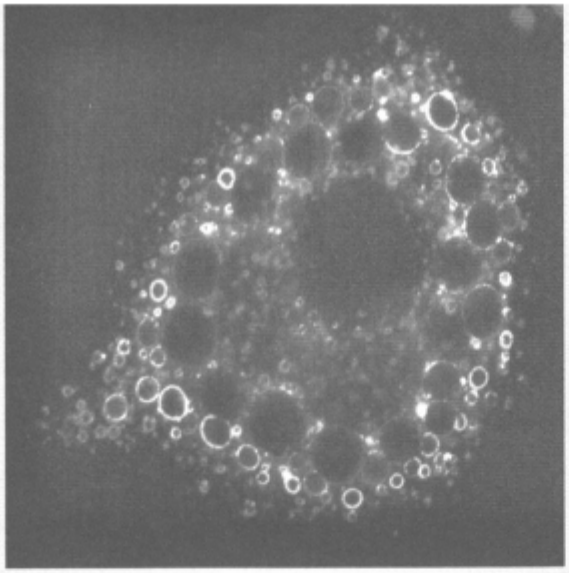
b. در چه محلی شما انتظار دارید که v-SNAREsهای ۱، ۲ و ۳ را در مخمر بیابید؟

c. چه نوع آزمایشی می‌توان طرح نمود که توسط آن مشخص کرد که چه محلی از مسیر ترشحی در یک v-SNAREs داده شده، در in vivo موردنیاز است؟

d. دُمین سیتوپلاسمی v-SNARE در E.coli بیان شده و از آن تخلیص گردیده است. مقادیر متفاوت از این دُمین را یک بار با لیپوزوم‌های t-SNARE گلژی و یک بار با لیپوزوم‌های v-SNARE2 انکوبه کردیم سپس لیپوزوم‌ها از پروتئین اتصال نیافته شسته شدند. سپس لیپوزوم‌های مختلف را با هم مخلوط کردیم به صورتی که در زیر نشان داده شده است و فلورسنت هر نمونه یک ساعت پس از مخلوط‌سازی، اندازه‌گیری شد.

چگونه می‌توان داده‌های به دست آمده را شرح داد؟ اگر مخمر، دُمین سیتوپلاسمی v-SNARE2 را به میزان زیادی بیان کند، شما نتیجه را چطور پیش گویی خواهید کرد؟





ذخیره و متابولیسم تری‌گلیسریدها توسط چندین هورمون مهم تنظیم می‌شود. این سلول آدیپوسیتی 3T3-L1 رنگ‌آمیزی شده برای سه پروتئینی است که قطرات چربی را در مراحل بلوغشان به هم مرتبط می‌کند. پری‌لیپین، آدیپوفیلین و T1P47 (به رنگ قرمز)

فصل ۱۵

پیام رسانی سلولی I

مسیرهای پیام رسانی و پاسخهای سلولی کوتاه مدت

رئوس مطالب

۱۵.۱ پیام خارج سلولی تا پاسخ سلولی

۱۵.۲ مطالعه گیرنده سطح سلول

۱۵.۳ عوامل فوق‌العاده حفاظت شده مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی

۱۵.۴ عوامل عمومی سیستم‌های گیرنده جفت شده با G - پروتئین‌ها

۱۵.۵ گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌هایی که کانال‌های یونی را تنظیم می‌کنند.

۱۵.۶ گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌هایی که آدنیلیل سیکلاز را فعال و یا مهار می‌کنند.

۱۵.۷ گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌هایی که فسفولیپاز G را فعال می‌کنند.

۱۵.۸ پاسخ‌های هماهنگ‌کننده سلول‌ها با اثرات محیطی

هیچ سلولی به تنهایی زندگی نمی‌کند؛ ارتباطات سلولی ویژگی بنیادی تمامی سلول‌ها می‌باشد، مضاف بر اینکه فعالیت‌ها و توانایی‌های هر موجود زنده‌ای را تشکیل می‌دهد. حتی موجودات تک سلولی قادر به ایجاد ارتباط با یکدیگر و یا با دیگر موجودات هستند. میکروارگانیسم‌های یوکاریوتیک نظیر مخمر، کپک‌های لعابی و پروتوزوآها از مولکول‌های ترشح‌شونده با نام **فرومون‌ها**[1] به منظور هماهنگی در تجمع سلول‌های آزاد زیست، برای تولید مثل جنسی و تمایز، تحت شرایط خاص محیطی استفاده می‌کنند. عوامل جفت‌گیری مخمر یک مثال کاملاً بجا از پیام‌رسانی سلول - سلول به واسطه‌ی فرومون هستند (فصل ۲۱). در گیاهان و جانوران، مهم‌تر ملکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی[2] هستند که در یک موجود به منظور کنترل متابولیسم قندها، چربی‌ها و اسیدهای آمینه، رشد و تمایز بافت‌ها، سنتز و ترشح پروتئین‌ها و علاوه بر این تشکیل مایعات داخل و خارج سلولی عمل می‌کنند. حیوانات نیز به بسیاری از پیام‌هایی که از محیطشان دریافت می‌کنند نظیر نور، اکسیژن، و... موجود در غذا، پاسخ می‌دهند.

بسیاری از مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی توسط سلول‌های پیام‌رسان در موجود زنده، سنتز و آزاد می‌شوند. در همه موارد، مولکول‌های پیام‌رسان پاسخ ویژه را فقط در سلول‌های هدف که برای مولکول‌های پیام‌رسان، گیرنده[3] دارند، ایجاد می‌کنند. انواع بسیاری از ترکیبات شیمیایی تحت عنوان پیام به کار می‌روند: از قبیل

1- Pheromones

2- Enteracellular signaling molecule

3- Receptor

مولکول‌های کوچک (برای مثال اسیدآمینه یا مشتقات لیپیدی، استیل کولین)، پپتیدها (برای مثال ACTH و وازوپریسین)، پروتئین‌های قابل حل (برای مثال: انسولین و هورمون رشد) و بسیاری از پروتئین‌های متصل به سطح سلول و یا ماتریکس خارج سلولی. اکثر گیرنده‌ها به یک مولکول پیام و یا گروهی از مولکول‌های کاملاً مرتبط متصل می‌شوند. تعدادی از مولکول‌های پیام‌رسان (به ویژه مولکول‌های آبگریز نظیر استروئیدها، رتینوئیدها و تیروکسین) به خودی خود از میان غشاء پلاسمایی منتشر شده و به گیرنده‌های داخل سلولی متصل می‌شوند. پیام‌رسانی از این گیرنده‌های داخل سلولی به طور مشروح در فصل ۷ بحث شده است.

تعدادی از مولکول‌های پیام‌رسان کوچک آبگریز بوده و توسط پروتئین‌های غشایی به داخل سیتوپلاسم سلول مذکور به منظور اثر بر روی رفتار سلول منتقل می‌شوند. مع ذالک، اکثر مولکول‌های پیام‌رسان برای رخنه کردن از میان غشاء پلاسمایی بسیار بزرگ و علاوه بر این، شدیداً آب‌دوست هستند. این‌ها به گیرنده‌های سطح سلولی که پروتئین‌های داخلی بر روی غشاء پلاسمایی هستند، متصل می‌شوند. گیرنده‌های سطح سلول عموماً از سه بخش جداگانه تشکیل شده‌اند: یک قسمت بر روی سطح خارج سلولی، بخشی که از غشاء پلاسمایی مذکور عبور می‌کند و مضاف به این، بخشی که به طرف سیتوزول است. مولکول‌های پیام‌رسان به عنوان لیگاند[1] عمل می‌کنند و به جایگاه مکمل از نظر ساختاری مربوط به دُمین عبورکننده‌ی غشایی و یا خارج سلولی گیرنده متصل می‌شوند. اتصال این لیگاند، تغییر ساختمان فضایی را در گیرنده القاء می‌کند که سپس به سرتاسر دُمین عبورکننده‌ی غشایی تا دُمین سیتوزولیک منتقل می‌شود و این عمل سبب اتصال و فعال شدن بعدی (و یا مهار) پروتئین‌های دیگر در سیتوزول و یا چسبیدن به غشاء پلاسمایی می‌شود. این فرایند کلی از تبدیل پیام‌های خارج سلولی به پاسخ‌های داخل سلولی، علاوه بر مراحل خاص در این فرایند را **انتقال پیام**[2] می‌نامند.

در کل یوکاریوت‌ها فقط در حدود چندین دسته از گیرنده‌های سطح سلولی و تنها چند مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی محافظت شده و پروتئین‌های وجود دارند که در سیتوزول فعال می‌شوند. دانش ما از این موضوعات عمومی در سال‌های اخیر، به طور وسیعی پیشرفت کرده است، در مقیاس بزرگ به خاطر اینکه این مسیرها فوق‌العاده حفاظت می‌شوند مضاف بر اینکه اساساً در موجودات متنوعی مانند کرم، پشه و موش‌ها در مسیرهای یکسانی عمل می‌نمایند. ترکیبی از مطالعات ژنتیکی با آنالیزهای بیوشیمیائی، محققان را قادر به دنبال کردن بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی از اتصال لیگاند تا رسپتورها و نهایتاً پاسخ‌های سلولی، کرده است.

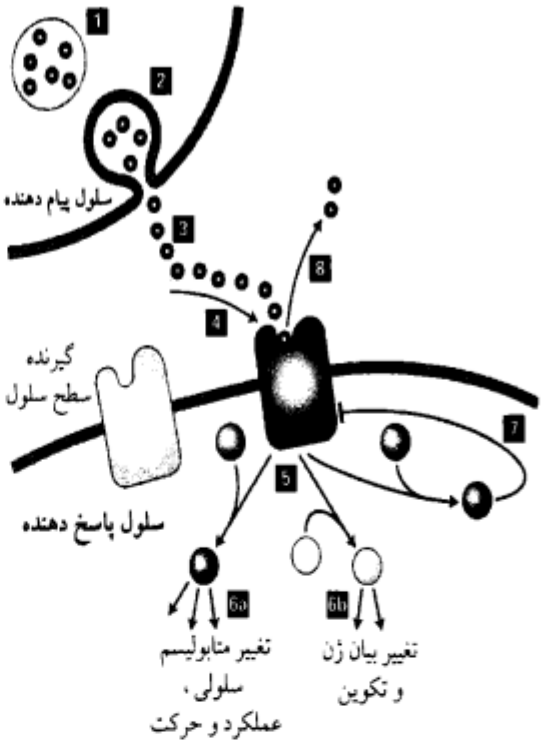
متأسفانه کاربرد اصطلاحات برای نامگذاری مسیرها می‌تواند گیج‌کننده باشد. مسیرها عموماً یا بر مبنای دسته عمومی گیرنده‌های درگیر شده (برای مثال، گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها، گیرنده تیروزین کیناز)، نوع لیگاند (برای مثال TGFβ، Wnt، Hedgehog) یا عامل کلیدی انتقال پیام داخل سلولی (به عنوان مثال NF-κB) نامگذاری می‌شوند.

در برخی موارد همان مسیر فوق‌الذکر ممکن است با نام‌های متفاوتی نسبت داده شود. خوشبختانه همانگونه که محققان جزئیات مولکولی گیرنده‌ها و مسیرهای بیشتر و بیشتری را کشف کرده‌اند، برخی اصول فراگیر و مکانیسم‌ها در حال شکل گرفتن هستند. این ویژگی‌های مشترک، می‌تواند به ما در ایجاد مفاهیمی از گنجینه اطلاعات جدید درباره‌ی پیام‌رسانی سلول به سلول کمک کند.

شاید فراوان‌ترین دسته گیرنده‌های یافت شده در موجودات از مخمر تا انسان به طور متداول گیرنده جفت شده با G- پروتئین[3] یا ($GPCR_S$) نامگذاری می‌شوند. ژنوم انسان در حدود ۹۰۰ گیرنده جفت شده با G - پروتئین نظیر گیرنده‌های سیستم‌های بینائی، بویایی و چشائی، بسیاری از گیرنده‌های نوروترانسمیترها (ناقلین عصبی) و اکثر گیرنده‌های مربوط به هورمون‌هایی که متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و چربی‌ها را کنترل می‌کنند، رمز می‌کنند. اصولاً مسیر پیام‌رسانی یکسان در مخمر برای پیام‌رسانی توسط فاکتورهای مربوط به جفت‌گیری مورد استفاده قرار می‌گیرد (فصل ۲۱). این فصل عمدتاً بر روی این گیرنده‌ها متمرکز می‌شود که اینها معمولاً تغییرات کوتاه‌مدت را در فعالیت سلول القاء می‌کنند. فعال شدن بسیاری از گیرنده‌های سطح سلول الگوی بیان ژن آن سلول را تغییر می‌دهد که این امر منجر به تمایز سلول و دیگر پیامدهای بلندمدت می‌شود.

این گیرندها و مسیرهای پیام‌رسانی فعال شده توسط آنها در فصل ۱۶ بررسی می‌شود. نوع دیگری از گیرنده‌های سطح سلول کانال‌های یونی هستند که به طور طبیعی بسته بوده و در پاسخ به اتصال لیگاند باز می‌شوند و به یون‌های ویژه‌ای اجازه عبور از غشاء پلاسمایی را می‌دهند. این گیرنده‌ها، **کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند** نامیده می‌شوند و بطور ویژه در سلول‌های عصبی

1- Ligand 2- Signal Transduction
3- G-protein - Coupled receptor



▲ **شکل ۱ـ۱۵ اصول کلی پیام رسانی توسط گیرنده‌های سطح سلول.** ارتباطات توسط پیام‌های خارج سلولی معمولاً مستلزم مراحل زیر است: سنتز مولکول پیام‌رسان به وسیلهٔ سلول پیام‌دهنده و الحاقشان به داخل وزیکول‌های کوچک داخل سلولی ❶. رها شدن به داخل فضای خارج سلولی از طریق اگزوسیتوز ❷ و انتقال این پیام به داخل سلول هدف ❸جایی که این مولکول پیام‌رسان به یک گیرنده پروتئینی ویژه سطح سلول متصل شده و منجر به فعال‌سازی گیرنده می‌شود❹. سپس گیرنده فعال شده یک و یا چندین مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی را راه‌اندازی می‌کند ❺. هدایت به سمت تغییرات خاص و معمولاً کوتاه‌مدت در فعالیت سلولی، متابولیسم یا تحرک (❻a) یا تغییرات بلندمدت در میان ژن یا تکامل (❻ b). خاتمه این پاسخ سلولی به وسیلهٔ مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی که فعالیت گیرنده را مهار می‌کند و (❼) علاوه بر این با حذف پیام خارج سلولی❽ ایجاد می‌شود.

اهمیت دارند (این گیرنده‌ها در فصل ۲۳ بحث می‌شوند).

در این فصل در ابتدا اصول کلی پیام‌رسانی سلولی را مرور می‌کنیم. مضاف بر این، شیوهٔ تعیین هویت و توصیف گیرنده‌های سطح سلول را شرح می‌دهیم. پس از آن، چندین ویژگی مربوط به‌بسیاری از مسیرهای انتقال پیام و به علاوه تنظیمشان را بحث می‌کنیم که در سرتاسر تکوین موجودات حفظ شده و در ضمن اینکه در گونه‌های وسیعی از موجودات پیدا می‌شوند. سپس اجزاء متداول در مسیرهای پیام‌رسانی جفت شده با G - پروتئین‌ها را شرح می‌دهیم و علاوه بر این، جزئیات مولکولی مکانیسم‌هایی که به وسیله آن‌ها فعالیت‌های سلولی گوناگون توسط مجموعه نسبتاً کوچک از گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها کنترل می‌شود و ضمناً مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آنها را مورد بازبینی قرار می‌دهیم. در پایان، مشاهده خواهیم کرد که مسیر انتقال پیام فعال شده با یک گیرنده می‌تواند مسیر پیام‌رسانی پایین دست گیرنده دیگری را تحت تأثیر قرار دهد (بعضی اوقات به طور مثبت و در دیگر موارد به صورت منفی) که این، به منظور یکپارچه کردن پاسخ‌های سلولی با پیام‌های خارج سلولی متعدد انجام می‌شود. این نوع هماهنگی در پیام نقش کلیدی را در پاسخ‌های بدن نسبت به احتیاجات مختلف گلوکز ایفا می‌کند.

۱ـ۱۵ از پیام خارج سلولی تا پاسخ سلولی

ارتباطات توسط پیام‌های خارج سلولی در یک موجود زنده معمولاً مستلزم مراحل زیر است (شکل ۱ـ۱۵ را ملاحظه کنید).

❶ سنتز و ❷ رها شدن مولکول پیام‌رسان توسط سلول پیام دهنده؛ ❸انتقال این پیام به سلول هدف؛ ❹ اتصال پیام مذکور به گیرنده پروتئینی ویژه منجر به تغییرات ساختمان فضایی می‌شود: ❺ راه‌اندازی یک یا چندین مسیر انتقال پیام داخل سلولی توسط آن گیرنده فعال شده؛ ❻تغییرات ویژه در فعالیت سلول، متابولیسم یا رشد و تکامل؛ علاوه بر این معمولاً مستلزم تنظیم پس‌نورد ❼ غیرفعال شدن آن گیرنده و ❽ حذف مولکول پیام‌رسان که این دو با یکدیگر پاسخ سلولی فوق‌الذکر را خاتمه می‌دهند.

سلول‌های پیام‌دهنده، مولکول‌های پیام‌رسان را تولید و آزاد می‌کنند

در انسان، پاسخ فوری به تغییرات محیطی عمدتاً به وسیلهٔ سیستم عصبی و هورمون‌هایی نظیر پپتیدهای کوچک (برای مثال: انسولین و هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک (ACTH) و مولکول‌های کوچک غیرپپتیدی از قبیل کاتکول آمین‌ها (برای مثال: اپی‌نفرین، نوراپی‌نفرین و دوپامین) میانجی‌گری می‌شود. سلول‌هایی که این مولکول‌های پیام‌رسان را می‌سازند در پانکراس (انسولین)، غدهٔ هیپوفیز (ACTH)، غدد آدرنال (اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین)، نورون‌ها (نوراپی‌نفرین) و قسمتی از مغز به نام هیپوتالاموس (دوپامین) یافت می‌شوند. مولکول‌های پیام‌رسان کوچک نظیر نوروترانسمیترهای کاتکول آمینی، در سیتوزول سنتزشده و سپس بداخل وزیکول‌های ترشحی منتقل می‌شوند (فصل ۲۳)، در حالیکه

پپتیدها و هورمون‌های پروتئینی توسط مسیر ترشحی شرح داده شده در فصل ۱۴ سنتز و پردازش می‌شوند. در هر دو مورد، وزیکول‌های دارای مولکول‌های پیام‌رسان نامبرده فقط زیر غشاء پلاسمایی در محل نگهداریشان تجمع یافته و منتظر پیام رها شدن می‌مانند. (مرحله ❶ از شکل ۱ـ۱۵ را مشاهده کنید).

تحریک سلول‌های پیام‌رسان تقریباً همیشه با افزایش غلظت Ca^{2+} در نزدیکی وزیکول‌ها همراه است که این امر موجب امتزاج سریع غشاء وزیکول‌ها با غشاء پلاسمایی و آندوسیتوز پپتیدهای ذخیره شده یا هورمون‌های پروتئینی یا مولکول‌های پیام‌رسان به محیط اطراف و یا خون می‌شود. (مرحله ❷ از شکل ۱ـ۱۵ را مشاهده کنید.)

هورمون‌های پپتیدی رها شده فقط برای لحظه‌ای کوتاه قبل از تجزیه شدن توسط پروتئازهای موجود در خون و یا بافت، در خون باقی می‌مانند. مولکول‌های کوچک رها شده نظیر کاتکول آمین، سریعاً به وسیلهٔ آنزیم‌ها یا جذب توسط ناقل‌ها به داخل سلول‌های ویژه، غیرفعال می‌شوند. عمل ابتدایی این مولکول‌های پیام‌رسان در سلول‌های هدف (فعال‌سازی یا مهار آنزیم‌های اختصاصی) معمولاً فقط لحظه‌ای کوتاه طول می‌کشد. بنابراین کاتکول آمین‌ها و برخی از هورمون‌های پپتیدی توانایی میانجی‌گری پاسخ‌های کوتاه‌مدت را دارند که با تجزیه خودشان خاتمه می‌یابد. به منظور پاسخ‌های مداوم و طولانی‌مدت، نظیر تقسیم سلولی یا تمایز سلولی، سلول‌ها باید در معرض مولکول‌های پیام‌رسان برای دوره‌ای طولانی مدت (معمولاً ساعت‌ها) قرار بگیرند.

مولکول‌های پیام‌رسان می‌توانند به طور موضعی و یا در فواصل دور عمل نمایند

مولکول‌های پیام‌رسان به سمت سلول‌های هدف‌شان مسافرت می‌کنند (مرحله ❸ از شکل ۱ـ۱۵ را مشاهده کنید). برخی فواصل طولانی را از طریق خون طی می‌کنند و برخی بیشتر اثرات موضعی دارند. در حیوانات، پیام‌رسانی به وسیله‌ی مولکول‌های خارج سلولی را می‌توان به سه نوع تقسیم‌بندی نمود: (اندوکرین[1]، پاراکرین[2] و اتوکرین[3]). این تقسیم‌بندی بر مبنای مسافت عملکردی این پیام‌ها است (شکل ۲a-c–۱۵). مضاف بر اینکه پروتئین‌های متصل‌شونده به غشاء خاص روی یک سلول، توانایی پیام‌رسانی به سلول مجاور را دارند.

در پیام‌رسانی **اندوکرین**، مولکول‌های پیام‌رسان، توسط سلول‌های پیام‌دهنده سنتز و ترشح شده و از طریق سیستم گردش خون موجود زنده منتقل می‌شوند و نهایتاً بر روی سلول‌های هدف در فاصله‌ای دور از جایگاه سنتزش عمل می‌کنند. اصطلاح هورمون عموماً به مولکول‌های پیام‌رسانی که پیام‌رسانی اندوکرین را وساطت می‌کنند، نسبت داده می‌شود.

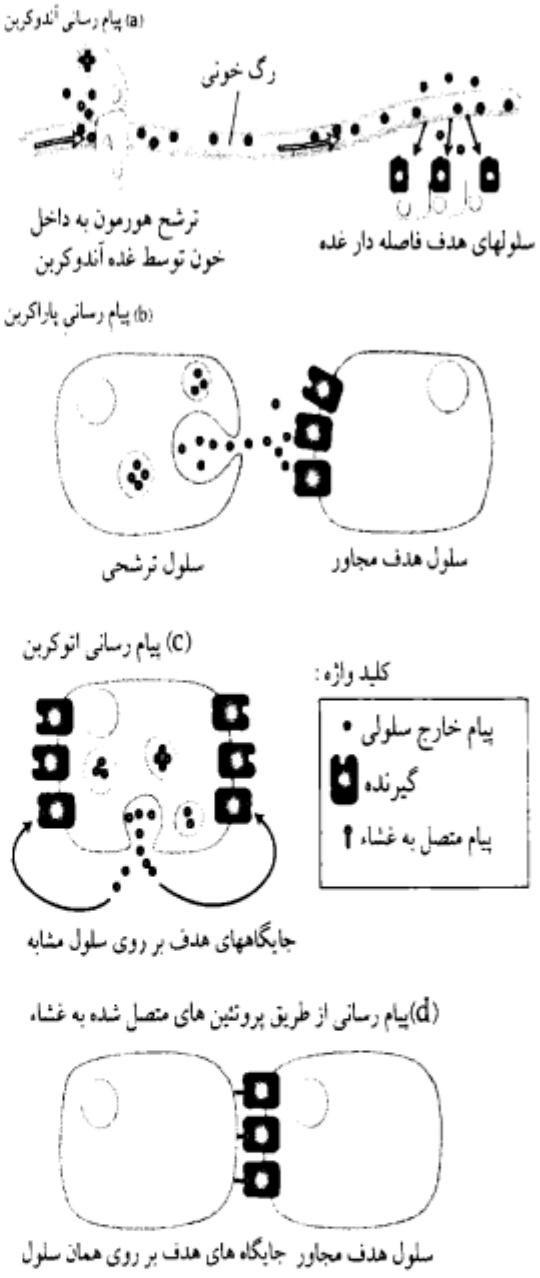
در پیام‌رسانی **پاراکرین**، مولکول‌های پیام‌رسان آزادشده به وسیلهٔ یک سلول، تنها سلول هدف را در مجاورت خود تحت تأثیر قرار می‌دهند. انتقال پیام یک ناقل عصبی از یک سلول عصبی به سلول عصبی دیگر و یا از یک سلول عصبی به سلول عضلانی (القاء یا مهار انقباض عضلانی) توسط پیام‌رسانی پاراکرین رخ می‌دهد. بسیاری از فاکتورهای رشد[4] و تنظیم‌کننده تکوین در موجودات پرسلولی، نیز در بُرد کوتاه عمل می‌نمایند. برخی از این مولکول‌ها به طور محکم به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شوند (ناتوان برای پیام‌رسانی) اما متعاقباً می‌توانند در شکل فعال آزاد شوند.

پیام‌های بسیار مهم از نظر تکاملی دور از سلول‌های پیام‌رسان منتشر می‌شوند که این موجب تشکیل یک شیب غلظت و القاء پاسخ‌های سلولی متفاوت شده که بستگی به فاصله‌ی سلول هدف خاص از جایگاه آزاد شدن پیام دارد.

در پیام‌رسانی **اتوکرین**، سلول‌ها به سوبستراهای آزاد شده توسط خودشان پاسخ می‌دهند. برخی از فاکتورهای رشد بدین صورت عمل می‌کنند و علاوه بر این سلول‌های موجود در محیط کشت، اغلب فاکتورهای رشدی ترشح می‌کنند که رشد و تکثیر خودشان را تحریک می‌کند. این نوع از پیام‌رسانی به ویژه، مخصوص سلول‌های سرطانی است. بسیاری از این سلول‌ها فاکتورهای رشد را بیش از اندازه تولید و آزاد می‌کنند که موجب تحریک نامناسب و بدون تنظیم تکثیرشان علاوه بر اثرگذاری بر روی سلول‌های غیرتوموری مجاورشان می‌شود و این فرایند ممکن است منجر به تشکیل توده‌ی توموری شود.

مولکول‌های پیام‌رسانی که پروتئین‌های سرتاسری غشایی (داخل غشائی) هستند، بر روی سطح غشاء موضع‌گیری کرده و علاوه بر این نقش مهمی را در رشد و تکامل بازی می‌کنند (شکل ۲ـ۱۵ قسمت d). در برخی موارد، این پیام‌های متصل به غشاء در یک سلول به گیرنده بر روی سطح سلول هدف مجاورشان به منظور آغاز تمایز متصل می‌شوند. در موارد دیگر، تجزیه پروتئولیتیک پروتئین پیام‌رسان متصل به غشاء، موجب آزاد شدن قطعه‌ی خارج سلولی آن شده، که این قطعه نیز در نقش یک مولکول پیام‌رسان محلول عمل می‌نماید.

1- Endocrin
2- Paracrine
3- Autocrine
4- Growth factors



▲ **شکل ۲-۱۵ نمایش عمومی پیام‌رسانی داخل سلولی.** (a-c) پیام‌رسانی سلول به سلول توسط ترکیبات شیمیایی خارج سلولی در فاصله‌های دور از چند میکرومتر در پیام‌رسانی اتوکرین و پاراکرین تا چند متر در پیام‌رسانی اندوکراین رخ می‌دهد. (d) پروتئین‌های متصل به غشاء پلاسمایی در یک سلول قادر به برهمکنش مستقیم با گیرنده‌های سطحی در سلول‌های مجاور هستند.

برخی از مولکول‌های پیام‌رسان می‌توانند هم در بُرد کوتاه و هم در بُرد بلند عمل نمایند. برای مثال، اپی‌نفرین، در نقش یک ناقل عصبی (پیام‌رسان پاراکرین) و علاوه بر این به عنوان یک هورمون سیستمیک (پیام‌رسانی اندوکرین) فعالیت می‌کند. مورد دیگر، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) است که به صورت یک پروتئین داخل غشایی‌سنتز می‌شود. EGF متصل به غشاء می‌تواند به سلول مجاور متصل شده و از طریق تماس مستقیم پیام‌رسانی کند. برش به وسیله‌ی یک پروتئاز خارج سلولی سبب آزاد شدن شکل محلول EGF شده که این می‌تواند به روش پاراکرین و یا اتوکرین پیام‌رسانی کند.

اتصال مولکول‌های پیام‌رسان، پاسخ‌هایی را درون سلول‌های هدف فعال می‌کند:

وقتی که یک مولکول پیام‌رسان به سلول هدف رسید، به گیرنده‌ای در سطح آن سلول متصل می‌شود (شکل ۱-۱۵، مرحله ❹ را مشاهده کنید). بخش وسیعی از گیرنده‌ها با اتصال مولکول‌های متصل به غشاء و یا ترشح شده فعال می‌شوند (از قبیل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، ناقلین عصبی و فرومون‌ها). ولیکن برخی از گیرنده‌ها توسط تغییر غلظت یک متابولیت (برای مثال، اکسیژن یا مواد غذائی) و یا به وسیله‌ی محرک‌های فیزیکی (برای مثال، نور، حرارت، تماس) فعال می‌شوند.

همانگونه که قبلاً اشاره شد، گیرنده‌های پروتئینی ویژه برای هر مولکول پیام‌رسان خارج سلولی آبدوست، تقریباً همیشه بر روی سطح سلول هدف قرار گرفته‌اند. مولکول پیام‌رسان به جایگاهی بر روی دُمین خارج سلولی گیرنده مذکور بر اثر مکمل بودن مولکولی‌شان متصل می‌شوند (شکل ۳-۱۵، فصل ۲ را نیز مشاهده کنید).

اتصال لیگاند موجب تغییر شکل فضایی در گیرنده‌ی متصل به غشاء شده که سبب آغاز زنجیره‌ای از واکنش‌های منتهی به پاسخ‌های سلولی خاص در داخل سلول مذکور می‌شود. انواع مختلف سلول‌ها ممکن است که مجموعهٔ متفاوتی از گیرنده‌ها را برای لیگاند مشابه داشته باشند که هر یک از اینها می‌تواند پاسخ متفاوتی را القاء نماید و یا اینکه گیرنده‌های مشابه ممکن است که بر روی انواع متنوعی از سلول‌ها یافت می‌شوند و علاوه بر این اتصال یک لیگاند خاص به یک گیرنده ویژه ممکن است پاسخ متفاوتی را در هر نوع سلول آغاز کند. در این صورت، یک لیگاند می‌تواند سلول‌های مختلف را نسبت به پاسخ دادن در مجموعه‌ی متنوعی از مسیرها القاء نماید. اتصال لیگاند به گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها، یک پروتئین داخل سلولی (G پروتئین ۳ جزئی) را برای تبادل یک GDP با GTP فعال می‌کند. تغییر شکل فضایی القاء شده به وسیله‌ی اتصال GTP، به نوبه خود، برهمکنش G - پروتئین با پروتئین‌های انتقال پیام پایین دست را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

گیرنده‌های انسانی برای هورمون‌های اپی‌نفرین، سرتونین و گلوکاگون، مثال‌هایی از گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها هستند. همانگونه که در فصل‌های دیگر بحث کردیم، تغییر شکل فضایی ناشی از اتصال لیگاند به برخی دیگر از گیرنده‌ها، فعالیت فسفریلاسیون (فعالیت کینازی) دُمین داخل سلولی گیرنده‌ها با یک آنزیم کیناز سیتوزولیک متصل شده را تحریک و یا گاهی اوقات مهار می‌کند و به دنبال فسفریلاسیون سوبستراهای پروتئینی در سیتوزول، فعالیت‌شان تغییر می‌کند. با این وجود، فعال شدن دیگر گیرنده‌ها، پروتئولیز و تفکیک کمپلکسهای چندپروتئینی داخل سلولی را درگیر می‌کند که موجب رها شدن پروتئین‌های انتقال پیام می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۵

از پیام خارج سلولی به پاسخ سلولی

- مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی میانکنش‌های بین موجودات زنده تک سلولی را تنظیم می‌کنند و تنظیم‌کننده‌های اساسی فیزیولوژی و تکوین موجودات زنده پرسلولی هستند.
- مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی به گیرنده‌ها متصل می‌شوند و تغییر ساختاری را در گیرنده القاء می‌کنند (فعالسازی) و تغییراتی در فعالیت‌ها و اعمال درون سلولی ایجاد می‌شود.
- در پیام‌رسانی پاراکرین، پیام‌ها از یک سلول بر روی سلول‌های مجاور عمل می‌کنند و یا در آندوکرین بر روی سلول‌های با فاصله زیاد از سلول عمل می‌کنند و در پیام رسانی اتوکرین سلول پیام‌دهنده بر روی خودش اعمال اثر می‌کند (شکل ۲-۱۵ را ملاحظه کنید).
- پیام‌های خارجی شامل پروتئین‌ها و پپتیدهای ترشحی و یا لنگرشده به غشاء (یا در مایع خارج سلولی حل شده‌اند و یا در ماتریکس خارج سلولی قرار گرفته‌اند) مولکول‌های چربی دوست کوچک (مانند هورمون‌های استروئیدی و تیروکسین) مولکول‌های آب‌دوست کوچک (مانند اپی‌نفرین) گازها (مانند نیتریک اکسید) و محرک‌های فیزیکی (مانند نور) هستند.
- اتصال مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی به گیرنده‌های سطح سلولی یک تغییر ساختاری را در گیرنده ایجاد می‌کند که منجر به فعالسازی مسیرهای انتقال پیام درون سلولی می‌شوند که در نهایت، متابولیسم و عملکرد سلولی یا بیان ژن را تنظیم می‌کند.

۲-۱۵ مطالعه‌ی گیرنده‌های سطح سلول

پاسخ یک سلول و یا یک بافت به پیام‌های خارجی ویژه توسط (a) اجزاء تشکیل‌دهنده‌ی گیرنده‌ها که قادر به شناسایی پیامها هستند (b) مسیرهای انتقال پیام فعال شده به واسطه‌ی این گیرنده و (c) فرایندهای داخل سلولی متأثر از این مسیرها، دیکته می‌شود. به یاد داشته باشید که میانکنش بین لیگاند و گیرنده موجب تغییر شکل فضایی در گیرنده پروتئینی می‌شود که آن را قادر به میانکنش با دیگر پروتئین‌ها می‌سازد و بدین وسیله یک آبشار پیام‌رسانی آغاز می‌شود (شکل ۱-۱۵، مراحل ❹و ❺ را مشاهده کنید).

در این بخش اساس بیوشیمیایی مربوط به ویژگی اتصال لیگاند - گیرنده را علاوه بر توانایی غلظت‌های مختلف لیگاند برای فعال شدن یک مسیر مورد مطالعه قرار می‌دهیم. همچنین تکنیک‌های آزمایشگاهی مورد استفاده برای تخلیص و توصیف گیرنده‌های پروتئینی را بررسی می‌کنیم.

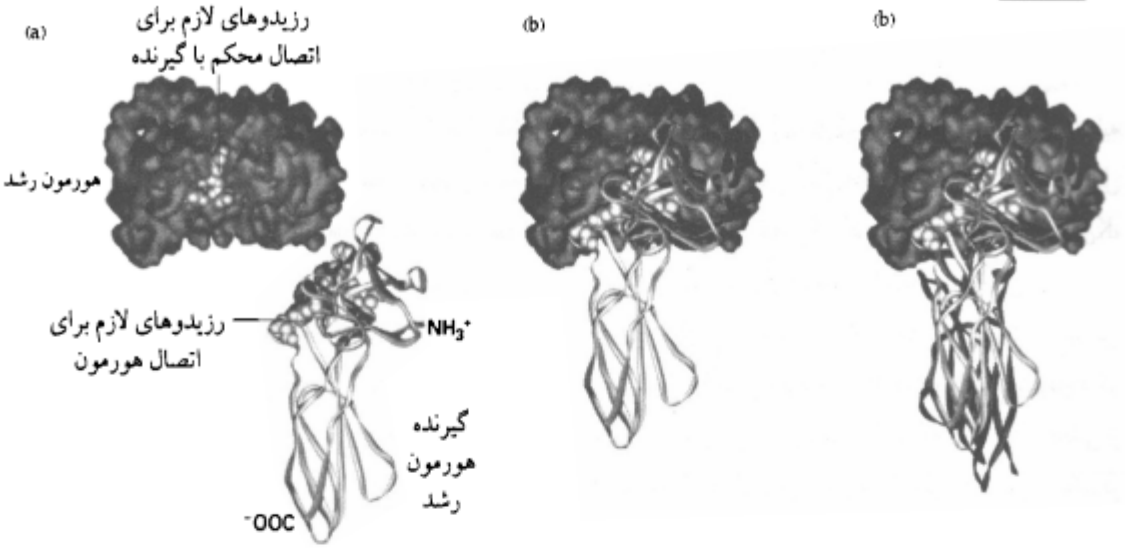
بسیاری از این روش‌ها برای گیرنده‌هایی که میانجی‌گر آندوسیتوز (فصل ۱۴) یا اتصال سلولی (فصل ۱۹)، علاوه بر گیرنده‌های که پیام‌رسانی را وساطت می‌کنند، قابل استفاده است.

گیرنده‌های سطح سلولی معمولی در ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ نسخه در هر سلول حضور دارند. شاید این تقریباً زیاد به نظر می‌رسد، اما یک سلول معمولی پستانداران تقریباً 10^{10} مولکول پروتئین و 10^{6} پروتئین بر روی غشاء پلاسمایی خود دارد. بنابراین، گیرنده برای یک مولکول پیام‌رسان ویژه، عموماً فقط ۰/۱ تا ۵ درصد پروتئین‌های غشاء پلاسمایی را تشکیل می‌دهد. این فراوانی پایین، جداسازی و خالص‌سازی گیرنده‌های سطح سلول را دشوار می‌کند. خالص‌سازی گیرنده‌ها همچنین مشکل است، به دلیل اینکه پروتئین‌های داخل غشایی در ابتدا باید به وسیله‌ی یک شوینده‌ی غیریونی از غشاء به صورت محلول خارج شوند (شکل ۲۳-۱۰ را مشاهده کنید) و سپس از دیگر پروتئین‌های سلولی جداسازی شوند.

گیرنده‌های پروتئینی به صورت اختصاصی به لیگاندها متصل می‌شوند

هر گیرنده به طور کلی فقط به یک مولکول پیام‌رسان و یا گروهی از مولکول‌ها با ارتباط خیلی نزدیک و مرتبط از نظر ساختاری متصل می‌شوند. ویژگی اتصال[1] گیرنده‌ها به توانایشان برای تشخیص مولکول‌های بسیار مرتبط نسبت داده می‌شود. اتصال لیگاند به

1- Binding specificity



▲ **شکل تجربی ۳-۱۵ قطعات کوچک اسیدآمینه‌ای برای اتصال ویژه بین هورمون رشد و گیرنده‌شان مهم است.** سطح خارجی غشاء پلاسمایی به سمت انتهای پایین شکل است و هر مولکول گیرنده به غشاء توسط مارپیچ آلفای هیدروفوبیک گذرنده از غشاء لنگراندازی می‌کند (نشان داده نشده است) که ادامه انتهای کربوکسیل نشان داده شده در شکل است. آنچنان که از ساختار سه بعدی کمپلکس هورمون رشد - گیرنده تعیین شده است، ۲۸ اسیدآمینه در هورمون ارتباط اتصالی با گیرنده دارد. هر یک از این اسیدهای آمینه (در هر بار یک اسیدآمینه) به آلانین جهش داده شده‌اند و اثر آن بر روی اتصال به گیرنده تعیین شده است. (a) از این مطالعه، مشخص شده است که فقط ۸ اسیدآمینه بر روی هورمون رشد در ۸۵ درصد انرژی اتصال نقش دارند این اسیدهای آمینه در ساختار اول دور از یکدیگر هستند ولیکن در پروتئین تاخورده مجاورند. مطالعات مشابه نشان می‌دهد که دو ریشه تریپتوفان گیرنده در انرژی اتصال هورمون رشد مؤثر هستند، اگرچه اسیدهای‌آمینه دیگر در ارتباط هورمون، نیز مهم هستند. (b) اتصال هورمون رشد به یک مولکول گیرنده با اتصال گیرنده دوم به طرف مقابل هورمون دنبال می‌شود، این مجموعه یکسانی از اسیدهای‌آمینه را درگیرنده اما متفاوت در هورمون درگیر می‌کند. همانگونه که در فصل بعد مشاهده خواهیم کرد، دیمریزاسیون گیرنده که با هورمون القاء می‌شود، یک مکانیسم عمومی در فعال‌سازی گیرنده‌ها برای هورمون‌های پروتئینی است.

نیروهای غیرکوالان چندتایی و ضعیف (از قبیل میانکنش‌های یونی، وان‌دروالس و هیدروفوبیک) و ارتباط مکمل بودن مولکولی[1] بین سطح میانکنش‌های گیرنده و لیگاند بستگی دارد. (شکل ۱۲-۲ را مشاهده کنید.)

برای مثال گیرنده انسولین به این هورمون و هورمون‌های مرتبط تحت عنوان فاکتورهای رشد شبه انسولین ۱ و ۲ (IGF-1 و IGF-2) متصل می‌شود، ولیکن به هورمون دیگر متصل نمی‌شود.

به همین ترتیب، گیرنده‌ای که به هورمون رشد متصل می‌شود، به دیگر هورمون‌هایی با ساختار مشابه متصل نمی‌شود و علاوه بر این، گیرنده‌های استیل کولین، فقط به این مولکول کوچک متصل می‌شوند و با دیگر هورمون‌هایی که فقط اندکی از نظر ساختار شیمیایی متفاوتند نیز متصل نمی‌شود.

نه تنها هر گیرنده پروتئینی به وسیله‌ی اتصال اختصاصیش به لیگاند ویژه توصیف می‌شود، بلکه کمپلکس لیگاند - گیرنده حاصله نیز یک ویژگی اثرگری[2] را از خود نشان می‌دهد به دلیل اینکه کمپلکس یک پاسخ سلولی ویژه را وساطت می‌کند. بسیاری از مولکول‌های پیام‌رسان به چند نوع از گیرنده‌ها متصل می‌شوند و هر کدام می‌تواند مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی متفاوتی را فعال نماید و بنابراین پاسخ‌های سلولی متفاوتی را نیز القاء می‌کند. برای مثال، سطح سلول‌های ماهیچه اسکلتی، سلول‌های ماهیچه قلب و سلول‌های آسینی پانکراس که آنزیم‌های هضمی هیدرولیتیک را تولید می‌کنند، هریک انواع متفاوتی از گیرنده‌ها را برای استیل کولین دارند.

در سلول ماهیچه‌ای اسکلتی، رها شدن استیل کولین از نورون مجاور، سبب شروع انقباض به وسیله‌ی فعال‌سازی یک کانال یونی دریچه‌دار مربوط به استیل کولین می‌شود. در بیماری فلجی اتوایمن[3] میاستنیاگراویس[4]، بدن آنتی‌بادی‌هایی تولید می‌کند که فعالیت گیرنده‌های استیل‌کولین خودش را بلوکه می‌کند. در ماهیچه قلب، رها شدن استیل کولین توسط نورون‌های مختلف موجب فعال

1- Molecular complementarity
2- Effector specificity
3- Autoimmune paralytic
4- Myasthenia gravis

شدن یک گیرنده جفت شده با G - پروتئین و کند شدن سرعت انقباض و بنابراین کند شدن ضربان قلب می‌شود. رها شدن استیل کولین نزدیک سلول‌های آسینی پانکراس موجب بالا رفتن غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک شده که این نیز اگزوسیتوز آنزیم‌های هضمی ذخیره شده در گرانول‌های ترشحی را القاء و هضم غذا را تسهیل می‌کند.

از این رو، تشکیل کمپلکس‌های مختلف گیرنده - استیل کولین در انواع مختلف سلول‌ها منجر به پاسخ‌های سلولی متفاوتی می‌شود. از سوی دیگر، گیرنده‌های متفاوت از یک دسته که به لیگاندهای مختلفی متصل می‌شوند، اغلب پاسخ‌های سلولی مشابهی را در یک سلول القاء می‌کنند، لذا پیام‌های سلولی متفاوت می‌توانند موجب تغییر عمومی در رفتار یک سلول شوند. برای مثال، در سلول‌های کبد، هورمون‌های اپی‌نفرین، گلوکاگون و ACTH، به اعضاء مختلف خانواده گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین متصل می‌شوند. ولیکن تمامی این گیرنده‌ها، مسیر انتقال پیام مشابهی را فعال می‌کنند، مثلاً موجب سنتز مولکول پیام‌رسان کوچک داخل سلولی (cAMP) شده که این نیز به نوبه‌ی خود فعالیت متابولیت‌های متنوعی (مانند شکستن گلیکوژن) را تنظیم می‌کند. بدین ترتیب، هر سه هورمون اثر مشابهی را در متابولیسم سلول‌های کبدی دارند (در بخش‌های ۱۵ـ۶ و ۱۵ـ۸ بیشتر شرح داده شده است.)

ثابت تفکیک[1]، اندازه‌گیری تمایل گیرنده به لیگاندش است

اتصال لیگاند به یک گیرنده معمولاً به صورت یک واکنش قابل برگشت ساده قابل مشاهده است، که گیرنده به صورت R و لیگاند به صورت L و کمپلکس لیگاند - گیرنده به صورت RL نمایش داده می‌شود:

معادله‌ی (۱ـ۱۵)
$$R+L \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\rightleftharpoons}} RL$$

k_{off} ثابت سرعت تفکیک لیگاند از گیرنده‌اش، و k_{on}، ثابت سرعت تشکیل کمپلکس لیگاند - گیرنده از لیگاند آزاد و گیرنده می‌باشند.

در حالت تعادل، سرعت تشکیل کمپلکس لیگاند - گیرنده برابر با سرعت تفکیک آن می‌باشد و مضاف بر اینکه می‌توان به وسیله‌ی یک معادله اتصال تعادلی ساده

معادله (۲ـ۱۵)
$$K_d=\frac{[R]\,[L]}{[RL]}$$

توصیف کرد که [R] و [L] به ترتیب غلظت‌های گیرنده‌ی آزاد (به عبارت دیگر گیرنده بدون اتصال لیگاند) و لیگاند آزاد در حالت تعادل هستند و [RL] نیز غلظت کمپلکس لیگاند - گیرنده است. K_d، (ثابت تفکیک)، اندازه‌گیری تمایل گیرنده به لیگاندش است.

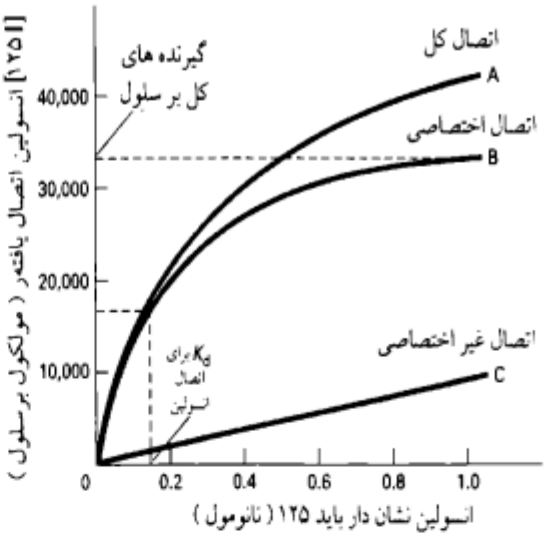
k_{off} پایین‌تر نسبت به k_{on}، نتیجه پایداری بیشتر کمپلکس RL (اتصال محکم‌تر) و بنابراین مقدار کمتر K_d است. شیوه‌ی دیگر برای مشاهده‌ی این نکته مهم این است که K_d معادل غلظتی از لیگاند است که در آن نیمی از گیرنده‌ها به لیگاند متصل شده‌اند. در این غلظت از لیگاند، تساوی [RL]=[R] برقرار است و بدین ترتیب از معادله ۲ـ۱۵ نتیجه می‌شود که K_d=[L]. مقدار کم K_d نشان می‌دهد که غلظت کمتری از لیگاند برای اتصال به ۵۰ درصد گیرنده‌های سطح سلول لازم است. در این حالت، K_d برای واکنش اتصالی، اساساً برابر با ثابت میکائیلیس[2] یا K_m است، که این ضریب، تمایل یک آنزیم را برای سوبسترایش منعکس می‌کند (فصل ۳). ولیکن همانند تمامی ثابت‌های تعادلی، مقدار K_d بستگی به مقدار مطلق k_{off} و k_{on} ندارد، بلکه به نسبتشان وابسته است. در بخش بعدی ما شیوه‌ای که K_d به صورت آزمایشگاهی تعیین می‌شود را یاد می‌گیریم.

از سنجش‌های اتصال برای شناسایی گیرنده‌ها و تعیین تمایلشان برای لیگاند استفاده می‌شود

معمولاً گیرنده‌ها را به وسیلهٔ توانایی‌شان برای اتصال به لیگاند رادیواکتیو در سلول‌های سالم یا بخش‌های سلولی، تعیین و اندازه‌گیری می‌کنند. شکل ۴ـ۱۵ این سنجش اتصال را برای میانکنش انسولین با گیرنده‌های انسولینی در سلول‌های کبدی نشان می‌دهد. مقدار انسولین رادیواکتیو متصل شده به گیرنده‌هایشان بر روی سلول‌های در حال رشد در پتری دیش (محور افقی) به عنوان فعالیت رو به رشد انسولین افزوده شده به مایع خارج سلولی محاسبه می‌شود (محور عمودی). هم تعداد جایگاه‌های اتصال لیگاند در هر سلول و هم میزان K_d به آسانی از منحنی اتصال ویژه (منحنی B) تعیین می‌شود. معمولاً این محاسبه با استفاده از برنامه‌های تطابق منحنی کامپیوتری قابل استفاده برای مقادیر آزمایشگاهی انجام

1- Dissociation Constant

2- Michaelis Constant



▲ **شکل تجربی ۱۵.۴ برای لیگاندهایی با تمایل بالا، سنجش‌های اتصال قادر به تعیین K_d و تعداد گیرنده‌ها در هر سلول است.** در اینجا اطلاعات خام مربوط به گیرنده‌های اختصاصی انسولین بر روی سطح سلول‌های کبدی نشان داده شده است. سوسپانسیونی از سلول‌ها برای مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با غلظت رو به افزایش انسولین نشان‌دار با یُد ۱۲۵ انکوبه می‌شود. پایین‌ترین دما به منظور مهار اندوسیتوز گیرنده‌های سطح سلول استفاده می‌شود. سلول‌های مذکور از انسولین متصل نشده جدا می‌شوند (معمولاً به وسیله سانتریفیوژ) و میزان رادیواکتیویتی اتصال برای آنها محاسبه می‌شود. منحنی اتصال کلی A، انسولین به طور ویژه به گیرنده‌های با تمایل بالا همچنین انسولین غیرویژه متصل با تمایل پایین برای مولکول‌های دیگر در سطح سلول را نشان می‌دهد. سهم اتصال غیرویژه نسبت به اتصال کلی با تکرار سنجش اتصال در حضور غلظت بیشتر از ۱۰۰ برابری انسولین غیرنشان‌دار تعیین می‌شود که این تمامی جایگاه‌های اختصاصی با تمایل بالا را اشباع می‌کند. در این حالت، کل انسولین‌های نشان‌دار به جایگاه‌های غیراختصاصی متصل می‌شود و منحنی C حاصل می‌شود. منحنی اتصال اختصاصی B، به عنوان تفاوت بین منحنی A و C طراحی می‌شود. همانگونه که با ماکزیمم منحنی اتصال اختصاصی B، تعیین شد، تعداد جایگاه‌های اتصال ویژه برای انسولین (گیرنده‌های سطحی) در هر سلول ۳۳۰۰۰ است. K_d غلظت انسولین لازم برای اتصال به ۵۰ درصد گیرنده‌های سطحی انسولین می‌باشد (در این مورد در حدود ۱۶۵۰۰ گیرنده بر سلول). بنابراین Kd برابر با $۱/۴\times۱۰^{-۱۰}$ مولار یا ۰/۱۴ نانومولار است.

می‌شود. با فرض اینکه، هر گیرنده عموماً فقط به یک مولکول لیگاند متصل می‌شود، شمار تعداد جایگاه‌های اتصال لیگاند با تعداد گیرنده‌های فعال در هر سلول برابر است. در مثال نشان داده شده در شکل ۱۵.۴، میزان K_d برابر با $۱/۴\times۱۰^{-۱۰}$ مولار است. به عبارت دیگر، غلظت انسولین مایع خارج سلولی لازم برای اینکه ۵۰ درصد از گیرنده‌های انسولین در سلول با یک انسولین اشغال شود برابر با $۱/۴\times۱۰^{-۱۰}$ مولار می‌باشد. معمولاً یک گیرنده تمایل مختلفی برای هر لیگاند قادر به اتصال به آن را دارد.

برای مثال سنجش اتصال مشابه نشان داده است که K_d برای اتصال فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-1) برای گیرنده انسولین برابر با ۳×۱۰^{-۸} مولار است. لذا غلظت بالاتر از ۲۰۰ برابر IGF-1 نسبت به انسولین برای اتصال ۵۰ درصد گیرنده‌های انسولینی لازم می‌باشد.

سنجش‌های اتصال مستقیم مشابه با آنچه که در شکل ۱۵.۴ نشان داده شد، با گیرنده‌هایی امکان‌پذیر است که تمایل بالایی برای لیگاندهایشان دارند از جمله گیرنده‌ها می‌توان به گیرنده اریتروپوئیتین ($K_d=۱\times۱۰^{-۱۰}M$) و گیرنده انسولین در سلول‌های کبدی ($K_d=۱/۴\times۱۰^{-۱۰}$) اشاره کرد.

با این حال، بسیاری از لیگاندها نظیر اریتروپوئیتین و دیگر کاتکول آمین‌ها، به گیرنده‌هایشان با تمایل بسیار پایین‌تری متصل می‌شوند. در صورتی که K_d برای اتصال، تقریباً بزرگتر از $۱\times۱۰^{-۷}M$ باشد (در حالتی که ثابت سرعت k_{off} نسبتاً بزرگتر از k_{on} است)، احتمال می‌رود که مدت زمان چند ثانیه تا چند دقیقه برای محاسبه میزان لیگاند متصل شده مورد نیاز است. (برخی از لیگاندهای متصل شده به گیرنده جدا خواهند شد و لذا مقدار مشاهده شده به طور حساب شده‌ای خیلی کم خواهد بود.). یک شیوه برای شناسایی اتصال ضعیف لیگاند به گیرنده‌اش بصورت یک سنجش رقابتی[1] با لیگاند دیگری که به گیرنده همسان با تمایل بالایی (میزان K_d پایین) متصل می‌شود، انجام می‌گیرد. در این نوع سنجش، لیگاند (رقیب[2]) با تمایل پایین و بدون برچسب را به صورت افزایشی و لیگاند با تمایل بالا و برچسب رادیواکتیو و با مقدار ثابت به سلول نمونه اضافه می‌شود. (شکل ۱۵.۵)

اتصال رقیب بدون برچسب[3]، اتصال لیگاند رادیواکتیو را به گیرنده بلوکه می‌کند. غلظت رقیب لازم برای مهار اتصال نیمی از لیگاند با برچسب رادیواکتیو تقریباً برابر با مقدار K_d مربوط به اتصال رقیب به گیرنده است. اندازه‌گیری دقیق میزان لیگاند با تمایل بالای متصل شده به گیرنده، در این سنجش امکان‌پذیر است، به دلیل اینکه

1- Competition assay 2- Competitor
3- Unlabeled Competitor

مقدار ناچیزی در مدت زمان لازم برای دستکاری‌های آزمایشگاهی به دلیل محاسبه جدا می‌شوند (K_{off} نسبتاً کم).

اتصال رقابتی اغلب برای مطالعهٔ مشتقات مصنوعی مربوط به هورمون‌های طبیعی که گیرنده‌ها را مهار و یا فعال می‌کنند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مشتقات که به طور وسیعی در تحقیقات بر روی گیرنده‌های سطح سلول و به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند، به دو دسته تقسیم می‌شوند: **آگونیست**[1] و **آنتاگونیست‌ها**[2]. **آگونیست‌ها**، عمل هورمون طبیعی را با اتصال به گیرنده‌اش تقلید می‌کند و مضاف بر اینکه پاسخ طبیعی را نیز القاء می‌کند. **آنتاگونیست** به گیرنده متصل می‌شود، ولیکن هیچ پاسخی را القاء نمی‌کند. با اشغال جایگاه‌های اتصال لیگاند بر روی یک گیرنده، یک آنتاگونیست می‌تواند هورمون طبیعی (یا آگونیست) را بلوکه نماید و بنابراین فعالیت فیزیولوژیکی معمولی آن هورمون را کاهش دهد. به عبارت دیگر آنتاگونیست پیام‌رسانی گیرنده را مهار می‌کند.

برای نمونه داروی ایزوپروترنول[3] مورد استفاده برای درمان بیماری آسم[4] را بررسی می‌کنیم. داروی ایزوپروترنول با اضافه شدن دو گروه متیل به اپی‌نفرین ساخته می‌شود (سمت راست شکل ۱۵ـ۵ را مشاهده کنید). این دارو، یک آگونیست گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین پاسخ به اپی‌نفرین در سلول‌های عضلانی صاف برونشیال است. ایزوپروترنول تقریباً بیش از ۱۰ برابر در مقایسه با اپی‌نفرین به این گیرنده متصل می‌شود. (K_d ۱۰ برابر کوچکتر) (سمت چپ شکل ۱۵ـ۵ را مشاهده کنید.) فعال شدن این گیرنده‌ها به شل شدن ماهیچه صاف برونشیال و بدین ترتیب به شروع عبور هوا در ریه‌ها کمک می‌کند. ایزوپروترنول در درمان برونشیت مزمن[5] و آمفیزم[6] استفاده می‌شود. در مقابل، فعال شدن نوع متفاوتی از گیرنده‌های جفت شده با G ـ پروتئین پاسخ دهنده به اپی‌نفرین در سلول‌های عضلانی ـ قلبی به سرعت انقباض قلب را افزایش می‌دهد. آنتاگونیست این گیرنده آلپرنولول[7] و ترکیبات منسوب به بلوکه کننده‌های بتا[8] نسبت داده می‌شوند که این آنتاگونیست‌ها برای کند کردن انقباضات قلب در درمان آنژین صدری[9] و آریترمیای قلبی[10] استفاده می‌شود.

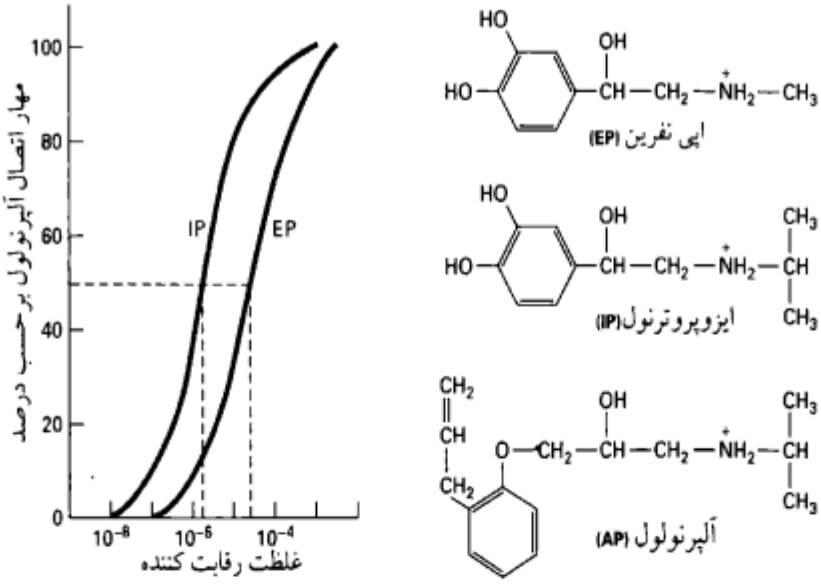
پاسخ سلولی حداکثر به یک مولکول پیام‌رسان معمولاً نیازی به فعال شدن تمامی گیرنده‌ها ندارد

تمامی سیستم‌های پیام‌رسانی چنان تکامل یافته‌اند که بالا رفتن سطح مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی، پاسخ نسبی را در سلول‌های پاسخ‌دهنده القاء می‌کنند. برای انجام شدن آن باید تمایل اتصال (مقدار K_d) گیرنده سطح سلول برای هورمون در حال گردش، بیشتر از سطح طبیعی (تحریک نشده) آن هورمون در مایع خارج سلولی یا خون باشد. ما می‌توانیم این اصل را در عمل به وسیله‌ی مقایسه سطح انسولین موجود در خون و علاوه بر این، K_d برای اتصال انسولین به گیرنده‌اش در سلول‌های کبدی، مشاهده نمائیم. ($1/4\times10^{-10}M$). برای مثال فرض کنید که غلظت نرمال انسولین در خون برابر با 5×10^{-12} مولار باشد. با جایگذاری این مقدار و K_d انسولین در معادلهٔ ۱۵ـ۲، می‌توانیم بخشی از گیرنده‌های انسولینی را که به انسولین متصل شده‌اند را در حالت تعادل محاسبه نمائیم. ($\frac{[RL]}{[RL]+[R]}$) که این مقدار برابر با ۰/۰۳۴۴ است. به عبارت دیگر، در حدود ۳ درصد از کل گیرنده‌های انسولین به انسولین متصل خواهند شد. در صورتی که غلظت انسولین تا ۵ برابر بالا برود ($2/5\times10^{-11}M$)، شمار کمپلکس هورمون - گیرنده، به نسبت بالا خواهد رفت (تقریباً ۵ برابر)، به طوری که حدوداً ۱۵ درصد کل گیرنده‌ها به انسولین متصل خواهند شد. اگر گستردگی پاسخ سلولی القاء شده به موازات شمار کمپلکس هورمون ـ گیرنده باشد [RL]، (که اغلب همین طور است)، لذا پاسخ‌های سلولی نیز تا حدود ۵ برابر افزایش خواهند یافت.

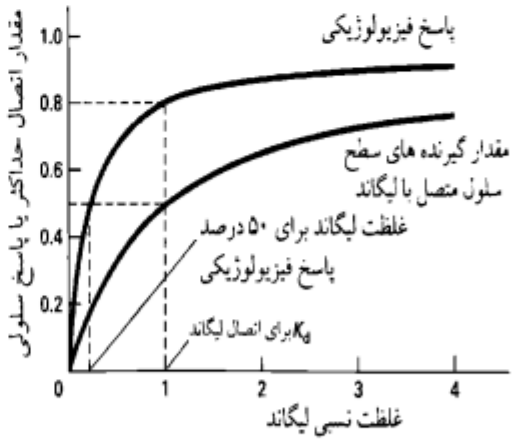
از سوی دیگر، فرض کنید که غلظت طبیعی انسولین در خون برابر با مقدار K_d ($1/4\times10^{-10}M$) باشد، در این حالت، ۵۰ درصد کل گیرنده‌ها به انسولین متصل خواهند شد. افزایش ۵ برابری در غلظت انسولین تا $7\times10^{-10}M$ فقط موجب افزایش ۶۶ درصدی بخشی از گیرنده‌های متصل به انسولین می‌شود (تا ۸۳ درصد متصل می‌شوند) لذا، به منظور بالا بردن غلظت هورمون تا اینکه موجب افزایش نسبی در بخشی از گیرنده‌های متصل به لیگاند شود، باید غلظت نرمال آن هورمون کاملاً پایین‌تر از میزان K_d باشد.

به طور معمول پاسخ سلولی ماکزیمم به یک لیگاند ویژه زمانی القاء می‌شود که تعداد خیلی کمتری از کل گیرنده‌ها (۱۰۰ درصد گیرنده‌ها) به آن لیگاند اتصال یابند. این پدیده را می‌توان با تعیین دامنه پاسخ و اتصال لیگاند به گیرنده در غلظت‌های مختلف لیگاند نشان داد (شکل ۱۵ـ۶). برای مثال، پیش‌ساز سلول قرمز خون

1- Agonists
2- Antagonists
3- Isoproterenol
4- Asthm
5- Chronic bronchitis
6- Emphysema
7 - Alprenolol
8- Beta - blockers
9- Angina
10- Cardiac arrythmias



▲ **شکل تجربی ۵-۱۵ برای لیگاندهای با تمایل پایین، اتصال را می‌توان با سنجش ($K_d \cong 3\times10^{-9}$) رقابتی شناسایی کرد.** در این مثال، لیگاند مصنوعی آلپرنولول، که تمایل بالایی برای اتصال به گیرنده اپی‌نفرین در سلول‌های کبدی دارد، به منظور شناسایی اتصال یا لیگاند با تمایل پایین (هورمون طبیعی اپی‌نفرین (EP) و لیگاند مصنوعی تحت عنوان ایزوپروترنول (IP)) استفاده می‌شود. سنجش همانند آنچه که در شکل ۴-۱۵ شرح داده شد انجام شد، اما با این تفاوت که میزان ثابتی از آلپرونولول [^{3}H] به منظور افزایش مقدار اپی‌نفرین غیر نشاندار یا ایزوپروترنول اضافه می‌شود. در هر غلظت رقابتی، مقدار آلپرنولول نشاندار متصل تعیین می‌شود. در نمودار مهار اتصال [^{3}H] - آلوپرونولول در برابر غلظت اپی‌نفرین یا ایزوپروترنول (نظیر آنچه نشان داده شده است) غلظت رقیبی که اتصال ۵۰ درصد آلپرونولول را مهار می‌کند، نزدیک به مقدار K_d اتصال رقیب دیگر است. باید توجه کرد که غلظت رقبا بر روی مقیاس لگاریتمی رسم می‌شود. K_d برای اتصال اپی‌نفرین به گیرنده‌اش بر روی سلول‌های کبدی فقط 5×10^{-5} مولار است و قابل اندازه‌گیری با سنجش مستقیم اتصال با اپی نفرین- [^{3}H] نخواهد بود. K_d برای اتصال ایزوپروترنول که پاسخ سلولی نرمال را القاء می‌کند، نسبت به اپی‌نفرین بیش از ۱۰ برابر کمتر است.



▲ **شکل تجربی ۶-۱۵ حداکثر پاسخ فیزیولوژیکی به پیام خارجی، با اشغال فقط بخشی از گیرنده با لیگاند القاء می‌شود.** برای مسیرهای پیام‌رسانی که این رفتار را از خود نشان می‌دهند، نمودار افزایش اتصال لیگاند به گیرنده و پاسخ فیزیولوژیکی در غلظت‌های مختلف لیگاند متفاوت است. در مثالی که در اینجا مشاهده می‌کنید، ۵۰ درصد حداکثر پاسخ فیزیولوژیکی در غلظتی از لیگاند القاء می‌شود که تنها ۱۸ درصد گیرنده‌ها اشغال می‌شوند. به همین ترتیب، ۸۰ درصد حداکثر پاسخ فیزیولوژیکی وقتی القاء می‌شود که غلظت لیگاند برابر با مقدار K_d باشد که در آن ۵۰ درصد گیرنده‌ها اشغال می‌شوند.

(اریتروئید)، تقریباً ۱۰۰۰ گیرنده‌ی سطحی برای اریتروپوئیتین دارد (اریتروپوئیتین یک هورمون پروتئینی است که سلول‌های نامبرده را برای تکثیر و تمایز به سلول‌های قرمز بالغ خونی القاء می‌کند). به دلیل اینکه فقط ۱۰۰ تا از این گیرنده‌ها برای انتقال اریتروپوئیتین برای القاء تقسیم یک سلول پیش‌نیاز لازم است، لذا غلظت لیگاند لازم برای القاء ۵۰ درصد پاسخ سلولی ماکزیمم به طور نسبی پائین‌تر از مقدار K_d مربوط به اتصال است. در این حالت نمودار درصد ماکزیمم اتصال در برابر غلظت لیگاند با نمودار درصد پاسخ سلولی ماکزیمم در برابر غلظت لیگاند متفاوت است.

حساسیت یک سلول به پیام‌های خارجی به توسط تعداد گیرنده‌های سطحی و تمایلشان به لیگاند تعیین می‌شود

به دلیل اینکه پاسخ سلولی به یک مولکول پیام‌رسان خاص به تعداد کمپلکس‌های لیگاند - گیرنده بستگی دارد، از این رو حضور کمتر گیرنده‌ها روی سطح یک سلول، حساسیت[1] کمتر سلول مذکور به آن لیگاند را به همراه دارد. بنابراین، غلظت بالاتری از لیگاند برای

1- Sensitive

القاء پاسخ فیزیولوژیکی در مقایسه با موردی که گیرنده‌های بیشتری حضور دارند، لازم است.

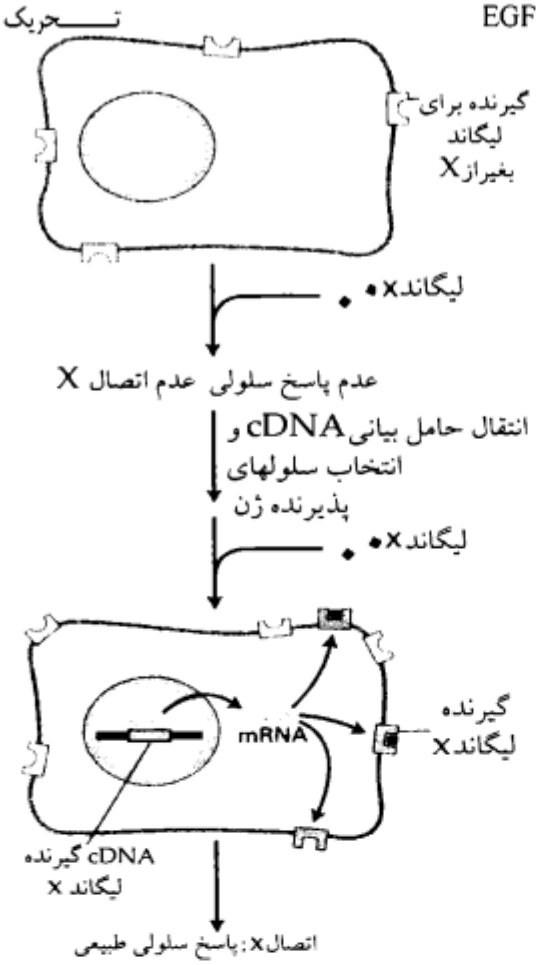
برای روشن کردن ارتباط مهم بین تعداد گیرنده با حساسیت هورمون، اجازه بدهید که مثالمان را از یک سلول پیش‌نیاز اریتروئیدی فراتر ببریم.

K_d برای اتصال اریتروپوئیتین (Epo) به گیرنده‌اش، در حدود 10^{-10} مولار است. همانگونه که قبلاً متذکر شدیم، فقط ۱۰ درصد از ۱۰۰۰ گیرنده اریتروپوئیتین بر روی سطح یک سلول باید به لیگاند متصل شوند تا ماکزیمم پاسخ سلولی را القاء نمایند. ما می‌توانیم غلظت لیگاند ([L]) لازم برای القاء ماکزیمم پاسخ به وسیله‌ی بازنویسی معادلهٔ ۲ـ۱۵، به صورت تعیین کنیم:

$$[L] = \frac{K_d}{\frac{R_T}{[R]} - 1} \qquad \text{(معادله ۳ـ۱۵)}$$

در اینجا، R_T تعداد کل گیرنده‌ها در هر سلول است. ($R_T=[R]+[RL]$) در صورتی که تعداد کُل گیرنده‌های اریتروپوئیتین (Epo) در هر سلول (R_T) ۱۰۰۰ باشد، آنگاه برابر با 10^{-10} مولار و [RL]=۱۰۰ است. ([RL]= تعداد گیرنده‌های اشغال شده با اریترپوئیتین لازم برای القاء پاسخ ماکزیمم). لذا غلظت اریتروپوئیتین ([L]) $1/1\times10^{-11}$ مولار، حداکثر پاسخ را سبب خواهد شد. اگر تعداد کل گیرنده‌های Epo(R_T) تا تعداد ۲۰۰ در هر سلول کاهش یابد، نتیجتاً غلظت اریتروپوئیتین بالاتر از ۹ برابر (مولار 10^{-10}) برای اشغال ۱۰۰ گیرنده و مضاف بر این، القاء حداکثر پاسخ لازم است. از این رو، وضوحاً حساسیت سلول به هورمون به شدت متأثر از تعداد گیرنده‌های موجود برای آن هورمون (علاوه بر K_d) است.

فاکتور رشد اپیتلیالی (EGF)، آنچنانکه از نامش برمی‌آید، تکثیر انواع بسیاری از سلول‌های اپتلیالی را تحریک می‌کند (نظیر سلول‌هایی که سطح مجرای غدد پستانی را می‌پوشانند). در حدود ۲۵ درصد سرطان‌های سینه، سلول‌های توموری، میزان افزایش یافته‌ای را از یک گیرنده‌ی EGF ویژه با نام HER2 تولید می‌کنند. تولید بیش از حد HER2 سبب ایجاد سلول‌های فوق‌العاده حساس به مقدار EGF موجود در محیط می‌کند که به طور نرمال این مقدار برای تحریک تکثیر سلول بسیار کم می‌باشد و لذا رشد این سلول‌های توموری به طور نامناسب به وسیله‌ی



▲شکل تجربی ۷ـ۱۵ سنجش بیان عملکردی قادر به شناسایی cDNA رمزکننده گیرنده سطح سلول است. سلول‌های هدف فاقد گیرنده برای یک لیگاند خاص (X) به صورت پایدار با حامل بیانی cDNA کدکننده گیرنده مذکور ترنسفکت می‌شوند. طراحی حامل بیانی اجازه انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده را از آن سلول‌هایی که این حامل‌ها را به ژنوم خودشان وارد نکرده‌اند را می‌دهد. (شکل ۳۲ـ۱۵ قسمت b را مشاهده کنید). با توجه به اینکه این سلول‌ها پیش از این تمامی پروتئین‌های مرتبط با انتقال پیام را بیان می‌کردند، سلول‌های ترانسفکت شده پاسخ سلولی نرمال را به لیگاند a نشان می‌دهند، در صورتی که cDNA در واقع گیرنده‌ها عملکردی را رمزگذاری می‌کند.

می‌شود. استنباط نقش HER2 در پاره‌ای از سرطان‌های سینه، منجر به ایجاد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با قابلیت اتصال به HER2 شده و بدین وسیله اتصال EGF را بلوکه می‌کند. در عمل معلوم شده است که این آنتی‌بادی‌ها در درمان بیماران سرطان سینه‌ی مذکور مفید هستند.

ارتباط سرطان سینه و HER2 به وضوح ثابت کرده است که تنظیم تعداد گیرنده‌ها برای یک مولکول پیام‌رسان بیان شده

توسط یک سلول، نقش کلیدی را در هدایت رویدادهای فیزیولوژیکی و تکاملی بازی می‌کند. این تنظیم می‌تواند در سطوح رونویسی، ترجمه و پردازش پس از ترجمه‌ای یا به وسیله‌ی کنترل سرعت تجزیه شدن گیرنده رخ دهد.

راه دیگر اینکه، اندوسیتوز گیرنده‌های موجود بر روی سطح سلول می‌تواند به طور مؤثری تعداد موجود را برای خاتمه دادن پاسخ سلولی معمول در غلظت پیام‌رسان متداول کاهش دهد. همانگونه که در بخش‌های بعدی بحث می‌کنیم، مکانیسم‌های دیگری می‌تواند تمایل گیرنده را برای لیگاند کاهش دهد و بدین ترتیب پاسخ سلول را به غلظت معین لیگاند کاهش دهد. لذا کاهش در حساسیت سلول به یک لیگاند خاص، **حساسیت زدایی**[1] نامیده می‌شود، که می‌تواند حاصل مکانیسم‌های متنوعی باشد و علاوه بر این در توانایی سلول برای پاسخ صحیح به پیام‌های خارجی مهم است.

گیرنده‌ها می‌توانند توسط تکنیک‌های تمایلی خالص‌سازی شوند

به دلیل فراوانی پایین گیرنده‌ها، تکنیک‌های ویژه‌ای برای جداسازی و خالص‌سازی آنها مورد نیاز است. گیرنده‌های سطح سلول را می‌توان از طریق روش‌های جداسازی با واسطه‌ی نشان‌گذاری تمایلی[2] شناسایی کرد. در این تکنیک، سلول‌ها را با مقدار زیادی از لیگاند با برچسب نشاندار رادیواکتیو مربوط به گیرنده‌ی مورد نظر مخلوط می‌کنند. پس از اینکه لیگاندهای متصل نشده شسته شدند، سلول‌ها با یک عامل شیمیایی که به طور کوالان به لیگاند برچسب‌دار متصل به گیرنده در سطح سلول پیوند عرضی برقرار می‌کند، تیمار می‌شوند. وقتی که یک لیگاند نشاندار با رادیواکتیو به طور کوالان با گیرنده‌اش اتصال برقرار می‌کند، حتی در حضور شوینده‌ها و دیگر عوامل دناتوره‌کننده‌هایی که به منظور محلول کردن گیرنده‌های پروتئینی از غشاء سلول استفاده می‌شوند، متصل باقی می‌مانند. لیگاند نشان‌دار، وسیله‌ای را برای ردیابی گیرنده در خلال روش‌های خالص‌سازی مهیا می‌کند.

اغلب تکنیک دیگری در خالص‌سازی گیرنده‌های سطح سلول استفاده می‌شود که توانایی اتصال به لیگانداش را ضمن حل شدن توسط شوینده‌ها حفظ می‌کند. این تکنیک مشابه کروماتوگرافی تمایلی[3] با کاربرد آنتی‌بادی است. (شکل ۳۷ـ۳ قسمت C). برای خالص‌سازی یک گیرنده با استفاده از این تکنیک، لیگاند متعلق به گیرنده مورد نظر به جای آنتی‌بادی، به طور شیمیایی به دانه‌های استفاده شده برای تشکیل یک ستون متصل می‌شود. فرآورده حل شده در شوینده مربوط به پروتئین‌های غشاء، از ستون یادشده عبور می‌کند. فقط گیرنده‌ها متصل باقی‌مانده، در حالی که پروتئین‌های دیگر شسته و دور ریخته می‌شوند.

عبور مقدار زیادی از لیگاند قابل حل از طریق ستون، موجب جایگزین شدن گیرنده‌های متصل به دانه‌ها شده و بدین ترتیب از ستون خارج می‌شوند. در برخی موارد، یک گیرنده می‌تواند به اندازهٔ ۱۰۰ هزار برابر در یک مرحله کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی شود.

گیرنده‌ها غالباً از ژن‌های کلون شده بیان می‌شوند

وقتی که توالی اسیدآمینه‌ای یک گیرنده‌ی خالص شده تعیین شد، می‌توان ژن مربوط به آن را کلون نمود. سنجش عملکردی بیان[4] برای cDNA کلون شده در یک سلول پستاندار که به طور طبیعی فاقد گیرنده رمزدهنده است می‌تواند یک دلیل قطعی برای کسب پروتئین مناسب فراهم کند (شکل ۱۵ـ۷). این چنین سنجش‌های بیانی، همچنین امکان مطالعه‌ی اثرات جهش در اسیدهای‌آمینه خاص بر روی اتصال لیگاند و یا انتقال پیام پایین دست را به محقق می‌دهد و بدین وسیله اسیدآمینه مسئول موجود در گیرنده را در میانکنش با لیگاند یا با پروتئین‌های مهم انتقال پیام تعیین می‌کند.

گیرنده‌های سطح سلول برای بسیاری از مولکول‌های پیام‌رسان در آن چنان مقدار کمی ارائه می‌شوند که نمی‌توان آنها را به وسیله‌ی کروماتوگرافی تمایلی و دیگر تکنیک‌های بیوشیمیایی مرسوم، تخلیص کرد. این فراوانی پایین گیرنده‌های پروتئینی اکنون به واسطه‌ی تکنیک‌های متنوع DNA ی نوترکیب، ردیابی و کلون می‌شوند. این روش نیاز به جداسازی و خالص‌سازی آنها را از عصاره‌ی سلولی حذف می‌کند.

در یک تکنیک، کتابخانه‌ای از cDNAی کلون شده مربوط به کل mRNAی استخراج شده از سلول، (از جمله mRNA ی مربوط به گیرنده موردنظر) از طریق تکنیک‌های شرح داده شده در فصل ۴ به داخل حامل‌های بیانی وارد می‌شوند. سپس این حامل‌های نوترکیب به داخل سلول‌هایی که به طور نرمال گیرنده‌ی مورد نظر را سنتز نمی‌کنند، منتقل می‌شوند. (شکل ۱۵ـ۷ را مشاهده کنید). فقط تعداد بسیاری کمی از سلول‌هایی که حاوی cDNA رمزدهنده مربوط به گیرنده‌ی دلخواه است، آن را سنتز می‌کنند. سلول‌های ترانسفکت شده‌ی دیگر پروتئین‌های نامربوط را تولید می‌کنند.

1- Desensitization 2- Affinity labeling

3- Affinity chromatography

4- Functional expression assay

این سلول‌های کمیاب بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی دلخواه، از طریق تکنیک‌های متنوعی نظیر تکنیک تفکیک سلول فعال شده با فلورسانس[1] با استفاده از لیگاند با نشان فلورسانس برای گیرنده مورد نظر می‌توان شناسایی کرد. (شکل ۲۸ـ۹ را مشاهده کنید). وقتی که کلون cDNAی رمزدهنده مربوط به گیرنده شناسایی شد، توالی آن cDNA و گیرنده پروتئینی استنباط شده از آن، توالی cDNA را می‌توان تعیین کرد. سلول‌های با بیان بالای گیرنده را می‌توان برای خالص‌سازی مقدار زیادی از آن استفاده کرد، که این برای تعیین ساختار سه بُعدی آن کاربرد دارد. این اطلاعات ساختاری، مفاهیم دیگری را در مورد مکانیسم‌هایی که توسط آنها گیرنده عمل می‌کند، علاوه بر اینکه شیوه‌ای که انواع جدید داروها ممکن است با گیرنده میانکنش کند را فراهم می‌نمایند و از این در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود.

اکنون مطالعات ژنتیکی همراه با سنجش بیان عملکردی برای شناسایی ژن‌های مربوط به گیرنده‌های ناشناخته استفاده می‌شود. در این روند، توالی‌های DNA ی موجود به منظور تعیین شباهت‌ها با توالی‌های شناخته شده برای گیرنده پروتئینی آنالیز می‌شوند (فصل ۶). هر کدام از ژن‌های مربوط به گیرنده‌ی فرضی که در این کاوش شناسایی می‌شود، سپس به منظور توانایش برای اتصال به یک مولکول پیام‌رسان و یا اینکه القاء پاسخ در سلول‌های کشت شده را می‌توان با واسطه‌ی سنجش بیان عملکردی بررسی کرد.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۵

تعیین خصوصیت گیرنده‌های سطح سلولی

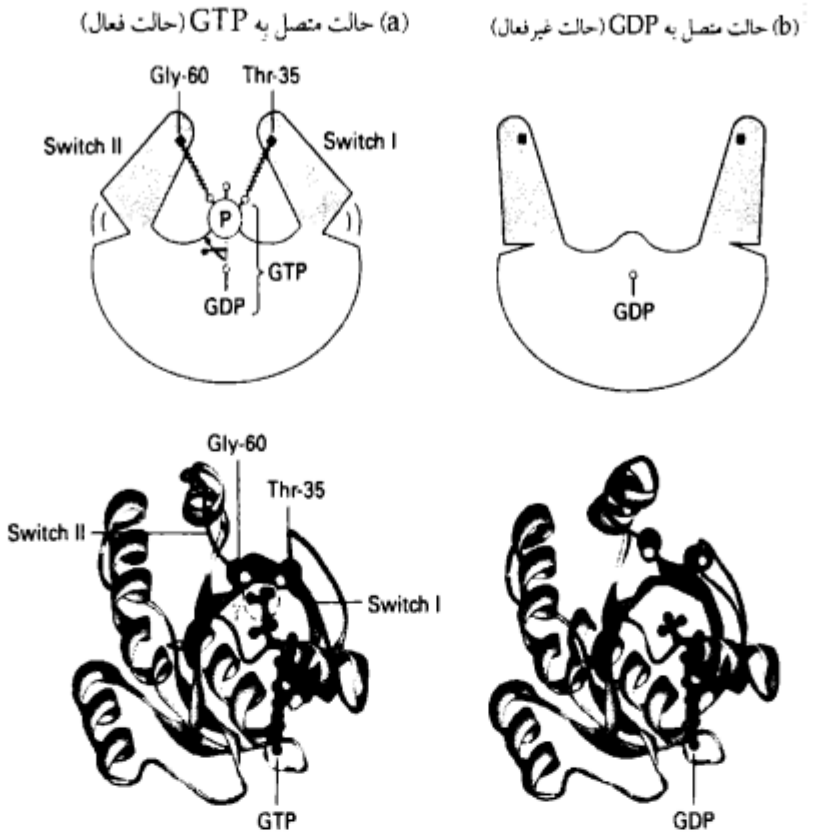
- گیرنده‌ها با ویژگی قابل ملاحظه‌ای به لیگاند متصل می‌شوند که توسط میانکنش‌های غیرکووالان بین اسیدهای‌آمینه ویژه در پروتئین گیرنده و یک لیگاند تعیین می‌شوند.
- غلظتی از لیگاند که در آن نصف گیرنده‌هایش اشغال می‌شوند (Kd) می‌تواند بطور تجربی تعیین شود و اندازه‌گیری تمایل گیرنده برای لیگاند است (شکل ۴-۱۵ را ملاحظه کنید).
- پاسخ حداکثر یک سلول به لیگاند خاص عموماً در غلظت‌هایی از لیگاند اتفاق می‌افتد که در آن اغلب گیرنده‌هایش اشغال نشده‌اند (شکل ۶-۱۵ را ملاحظه کنید).
- به خاطراینکه مقدار یک گیرنده خاص کاملاً پایین است (مقدارش از ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ مولکول بر سلول) خالص‌سازی بیوشیمیایی آن شاید امکان‌ناپذیر باشد ژن‌های رمزکننده گیرنده‌های با مقدار کم برای لیگاندهای ویژه اغلب از کتابخانه‌های ژنی منتقل شده به سلول‌های کشت داده شده می‌توانند جداسازی شوند.
- سنجش‌های بیانی عملکردی می‌توانند DNAیی را که یک گیرنده خاص را رمزدار می‌کند تعیین کنند و در مطالعه اثرات جهش‌های خاص بر روی توالی ژن بر روی عملکرد گیرنده مفید هستند (شکل ۷-۱۵ را ملاحظه نمائید).

۳ـ۱۵ اجزاء به شدت محافظت شده از مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی

پیام‌های خارجی دو نوع اصلی از پاسخ‌های سلولی را القاء می‌کنند: ۱ـ تغییرات در فعالیت و عملکرد آنزیم‌های ویژه و پروتئین‌های دیگری که قبلاً در سلول وجود داشته‌اند. ۲ـ تغییرات در مقدار پروتئین‌های ویژهٔ تولید شده توسط یک سلول (معمول‌ترین حالت توسط تغییر در فاکتورهای رونویسی که بیان ژن را تحریک یا مهار می‌کنند) (شکل ۱ـ۱۵، مرحله‌ی ❻ را ملاحظه کنید). به طور معمول اولین پاسخ در مقایسه با دومین آن با سرعت بیشتری رخ می‌دهد. پیام‌رسانی از گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها (در همین فصل با جزئیات بیشتری شرح داده می‌شود) اغلب سبب تغییر در فعالیت پروتئین‌های از قبل موجود می‌شود، به رغم آنکه فعال شدن این گیرنده‌ها در برخی سلول‌ها، تغییر در بیان ژن‌ها را نیز القاء می‌کند. دسته‌های دیگر گیرنده‌ها در درجه‌ی اول عمل می‌کنند. (اما نه منحصراً برای تنظیم بیان ژن) فاکتورهای رونویسی فعال شده در سیتوزول در این مسیرها به سمت داخل هسته حرکت می‌کنند، جایی که آنها رونویسی ژن‌های هدف ویژه‌ای را تحریک (گاهی سرکوب) می‌کنند. ما این مسیرهای پیام‌رسانی را که رونویسی بسیاری از ژن‌های لازم برای تقسیم سلول و برای بسیاری از فرایندهای تمایز سلولی را تنظیم می‌کنند، در این فصل بحث می‌کنیم.

تعدادی از پروتئین‌های داخل سلولی یا مولکول‌های کوچک در انواع متنوعی از مسیرهای انتقال پیام به‌کاربرده می‌شوند. این عوامل آنزیم‌های سیتوزولیک را القاء می‌کنند که این آنزیم‌ها نیز گروه‌های فسفات را به پروتئین‌های هدف ویژه اضافه یا حذف می‌کنند. اتصال لیگاند به گیرنده، این آنزیم‌ها را فعال و یا اینکه مهار می‌کند و عمل این آنزیم‌ها نیز به نوبهٔ خود فعالیت پروتئین‌های هدف‌شان را فعال یا مهار می‌کند. G - پروتئین‌ها (عامل دیگری برای بسیاری از مسیرهای انتقال پیام) بین

1- Fluorescence - activated cell sorting



▲**شکل ۸ـ۱۵ مکانیسم سویچ کردن مربوط به G- پروتئین‌ها.** توانایی G- پروتئین‌ها برای برهمکنش با پروتئین‌های دیگر و لذا انتقال پیام، در وضعیت اتصال به GTP (روشن) و وضعیت اتصال به GDP (خاموش) تفاوت دارد. (a) در حالت فعال (روشن)، دو دُمین با نامهای سویچ I و سویچ II به فسفات γ انتهایی GTP به واسطه‌ی میانکنش با گروه آمیدی اصلی ریشه‌های حفاظت شده ترئونین و گلیسین متصل می‌شود. رها شدن فسفات γ به وسیله هیدرولیز کاتالیز شده با GTPase موجب تغییر ساختمان فضایی سویچ I و II می‌شود. (حالت خاموش مکانیسم مشابه روبان، زیرواحد a را در G- پروتئین‌های سه تایی را بین ساختمان فضایی‌های فعال و غیرفعال با تحرک به قطعه سویچ تغییر می‌دهند).

دو وضعیت شاتل می‌کنند، یکی با اتصال GTP که قادر به فعال کردن پروتئین‌های دیگر است و وضعیت دیگری که به GDP متصل شده و غیرفعال است. چندین مولکول کوچک (از قبیل Ca^{2+} و cAMP) نیز در مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی غالباً استفاده می‌شوند. بالا رفتن غلظت یکی از این مولکول‌ها موجب اتصالشان به یک پروتئین هدف داخل سلولی می‌شود که این امر سبب تغییر ساختمان فضایی در آن پروتئین می‌شود و بدین ترتیب فعالیتش تنظیم می‌گردد. در اینجا ویژگی‌های پایه‌ای این مولکول انتقال پیام داخل سلولی را مرور می‌کنیم. اصول و استثنائات حاکم بر شیوه‌ای که آنها مسیرهای پیام‌رسانی را مدیریت می‌کنند در بخش‌های بعدی این فصل توضیح داده شده است.

پروتئین‌های اتصال یابنده به GTP غالباً در نقش کلیدهای خاموشی/روشن، به‌کار برده می‌شوند

ما گروه بزرگی از پروتئین‌های داخل سلولی را با نقش کلیدی معرفی کردیم که **اَبَر خانواده GTPase**[1] در فصل ۳ را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتید گوانین، وقتی که به GTP متصل‌اند، روشن، و پس از هیدرولیز GTP به GDP خاموش می‌شود (شکل ۳۲ـ۳ را مشاهده کنید). تبدیل القاء شونده توسط سیگنال وضعیت غیرفعال به فعال، به وسیلهٔ **فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین**[2] (GEF) وساطت می‌شود که سبب آزاد شدن GDP از پروتئین سویچ می‌شود.

اتصال بعدی GTP (از طریق غلظت بالای داخل سلولی آن نسبت به تمایل اتصالش تسهیل می‌شود) یک تغییر ساختمان فضایی را حداقل در دو قطعه شدیداً حفظ شده‌ی پروتئین (تحت عنوان سویچ I و II) القاء می‌کند که این پروتئین را به اتصال و فعال

1- GTPase Superfamiliy

2- Guanine nucleotide - exchange factor

شدن دیگر پروتئین‌های پیام‌رسان پایین دست ترغیب می‌کند (شکل ۸ـ۱۵).

سپس فعالیت ذاتی GTPase مربوط به پروتئین نامبرده GTP متصل را به GDP و Pi هیدرولیز می‌کند و بنابراین سبب تغییر ساختمان فضایی از سویچ I و II مربوط به فرم فعال به فرم غیرفعال می‌شود. سرعت هیدرولیز GTP طول زمان باقی ماندن در ساختمان فضایی فعال پروتئین سویچ و توانایی آن را برای سیگنال پایین دست تنظیم می‌کند.

سرعت پایین‌تر هیدرولیز GTP، پروئین مذکور را مدت زمان بیشتری در وضعیت فعال نگه می‌دارد. سرعت هیدرولیز GTP، اغلب، به وسیله‌ی پروتئین‌های دیگری تنظیم می‌شود. برای مثال، هم پروتئین‌های فعال کننده‌ی GTPase[1] یا GAP و هم پروتئین‌های تنظیم‌گر پیام‌رسانی G - پروتئین[2] یا RGS، هیدرولیز GTP را سرعت می‌بخشند. بسیاری از تنظیم گرهای فعالیت G- پروتئین‌ها خودشان به وسیله پیام‌های خارج سلولی کنترل می‌شوند.

دو دسته بزرگ از پروتئین‌های سویچ GTPase در پیام‌رسانی استفاده می‌شوند. G - پروتئین‌های سه زیرواحدی (بزرگ)[3] که قبلاً در مورد آنها اشاره شد، به طور مستقیم به گیرنده‌های خاصی در سطح سلول متصل شده و بدین طریق فعال می‌شوند. گیرنده فعال شده در نقش یک GEF عمل می‌نماید و رها شدن GDP و اتصال GTP را آغاز می‌کند.

G - پروتئین‌های تک زیر واحدی (کوچک) [4]، نظیر پروتئین‌های Ras و پروتئین‌های ویروسی شبه Ras، نقش مهمی را در بسیاری از مسیرهای تنظیم‌کننده تقسیم سلولی و تحرک سلولی دارند. این G - پروتئین‌ها، غالباً در سرطان‌ها متحمل جهش‌های فعالگر می‌شوند. پروتئین‌های Ras به طور غیرمستقیم از طریق پروتئین‌های آداپتور و پروتئین‌های GEF که در فصل بعدی بحث خواهد شد، به گیرنده‌ها متصل می‌شوند. تمامی پروتئین‌های سویچ G، حاوی ناحیه‌ی شبه سویچ I و سویچ II هستند که فعالیت پروتئین‌های اثرگر خاص را به واسطه‌ی میانکنش پروتئین - پروتئین در زمان اتصال GTP به G - پروتئین تنظیم می‌کنند. علی رغم این تشابهات، دو دسته مذکور از پروتئین‌های متصل شونده به GTP، از طریق راه‌های بسیار متفاوتی تنظیم می‌شوند.

پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها تقریباً در تمامی مسیرهای پیام‌رسانی کار می‌کنند

فعال‌سازی تقریباً همه‌ی گیرنده‌های سطح سلول، تغییرات مستقیم یا غیرمستقیم را در فسفریلاسیون پروتئین از طریق فعال شدن **پروتئین کینازها** (اضافه‌کننده گروه فسفات به ریشه‌های اسیدآمینه‌ای خاص) یا **پروتئین فسفاتازها** (حذف کننده‌ی گروه‌های فسفات) هدایت می‌کنند. سلول‌های جانوری، دارای دو نوع پروتئین کیناز هستند: ۱ـ آنهایی که فسفات را به گروه هیدروکسیل بر روی ریشهٔ تیروزین اضافه می‌کنند. ۲ـ آنهایی که فسفات را به گروه هیدروکسیل موجود در ریشه‌های سرین یا ترئونین (یا هر دو) اضافه می‌کنند.

فسفاتازها می‌توانند به طور هماهنگ با کینازها در خاموش یا روشن کردن فعالیت پروتئین‌های متنوع عمل نمایند (شکل ۳۳ـ۳ را مشاهده کنید). ژنوم انسان حداقل، ۶۰۰ پروتئین کیناز و ۱۰۰ فسفاتاز مختلف را رمزدهی می‌کند. در برخی از مسیرهای پیام‌رسانی، خود گیرنده، فعالیت فسفاتازی و کینازی ذاتی دارد، در مسیرهای دیگر، گیرنده‌ها با کینازهای سیتوزولیک یا متصل به غشاء میانکنش می‌کند. مهم‌تر اینکه فعالیت تمامی کینازها شدیداً تنظیم می‌شود. عموماً فعالیت کاتالیتیک خود پروتئین کیناز با واسطه‌ی فسفریلاسیون توسط کینازهای دیگری تنظیم می‌شود (با اتصال مستقیم به پروتئین‌های دیگر و یا به وسیله‌ی تغییر در سطح مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی). آبشار حاصل از فعالیت پروتئین‌کینازها، یک ویژگی عمومی بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی است.

به طور کلی، هر پروتئین کیناز، ریشه‌های اسیدآمینه‌ای ویژه‌ای را در مجموعه‌ای از پروتئین‌های هدف که الگوی بیانشان در انواع مختلف سلول‌ها متفاوت است، فسفریله می‌کند. بسیاری از پروتئین‌ها، برای چندین کیناز، سوبسترا هستند که هر یک از این کینازها اسیدهای‌آمینه متفاوتی را فسفریله می‌کنند. وقوع هر فسفریلاسیون، می‌تواند فعالیت پروتئین هدف خاصی را در مسیر متفاوتی تغییر دهد بدین صورت که برخی فعال‌کننده و برخی مهارکننده فعالیت آن هستند. مثالی که بعداً با آن روبرو می‌شویم، گلیکوژن فسفریلاز - کیناز است که یک آنزیم تنظیم‌کننده کلیدی در متابولیسم گلیکوژن محسوب می‌شود.

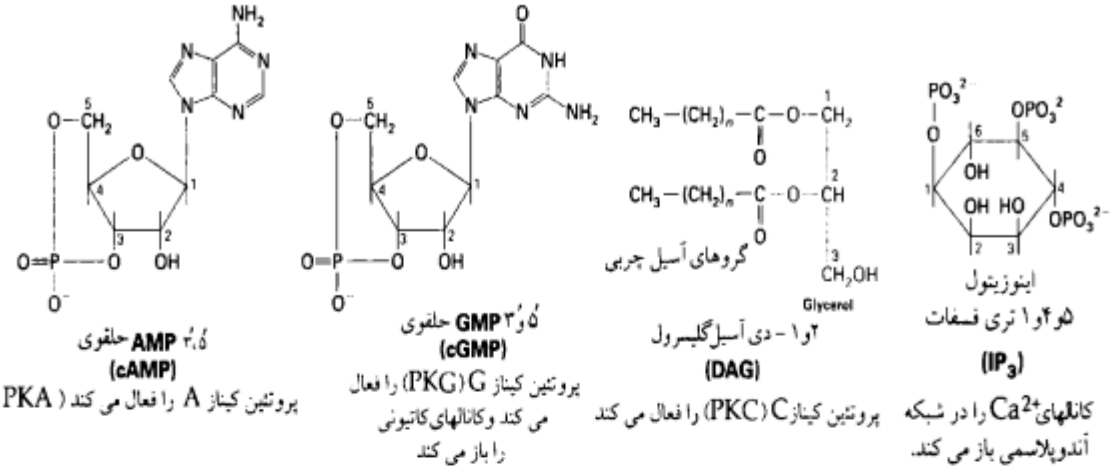
فعالیت تمامی پروتئین کینازها با عملکرد پروتئین فسفاتازها، در مقابل هم قرار می‌گیرند که البته برخی از اینها خودشان، به وسیله‌ی

1- GTPase activating proteins

2- Regulator Of G protein Simnaling

3- Trimeric (Large) G Proteins

4- Monomeric (Small) G proteins



▲**شکل ۹ـ۱۵ چهار پیامبر ثانویه داخل سلول عمومی:** اثر اصلی و مستقیم و یا اثرات هر ترکیبی در پایین فرمول ساختاری آن نشان داده شده است یون کلسیم (Ca^{2+}) و همچنین تعدادی از مشتقات فسفاتیدیل اینوزیتول متصل به غشاء در نقش پیامبر ثانویه عمل می‌کنند.

پیام‌های خارج سلولی تنظیم می‌شوند. لذا، فعالیت یک پروتئین در سلول می‌تواند ماحصل عملکرد پیچیده‌ای از فعالیت معمولاً کینازهای چندگانه و فسفاتازهای مؤثر به روی آن باشد. چندین مثال از این پدیده، در تنظیم چرخه سلولی رخ می‌دهد (در فصل ۲۰ بحث می‌شود).

پیامبرهای ثانویه، پیام‌ها را از بسیاری از گیرنده‌ها، حمل و تشدید می‌کنند

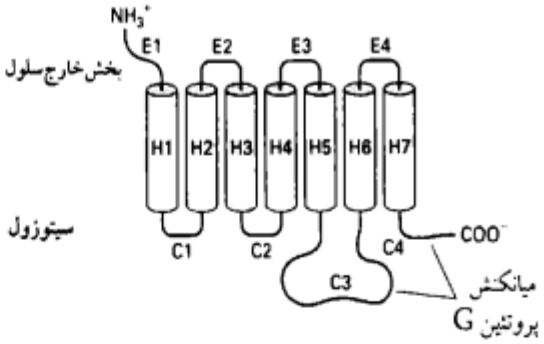
اتصال لیگاندها (پیامبرهای نخستین) به بسیاری از گیرنده‌های سطح سلول، منجر به افزایش (یا کاهش) کوتاه‌مدت در غلظت مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی با وزن مولکولی پایین ویژه، تحت عنوان پیامبر ثانویه[1] می‌شوند.

یک پیامبر ثانویه مورد استفاده در تقریباً همه سلول‌های موجودات پرسلولی[2] یون کلسیم (Ca^{2+}) است. در فصل ۱۱ متذکر شدیم که غلظت Ca^{2+} آزاد در سیتوزول به واسطه‌ی پمپ‌های وابسته به انرژی ATP بسیار پایین (مولار $\approx 10^{-7}$) نگه داشته می‌شود که به طور مداوم Ca^{2+} را به خارج سلول و یا داخل شبکه آندوپلاسمی (ER) انتقال می‌دهند.سطح سیتوزولی Ca^{2+} می‌تواند از ۱۰ تا ۱۰۰ برابر از طریق رهایی القاء شده به وسیله‌ی پیام از ذخایر شبکه آندوپلاسمی و یا به واسطه‌ی ورودشان با کانال‌های کلسیمی از محیط خارج سلولی، افزایش یابد. در عضله، افزایش غلظت Ca^{2+} با القاء پیام، انقباض را آغاز می‌کند (شکل ۳۳ـ۱۷ را ملاحظه کنید). در سلول اندوکرین،افزایش مشابه در غلظت Ca^{2+}، گزوسیتوز وزیکول‌های ترشحی حاوی هورمون‌ها را القاء می‌کند. در سلول‌های عصبی، افزایش Ca^{2+} منجربه اگزوسیتوز وزیکول‌های حاوی ناقل عصبی (فصل ۲۳) می‌شود. در همه سلول‌ها این افزایش غلظت Ca^{2+} به وسیله‌ی پروتئین‌های اتصال یابنده به Ca^{2+} (به ویژه خانواده EF hand) نظیر کالمودولین با موتیف مارپیچ - حلقه - مارپیچ[3] احساس می‌شود (شکل ۹a ـ۳ را ملاحظه کنید). اتصال Ca^{2+} به کالمودولین و دیگر پروتئین‌های EF hand، موجب تغییر ساختمان فضایی اینها می‌شود. این تغییر، مجوز اتصال به پروتئین‌های هدف متنوع و بدین وسیله خاموش و روشن شدن فعالیت‌شان را صادر می‌کند (شکل ۳۱ـ۳ را ملاحظه کنید).

cAMP (AMP حلقوی)، پیامبر ثانویه تقریباً عمومی مورد استفاده در پیام‌رسانی است. در بسیاری از سلول‌های یوکاریوتی، بالا رفتن غلظت cAMP فعال‌سازی پروتئین کیناز ویژه‌ای را آغاز می‌کند که اینها نیز به نوبه‌ی خود، تغییرات متنوعی را در متابولیسم سلولی انواع مختلفی از سلول‌ها القاء می‌کنند. در دیگر سلول‌ها، cAMP فعالیت کانال‌های یونی خاصی را تنظیم می‌کند. ساختار cAMP و سه نوع دیگر از پیامبرهای ثانویه عمومی در شکل ۹ـ۱۵ نشان داده شده است. در بخش‌های بعدی از این فصل، نقش‌های ویژه پیامبرهای ثانویه را در انتقال پیام فعال شده توسط گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها، بررسی خواهیم کرد.

به دلیل اینکه پیامبرهای ثانویه مانند Ca^{2+} و cAMP، با سرعتی بسیار بالاتر از پروتئین‌ها، در سرتاسر سیتوزول پخش

1- Second messenger 2- Metazoan
3- Helix - loop - helix



▲**شکل ۱۰-۱۵، ساختار کلی گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها:** همه این نوع گیرنده‌ها، جهت‌گیری یکسانی را در غشاء دارند و حاوی هفت ناحیه مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء (H_1-H_7)، چهار قطعه خارج سلولی (E_1-E_4) و ۴ قطعه سیتوزولیک (C_1-C_4) هستند. قطعه C-ترمینال (C_4)، لوپ C_3 و در برخی از گیرنده‌ها لوپ C_2 در میانکنش با G-پروتئین تری‌مریک جفت شده با آن درگیر می‌شوند.

می‌شوند، لذا در مسیرهایی به کار برده می‌شوند که هدف پایین دست در ذره‌ای داخل سلول و یا اندامکی (مانند وزیکول‌های ترشحی) دور از گیرنده‌ی غشاء پلاسمایی قرار دارد. مزیت دیگر پیامبرهای ثانویه این است که تشدید یک پیام خارج سلولی را تسهیل می‌کنند. فعال‌سازی گیرنده‌ای منفرد در سطح سلول می‌تواند موجب افزایش محتمل هزار برابری غلظت cAMP یا Ca^{2+} در سیتوزول شود. هر یک از اینها به نوبه‌ی خود، با فعال کردن پروتئین هدف‌شان، فعالیت چند پروتئین پایین دست را تحت تأثیر قرار خواهند داد.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۵

اجزاء به شدت حفظ‌شده مسیرهای انتقال پیام درون سلولی

- پروتئین کینازها و فسفاتازها در همه مسیرهای پیام‌رسانی به کارگرفته می‌شوند، فعالیت‌های آنها تا حد زیادی توسط گیرنده‌ها تنظیم می‌شود.
- سایر پروتئین‌های حفاظت‌شده در بسیاری از مسیرهای انتقال پیام عمل می‌کنند مانند G پروتئین‌های خاموش و روشن‌کننده مونومری وتری‌مری.
- غلظت‌های سیتوزولی پیامبرهای ثانویه (از قبیل Ca^{2+} و cAMP) در پاسخ به اتصال لیگاند به گیرنده‌های سطح سلول افزایش می‌یابد و یا گهگاهی پائین می‌آید (شکل ۹-۱۵ را ملاحظه کنید). این مولکول‌های پیام رسان داخل سلول با وزن مولکولی کم و غیرپروتئینی فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی پروتئین‌ها را در مسیرهای پیام رسانی سلولی تنظیم می‌کنند.

۴-۱۵ اجزاء عمومی سیستم‌های گیرنده‌ای جفت شده با G- پروتئین‌ها

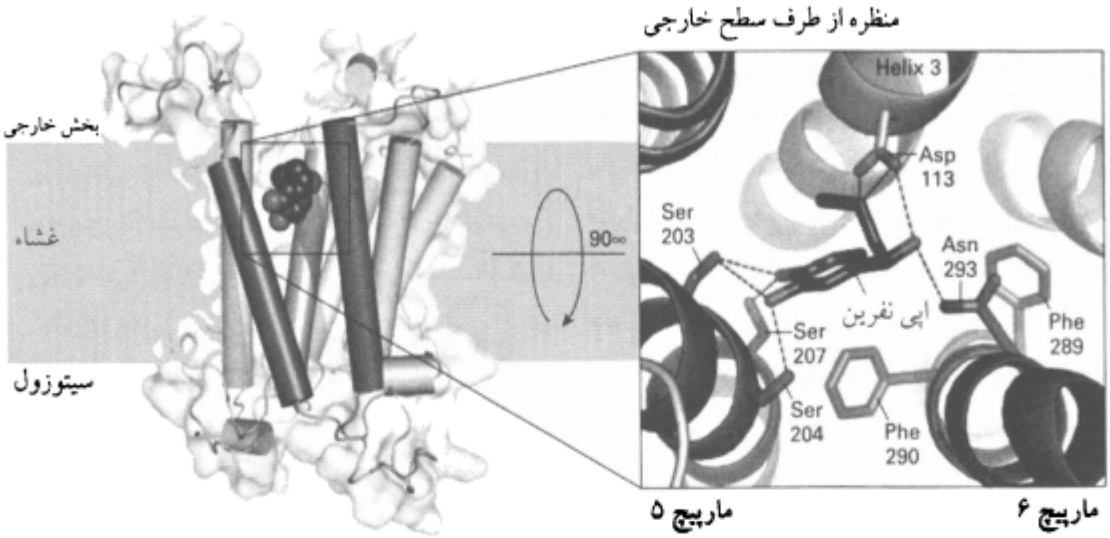
همانگونه که در بالا اشاره شد، شاید پرشمارترین دسته از گیرنده‌ها از مخمر تا انسان، گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها هستند. ($GPCR_S$). فعال‌سازی گیرنده‌ها به وسیله‌ی اتصال لیگاند، موجب فعال‌سازی G - پروتئین‌های سه جزیی جفت شده با آنها می‌شوند، که اینها نیز با پروتئین‌های پایین دست انتقال پیام میانکنش می‌کنند. تمامی GPCR ها در مسیرهای پیام‌رسانی، در اجزاء عمومی زیر اشتراک دارند: ۱ـ گیرنده‌ای که حاوی ۷ دُمین گذرنده از غشاء است. ۲ـ G - پروتئین‌های سه جزیی جفت شده با آنها که در حکم یک سویچ چرخه‌ای بین حالت‌های فعال و غیرفعال فعالیت می‌کنند. ۳ـ پروتئین اثرگر متصل شده به غشاء ۴ـ تنظیم پس نوردی[1] و حساسیت‌زدایی مسیر پیام‌رسانی. پیامبر ثانویه نیز در مسیرهای GPCR وجود دارد. این عوامل به صورت واحدی هستند و می‌توانند برای کسب تعداد حیرت‌آوری از مسیرهای مختلف با هم جفت‌وجور شوند. مسیرهای GPCR معمولاً اثرات کوتاه مدت در سلول دارند که این اثرات را به واسطه‌ی تغییرات سریع و گذرا در پروتئین‌های موجود (آنزیم‌ها یا کانال‌های یونی) انجام می‌دهند. لذا این مسیرها به سلول اجازه‌ی پاسخ سریع به مجموعه متنوعی از پیام‌ها را می‌دهند، خواه این پیام‌ها محرک‌های محیطی مانند نور و یا محرک‌های هورمونی مانند اپی‌نفرین باشند.

در این بخش، نخست ویژگی‌های عمومی انتقال پیام با واسطه‌ی GPCR را بررسی می‌کنیم و سپس، هر یک از عوامل متصل شده به غشاء را به ترتیب گیرنده، G پروتئین‌های سه جزیی و پروتئین‌های اثرگر را مورد بحث قرار می‌دهیم. در بخش‌های ۵-۱۵ و ۷-۱۵ مسیرهای GPCR را شرح دادیم که چندین پروتئین اثرگر مختلف درگیر می‌شوند. پیام‌رسانی کوتاه مدت شرح داده شده در این بخش اغلب توانایی تبدیل شدن به پیام‌رسانی لازم برای تغییر رونویسی و در نتیجه آن تمایز سلولی را دارند. (در فصل ۱۶ شرح داده شده است).

گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها خانواده‌ای بزرگ و متنوع با ساختار و فعالیت مشترک هستند

همه‌ی گیرنده‌های جفت‌شده با G- پروتئین‌ها جهت‌گیری یکسانی در غشاء دارند و علاوه بر این دارای هفت مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء (H_1-H_7)، چهار قطعه خارج سلولی و چهار قطعه سیتوزولیک

1- Feedback



▲**شکل ۱۱ـ۱۵. مدل ساختاری کمپلکس شکل گرفته بین اپی‌نفرین و گیرنده β_2- آدنرژیک** (تصویر سمت چپ)، مکان نزدیک به فسفولیپید دولایه‌ای غشاء نشان داده شده است. سه مارپیچ آلفا که در اتصال اپی‌نفرین سهیم‌اند، شامل مارپیچ ۵، مارپیچ ۳ و مارپیچ ۶ می‌باشند. سمت راست تصویری از سمت خارج است. اپی‌نفرین با چند ریشه اسیدآمینه‌ای گیرنده در سطح غشاء میانکنش می‌دهد. گروه آمین آنها با زنجیره جانبی کربوکسیل آسپارتات ۱۱۳ (D^{113}) در مارپیچ ۳ (H3) میانکنش یونی برقرار می‌کند. حلقه کاتکول در میانکنش آبگریز با فنیل آلانین ۲۹(F^{29}). در مارپیچ ۶ (H6) شرکت می‌کنند و علاوه بر این دو گروه هیدروکسیل بر روی حلقه کاتکول، با گروه‌های هیدروکسیل در ۳ ریشه سرین (S^{207} و S^{204} و S^{203}) مارپیچ ۵، پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند.

هستند (شکل ۱۰ـ۱۵).

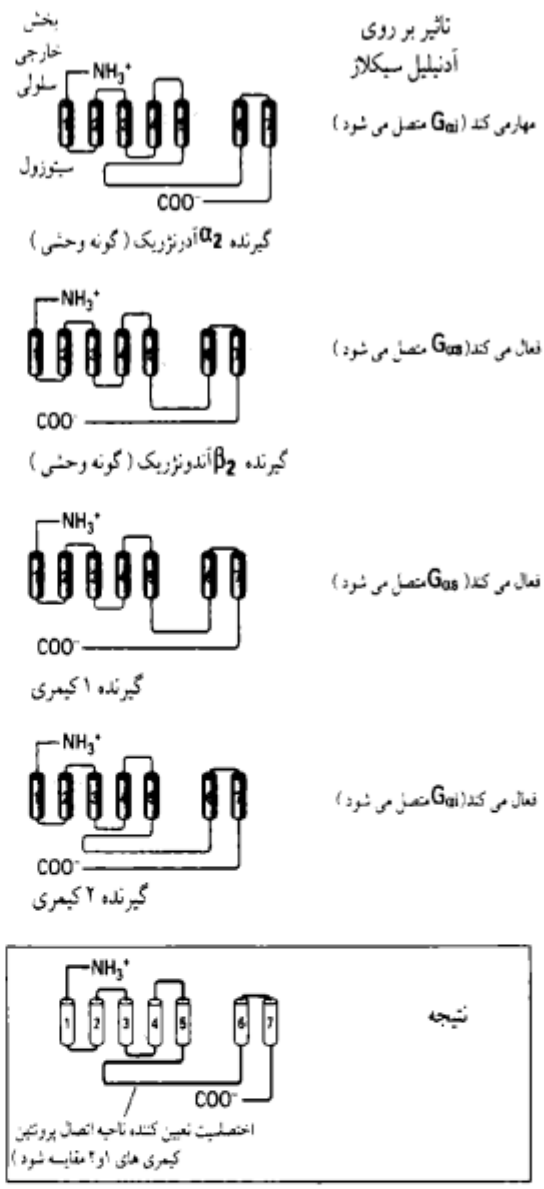
همواره، N - ترمینال آنها روی سطح خارج سلولی غشاء پلاسمایی است. قطعه C - ترمینال (C_4) و لوپ C_3 و در برخی گیرنده‌ها لوپ C_2، در میانکنش با G پروتئین سه جزیی جفت شده با آن درگیر هستند. زیرخانواده‌های زیادی از این گیرنده جفت شده با G - پروتئین‌ها وجود دارند که از نظر تکاملی حفاظت شده هستند. اعضاء این زیرخانواده‌ها به خصوص در توالی اسیدآمینه‌ای و ساختار مشابهند.

سطح خارجی تمامی گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها، عمدتاً از اسیدهای‌آمینه آبگریز تشکیل شده است که این امر به پروتئین‌های مذکور امکان لنگراندازی پایدار را در هسته آبگریز غشاء پلاسمایی می‌دهد. یکی از گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین که جزئیات مولکولی ساختار آن به خوبی شناخته شده است، ردوپسین[1] نام دارد. این گیرنده از پروتئین اپسین[2] تشکیل شده که به طول کوالان به رنگیزه‌ی جذب‌کننده‌ی نور مرئی با نام ۱۱ - سیس - رتینال[3] متصل شده است. در ردوپسین پروتئین اپسین دارای هفت مارپیچ آلفا است که به طور محکم به غشاء متصل شده‌اند. این هفت مارپیچ آلفا، یک بخش مرکزی را که رتینال با پیوند کوالان به آن متصل شده را به طور کامل احاطه می‌کنند. در این حالت، اتصال لیگاند (رتینال) موجب تغییر ساختمان فضایی در گیرنده نمی‌شود، بلکه جذب کوانتوم از نور توسط رتینال متصل شده، سبب تغییر در ساختمان فضایی اُپسین شده و بدین صورت فعال می‌شود (در بخش ۵ـ۱۵ بحث شده است).

اسیدهای‌آمینه‌ای که درون گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند، تنوع زیادی دارند که این امر موجب می‌شود که گیرنده‌های مختلف به مولکول‌های کوچک بسیار متفاوتی متصل شوند (آب دوست مانند اپی‌نفرین و آبگریز مانند رتینال و بسیاری از مواد خوشبو). شکل ۱۱ـ۱۵ مدلی از کمپلکس تشکیل شده بین گیرندهٔ β_2- آدرنرژیک و هورمون اپی‌نفرین را نشان می‌دهد. تصور می‌شود که اپی‌نفرین همانند رتینال، به سطح میانی غشاء متصل می‌شود (در این حالت با پیوند غیرکوالان) و با اسیدهای‌آمینه موجود در سطح داخلی چند مارپیچ آلفای عبورکننده از طول غشاء میانکنش می‌کند.

همانند مثال زده شده برای تنوع و نحوه عملکرد پروتئین‌های GPCR، گیرنده‌های وابسته به G - پروتئین مربوط به اپی‌نفرین را بحث خواهیم کرد که در انواع مختلف سلول‌های پستانداران پیدا

1- Rhodopsin 2- Opsin
3- 11 - Cis - retinal



▲شکل تجربی ۱۲ـ۱۵، مطالعات با گیرنده آدرنژیک نوترکیب، لوپ بزرگ C_3 را به عنوان عاملی مهم برای میانکنش با G- پروتئین‌ها نشان می‌دهد. اووسیت گزنوپوس با mRNAی رمزدهنده گیرنده‌های نوع وحشی α_2 و β_2 آدرنژیک و یا گیرنده‌های $\alpha-\beta$ کیمری ریز تزریق (میکروانجکشن) شد. به رغم آنکه اووسیت‌های گزنوپوس به طور نرمال گیرنده‌های آدرنژیک را بیان نمی‌کنند، G- پروتئین‌هایی را بیان می‌کنند که قادر به جفت شدن با گیرنده‌های بیان شده خارجی موجود بر روی سطح اووسیت‌های میکروانجکت شده هستند. فعالیت آدنیلیل سیکلاز سلول‌های مذکور در حضور آگونیست‌های اپی‌نفرین تعیین و نشان داده می‌شوند. خواه گیرنده آدرنژیک بیان شده به G- پروتئین اووسیت تحریکی ($G\alpha_s$) و خواه مهاری ($G\alpha_i$) متصل شده باشد. مقایسه گیرنده نوترکیب نوع ۱ (که با G_{as} میانکنش می‌دهد) با گیرنده نوترکیب نوع ۲ (که با G_{ai} میانکنش می‌دهد) نشان می‌دهد که ویژگی ابتدایی G- پروتئین عمدتاً توسط منشا لوپ C_3 در سمت سیتوزول بین مارپیچ آلفای ۵ و ۶ تعیین می‌شود.

می‌شود. هورمون اپی‌نفرین در وساطت پاسخ بدن به استرس (پاسخ‌های جنگ و گریز) از قبیل ترس یا تمرینات سنگین، وقتی که بافت‌ها احتمالاً نیاز بالایی را به کاتابولیزم گلوکز و اسیدهای چرب برای تولید ATP دارند اهمیت ویژه‌ای دارد. این منابع سوختی اصلی متابولیک می‌توانند به وسیله‌ی شکست سریع گلیکوژن به گلوکز در کبد و تری‌گلیسرول به اسید چرب در سلول‌های بافت چربی[1] برای چند ثانیه در خون در دسترس قرار گیرند.

در پستانداران، آزادسازی گلوکز و اسیدهای چرب می‌تواند موجب اتصال اپی‌نفرین (یا مشتق آنها نوراپی‌نفرین) به گیرنده‌های β- آدرنرژیک بر روی سطح سلول‌های کبدی و چربی شود. اپی‌نفرین متصل شده به گیرنده‌ی β - آدرنرژیکی بر روی سلول‌های عضله قلب، سرعت انقباض را افزایش می‌دهد که این نیز خون‌رسانی به بافتها را تسریع می‌کند. در مقابل، تحریک گیرنده‌های β - آدرنرژیک در روی سلول‌های عضله صاف به وسیله‌ی اپی‌نفرین، موجب شل شدن عضله می‌شود. نوع دیگری از گیرنده‌ی اپی‌نفرین (گیرنده‌ی α - آدرنرژیک) بر روی سلول‌های عضله صاف پوشاننده‌ی رگ‌های خونی، در مجرای روده‌ای، پوست و کلیه شناسایی شده است. اتصال اپی‌نفرین به این گیرنده‌ها، موجب تنگ شدن سرخرگ‌ها شده و این امر نیز سبب قطع گردش خون به این اندام‌های محیطی می‌شود. این اثرات متفاوت اپی‌نفرین کمک می‌کند که پاسخ‌های آمیخته شده و هماهنگ، در سرتاسر بدن به یک انتهای مشترک هدایت شوند و این همان تأمین انرژی مورد استفاده برای حرکت سریع عضلات حرکتی اصلی در پاسخ به استرس‌های بدنی می‌باشد. اگرچه همه گیرنده‌های α و β - آدرنرژیک به اپی‌نفرین متصل می‌شوند، ولیکن گیرنده‌های مختلف با G- پروتئین‌های متفاوتی جفت می‌شوند که مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست متفاوتی را القاء می‌کنند و این امر منجر به پاسخ‌های سلولی متفاوتی می‌شود. مطالعات بر روی گیرنده‌های آدرنرژیک نوترکیب (مشابه طرح کلی کشیده شده در شکل ۱۲ـ۱۵) بیان می‌کند که لوپ طویل C_3 حدفاصل بین مارپیچ β شماره ۵ و ۶ به منظور میانکنش بین گیرنده و G- پروتئین جفت شده با آن مهم است. احتمالاً اتصال لیگاند موجب حرکت این مارپیچ‌ها نسبت به یکدیگر می‌شود و مجوز اتصال لوپ مذکور و فعال کردن G - پروتئین را می‌دهد. مدارک دیگری نشان می‌دهد که لوپ C_2 (متصل‌کننده مارپیچ‌های ۳ و ۴) نیز در میانکنش برخی گیرنده‌ها با G - پروتئین شرکت می‌کند.

1- Adipose Cells

گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها، تبادل GTP را با GDP در زیرواحد آلفای G- پروتئین سه جزیی فعال می‌کنند

G - پروتئین سه جزئی دارای سه زیرواحد با نام‌های β، α و γ است. هم زیر واحد G_α و هم زیر واحد G_γ به واسطه‌ی مولکول‌های لیپیدی متصل به غشاء (با پیوند کوالان)، به آن متصل می‌شوند. در خلال پیام‌رسانی داخل سلولی، زیرواحدهای β و γ متصل به یکدیگر باقی می‌مانند و علاوه بر این معمولاً به عنوان زیر واحد $G_{\beta\gamma}$ نسبت داده می‌شوند. اتصال لیگاند هورمونی نرمال (مانند اپی‌نفرین) یا یک آگونیست (از قبیل ایزوپروترنول) به یک گیرنده‌ی جفت شده با G - پروتئین، موجب تغییر ساختمان فضایی لوپ‌های سطح سیتوزولی آن می‌شود و گیرنده را برای اتصال به زیرواحد G_α قادر می‌سازد (شکل ۱۳-۵، مراحل ❶ و ❷). این اتصال، GDP متصل را رها می‌کند و لذا گیرنده فعال شده با اتصال لیگاند، در نقش فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین (GEF) برای زیرواحد G_α عمل می‌کند (مرحله ❸). سپس GTP به سرعت به جایگاه خالی نوکلئوتید گوانین در زیر واحد G_α متصل می‌شود و این موجب تغییر ساختمان فضایی در قطعات با نقش سویچ آن می‌شود (شکل ۱۵-۸ را ملاحظه کنید). این تغییرات اتصال G_α را با هم گیرنده و هم زیرواحد $G_{\alpha\gamma}$ ضعیف می‌کند (مرحله ❹).

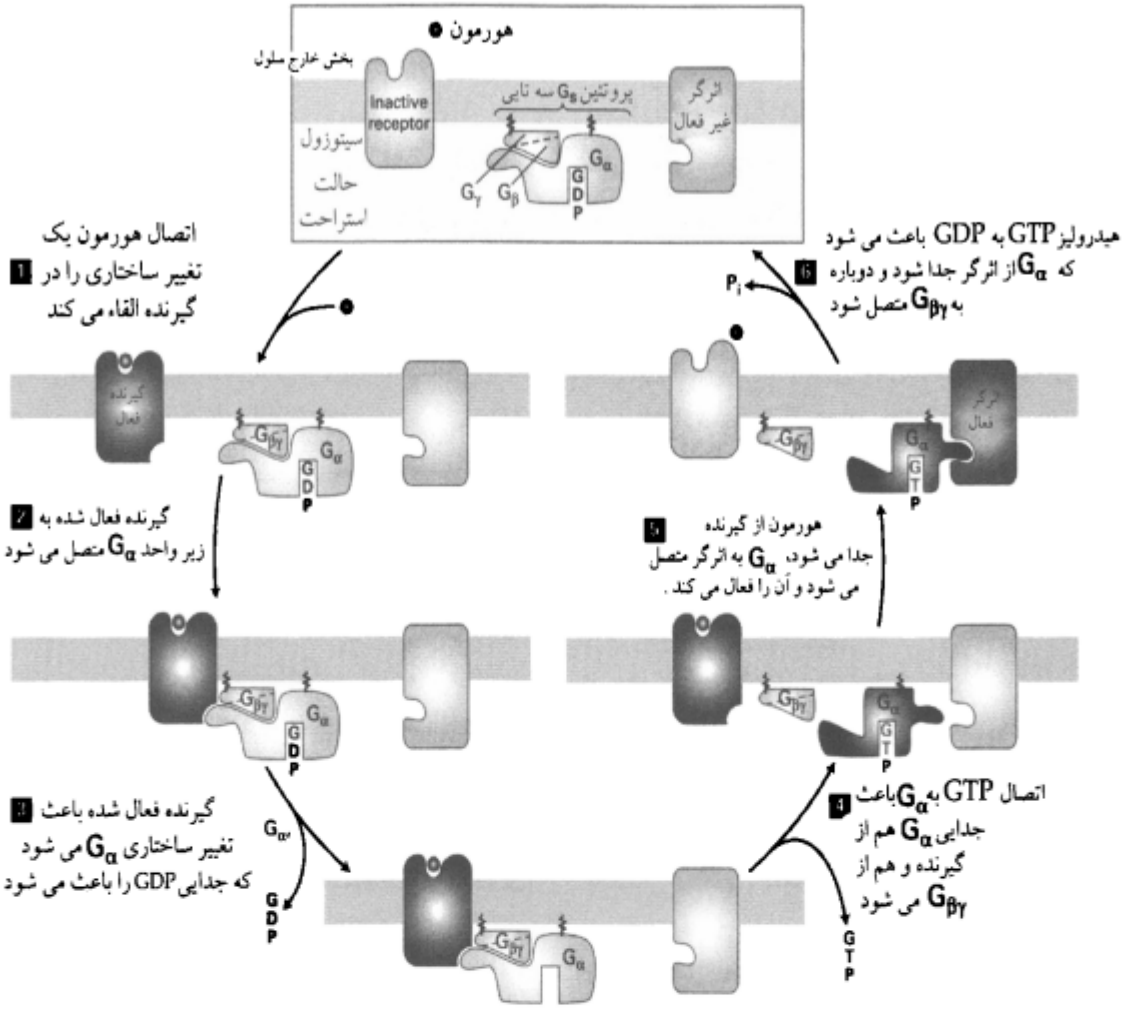
در اکثر موارد، G_α متصل به GTP (G_α.GTP) که متصل به غشاء باقی می‌ماند، به یک پروتئین اثرگر متصل به غشاء متصل و آن را فعال می‌کند (در شکل ۱۵-۳، مرحله ❺ نشان داده شده است). در برخی موارد، G_α.GTP اثرگر مذکور را مهار می‌کند. علاوه بر این، بسته به نوع سلول و G - پروتئین، زیرواحد $G_{\beta\gamma}$ رها شده از کمند زیرواحد α، گاهی اوقات پیامی را به واسطه‌ی میانکنش با یک پروتئین اثرگر منتقل می‌کند.

به هرحال، وضعیت فعال G_α (G_α.GTP) طول عمر کوتاهی دارد، زیرا GTP متصل شده بعد از چند دقیقه به GDP هیدرولیز می‌شود که این به وسیله فعالیت ذاتی GTPase زیرواحد G_α کاتالیز می‌شود (شکل ۱۵-۳ مرحله ❻ را ملاحظه کنید). سپس ساختمان فضایی G_α، به وضعیت غیرفعال G_α (G_α.GDP) برگشت می‌کند و موجب مهار فعال‌سازی هرچه بیشتر پروتئین اثرگر می‌شود. سرعت هیدرولیز GTP با اتصال کمپلکس G_α.GTP به اثرگر بیشتر تشدید می‌شود و لذا اثرگر در نقش پروتئین فعال‌کننده GTPase (GAP) عمل می‌کند. این مکانیسم به طور قابل ملاحظه‌ای، مدت فعال‌سازی اثرگر را کاهش می‌دهد و علاوه بر این مانع از وقوع واکنش‌های شدید سلولی می‌شود. در بسیاری از موارد همچنین پروتئین غیراثرگر RGS هیدرولیز GTP را با واسطه‌ی زیرواحد G_α افزایش می‌دهد و علاوه بر این مدت زمان بقاء اثرگر در وضعیت فعال را کاهش می‌دهد. G_α.GDP حاصله به سرعت مجدداً به $G_{\beta\gamma}$ متصل شده و کمپلکس برای میانکنش با گیرنده فعال شده آماده و تک‌تک فرایندها را بارها و بارها آغاز می‌کند. از این رو، سیستم انتقال پیام GPCR حاوی یک مکانیسم ذاتی پس نورد (فیدبک) است که تضمین می‌کند پروتئین اثرگر فقط برای مدت زمان کوتاه (از چند ثانیه تا چند دقیقه) پس از فعال شدن گیرنده، فعال باشد. فعال‌سازی مداوم گیرنده از طریق اتصال لیگاند برای طولانی شدن فعال‌سازی اثرگر ضروری است.

مدارک اولیه مدل نشان داده شده در شکل ۱۳-۱۵ را حمایت می‌کنند. این مدل از مطالعات بر روی ترکیباتی که توانایی اتصال به زیرواحد G_α همانند GTP را دارند، به دست آمده است. اما با این تفاوت که به واسطهٔ فعالیت ذاتی GTPase آن هیدرولیز نمی‌شوند. در برخی از این ترکیبات، پیوند فسفودی‌استر (P-O-P) اتصال دهنده فسفات‌های β و γ در ساختمان GTP، با پیوندهای غیرقابل هیدرولیز نظیر $P\text{-}CH_2\text{-}P$ یا P-NH-P جایگزین می‌شود. آنالوگ‌های دیگر GTP نسبت به آنالوگ‌های فراورده‌های غشاء پلاسمائی در حضور لیگاند طبیعی یا آگونیست برای یک گیرنده خاص سبب افزایش بسیار بیشتر فعال‌سازی پروتئین اثرگر وابسته به آن در مقایسه با GTP می‌شود. در این تجربه، وقتی که آنالوگ GTP غیرقابل هیدرولیز، با GDP متصل به زیر واحد G_α مبادله می‌شود، این اتصال به طور پایداری باقی می‌ماند. به دلیل آنکه کمپلکس آنالوگ با زیرواحد G_α به همان اندازه کمپلکس نرمال GTP با زیرواحد G_α (G_α.GTP) عمل می‌کند، بنابراین اثرگر مذکور به طور دائمی فعال باقی می‌ماند.

تفکیک G - پروتئین‌های سه زیرواحدی با واسطه‌ی GPCR، اخیراً در سلول‌های زنده شناسایی شده است. این مطالعات از پدیده انتقال انرژی فلورسانس[1] بهره برده‌اند. اساس این پدیده، تغییر طول موج ساطع شده از نور فلورسانس در اثر میانکنش دو پروتئین فلورسانس است. شکل ۱۴-۱۵ نشان می‌دهد که چگونه این روند تجربی، تفکیک کمپلکس $G_\alpha.G_{\beta\gamma}$ را در مدت چند ثانیه از اضافه شدن لیگاند اثبات می‌کند و بدین ترتیب مدارک اضافی برای مدل چرخه‌ای G- پروتئین فراهم می‌کند. این دستورالعمل تجربی و عمومی می‌تواند برای تشکیل و تفکیک کمپلکس‌های پروتئین - پروتئین دیگر در سلول‌های زنده استفاده شود.

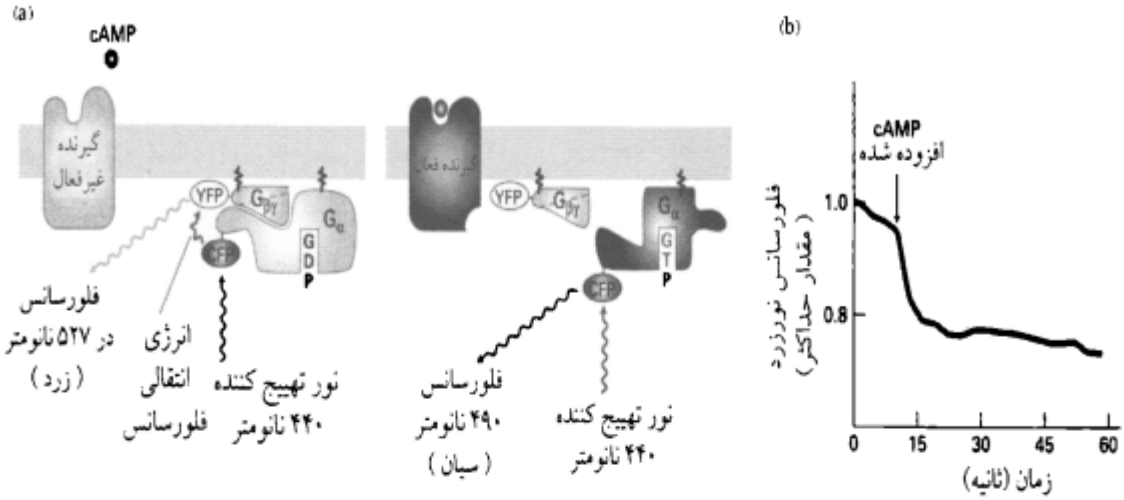
1- Fluorescence energy transfer



▲**شکل ۱۵ـ۱۳ مکانیسم عمومی فعال‌سازی پروتئین اثرگر متصل به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین** زیر واحدهای $G\alpha$ و $G\beta\gamma$ مربوط به G- پروتئین‌های سه زیرواحدی به وسیله مولکول‌های لیپیدی متصل به غشاء یا پیوند کوالان با غشاء اتصال برقرار می‌کنند. به دنبال اتصال لیگاند، تبادل CDP با GTP و تفکیک زیرواحدهای G- پروتئین (مراحل ❶ تا ❹)، کمپلکس آزاد $G\alpha$-GTP به پروتئین اثرگر متصل و آن را فعال می‌کند. (مرحله ❺) هیدرولیز GTP به پیام‌رسانی خاتمه می‌دهد و منجر به تجمع مجدد G-پروتئین سه زیرواحدی و بازگشت سیستم به وضعیت استراحت می‌شود (مرحله ❻). اتصال مولکول لیگاند دیگر موجب تکرار چرخه می‌شود. در برخی از مسیرهای پیام رسانی، پروتئین اثرگر با زیرواحد آزاد $G\beta\gamma$ فعال می‌شود.

G- پروتئین‌های مختلف توسط GPCR های متفاوتی فعال شده و اینها نیز به نوبه خود پروتئین‌های اثرگر متفاوتی را تنظیم می‌کنند

تمامی پروتئین‌های اثرگر در مسیر GPCR، یا کانال‌های یونی چسبیده به غشاء و یا آنزیم‌هایی کاتالیزکنندهٔ تشکیل پیامبرهای ثانویه نشان داده شده در شکل ۱۵ـ۹ هستند. این تنوع را در موضوع پیام‌رسانی از مسیر GPCR بررسی شده در بخش‌های ۱۵ـ۵ و ۱۵ـ۷ بالا می‌برد، چون چندین G- پروتئین در ژنوم یوکاریوت‌ها رمزدهی می‌شود. در انسان، حداقل ۲۱ نوع مختلف از زیرواحد G_α به وسیله ۱۶ ژن رمزدهی می‌شوند (چند نوع از اینها محتمل پیرایش متناوب می‌شوند) و علاوه بر این ۶ نوع زیرواحد G_γ و ۱۲ نوع زیر واحد G_γ وجود دارد. آنچنانکه تاکنون مشخص شده است، زیرواحدهای $G_{\beta\gamma}$ مختلف به طور مشابه فعالیت می‌کنند. در جدول ۱۵ـ۱ فعالیت دسته‌های اصلی G-پروتئین‌ها با زیرواحدهای G_α مختلف به طور خلاصه بیان شده است. برای مثال، انواع مختلف گیرنده‌های اپی‌نفرین که قبلاً به آنها اشاره شد، با G- پروتئین‌های مختلفی جفت می‌شوند که به گونه‌ای دیگر اثرگرها را تحت تأثیر قرار می‌دهند و لذا اثرات متفاوتی در رفتار سلول‌های هدف‌شان دارند. هر دو زیر نوع از گیرنده‌های β - آدرنرژیک (β_1 و β_2) با یک G- پروتئین



▲**شکل تجربی ۱۴-۱۵ (شکل رنگی) فعال‌سازی G- پروتئین‌ها در سلول‌های آمیب با اتصال دُمین لیگاند رخ می‌دهد.** در آمیب Dictyostelium discoideum، cAMP به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان خارج سلولی عمل می‌کند و به گیرنده جفت شده با G- پروتئین متصل می‌شود (پیامبر ثانویه نیست). سلول‌های آمیبی با ژن‌های رمزگذار ۲ پروتئین ادغامی ترنسفکت شدند: $G\alpha$ ادغام شده با پروتئین فلورسنّت سیان (CFP) (جهش یافته پروتئین فلورسنت سبز) و $G\beta$ ادغام شده با نوع دیگری از GFP (پروتئین فلورسنت زرد (YFP)). CFP به طور نرمال نور فلورسانس با طول موج ۴۸۰ نانومتر و YFP، با طول موج ۵۲۷ نانومتر از خود ساطع می‌کنند. وقتی که CFP و YFP نزدیک یکدیگرند (هنگام استراحت کمپلکس $G\alpha.Gbg$)، انتقال انرژی فلورسنس می‌تواند بین CFP و YFP رخ دهد. (چپ). از این رو، پرتو افشانی سلول‌های در حال استراحت با نور با طول موج ۴۴۰ نانومتری (که به طور مستقیم CFP را تحریک می‌کند ولی تأثیر روی YFP ندارد) موجب صدور نور با طول موج ۵۲۷ نانومتر (ویژه YFP) می‌شود. ولیکن در صورتی که اتصال لیگاند منجر به تفکیک زیر واحدهای $G\alpha$ و $G\beta\gamma$ شود، صدور انرژی فلورسانس نمی‌تواند رخ دهد. در این حالت، پرتوافشانی سلول‌ها در ۴۴۰ نانومتر، موجب صدور نور با طول موج ۴۸۰ نانومتری (سایان) ویژه CFP می‌شود. (راست) (b) نمودار صدور نور زرد (۵۲۷ نانومتر) از یک سلول آمیب ترنسفکت شده، قبل و بعد از اضافه شدن cAMP خارج سلولی (لیگاند برای گیرنده جفت شده با G-پروتئین در این سلول‌ها)، کاهشی در صدور نور زرد، که نتیجه‌ای از تفکیک پروتئین ادغامی $G\alpha.CFP$ از پروتئین ادغامی $G\beta\gamma$-YFP است، در چند ثانیه از اضافه شدن cAMP رخ می‌دهد.

جدول ۱-۱۵: دسته‌های اصلی G پروتیین‌های سه تایی پستانداران و اثرات آنها

دسته G_α	اثرگر مرتبط	پیامبر ثانویه	مثالهایی برای گیرنده‌ها
$G_{\alpha s}$	آدنیلیل سیکلاز	cAMP (افزایش)	گیرنده β آدرنرژیک (اپی نفرین)، گیرنده‌های گلوکاگن، سروتونین، وازوپرسین
$G_{\alpha i}$	آدنیلیل سیکلاز کانال K^+($G_{\beta\gamma}$)اثرگر را فعال می‌کند)	cAMP (کاهش)	گیرنده α_2 - آدرنرژیک، گیرنده موسکارینی استیل کولین
$G_{\alpha olf}$	آدنیلیل سیکلاز	cAMP (افزایش)	گیرنده‌های بویایی در بینی
$G_{\alpha q}$	فسفولیپاز C	DAG,IP_3 (افزایش)	گیرنده‌های α_1 - آدرنرژیک
$G_{\alpha o}$	فسفولیپاز C	DAG,IP_3 (افزایش)	گیرنده استیل کولین در سلول‌های اندوتلیال
$G_{\alpha t}$	GMP فسفودی استراز	GMP (کاهش)	رودوپسین (گیرنده نور) در سلول‌های استوانه‌ای

* زیر دسته‌های معین از $G\alpha$ به بیش از یک پروتئین اثرگر متصل می‌شوند. تاکنون، فقط یک $G_{\alpha s}$ اصلی شناسایی شده است، اما پروتئین‌های متعدد از $G_{\alpha q}$ و $G_{\alpha i}$ شرح داده شده‌اند. پروتئین‌های اثرگر عموماً با $G\alpha$ تنظیم می‌شوند ولیکن در برخی موارد به وسیله $G\beta\gamma$ یا عملکرد ترکیبی $G\alpha$ و $G\beta\gamma$ صورت می‌پذیرد.

تحریکی یا[1] G_s جفت می‌شود که زیرواحد آلفای این G- پروتئین ($G_{\alpha s}$) آنزیم اثرگر متصل به غشاء با نام آدنیلیل سیکلاز[2] را فعال می‌کند. وقتی که این آنزیم فعال شد، سنتز پیامبر ثانویه cAMP را کاتالیز می‌کند.

در مقابل، گیرنده آدرنرژیک α_2 با یک $G_{\alpha i}$ پروتئین جفت می‌شود که آدنیلیل سیکلاز (آنزیم افکتور مشابه همراه با گیرنده‌های β - آدرنرژیک) را مهار می‌کند. پروتئین $G_{\alpha q}$ که با گیرنده α_1 - آدرنرژیک جفت می‌شود، آنزیم اثرگر متفاوتی را فعال می‌کند (فسفولیپاز C). فسفولیپاز C دو پیامبر ثانویه دیگر را فعال می‌کند (IP_3 و DAG). نمونه‌هایی از مسیرهای پیام‌رسانی که در هر یک از G_α - پروتئین‌ها کاربرد دارد، در جدول ۱-۱۵ فهرست شده است. (در سه بخش بعدی شرح داده خواهند شد).

سم برخی از باکتری‌ها حاوی زیرواحدی است که غشاء پلاسمایی سلول پستانداران را سوراخ کرده و تغییرات شیمیایی G_α - پروتئین‌ها را در سیتوزول کاتالیز می‌کنند. این تغییرات موجب مهار هیدرولیز GTP متصل، به GDP می‌شود .برای مثال، سم تولید شده به وسیله‌ی باکتری ویبریوکلرا[3] که موجب وبا[4] می‌شود و یا اینکه سوش خاصی از E.coli، $G_{\alpha s}$ - پروتئین‌ها را در سلول‌های پوششی روده تغییر می‌دهند. بنابراین، $G_{\alpha s}$ در وضعیت فعال باقی مانده و به طور مداوم آدنیلیل سیکلاز را در فقدان تحریک هورمونی فعال می‌کنند. افزایش بیش از حد غلظت cAMP داخل سلولی حاصل، منجر به از دست دادن آب و الکترولیت‌ها به داخل حفره روده می‌شود که این امر موجب اسهال آبکی مختص عفونت به این باکتری می‌شود. توکسین تولید شده به وسیله بوردتلا پرتوسیس[5] (باکتری که عموماً موجب عفونت مجرای تنفسی و بیماری سیاه سرفه می‌شود) تغییری را در $G_{\alpha i}$ کاتالیز می‌کند که از رها شدن GDP متصل، جلوگیری می‌کند. لذا $G_{\alpha i}$ در وضعیت غیرفعال بلوکه شده و مهار آدنیلیل سیکلاز کاهش می‌یابد. افزایش حاصله در cAMP، در سلول‌های اپی‌تلیال مجاری هوایی به از دست دادن مایعات و الکترولیت‌ها و مخاط ترشحی کمک می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۵

اجزاء عمومی سیستم گیرنده جفت‌شده با G پروتئین

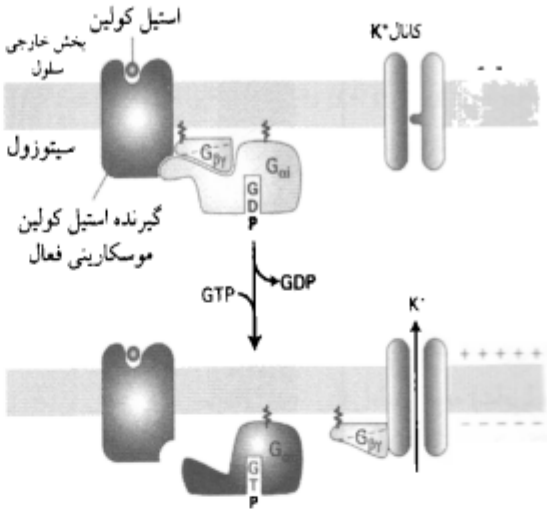
- گیرنده‌های جفت‌شده به G پروتئین یک خانواده بزرگ و متنوع با یک ساختار مشترک از مارپیچ‌های آلفای هفت بارگذرنده از غشاء هستند.
- G پروتئین پیام‌ها را از گیرنده‌های سطح سلولی جفت‌شده به پروتئین‌های اثرگر متصل به غشاء مرتبط منتقل می‌کنند که یا آنزیم‌هایی هستند که پیامبرهای ثانویه تولید می‌کنند (مانند آدنیلیل سیکلاز) یا پروتئین‌های کانال یونی هستند (جدول ۱-۱۵ را ملاحظه کنید).
- پیام‌ها اغلب توسط $G\alpha$، (پروتئین روشن / خاموش کننده با فعالیت GTPase که بین حالت فعال متصل به GTP و (روشن) و حالت غیر فعال متصل به GDP (خاموش) تغییر می‌یابد. زیرواحدهای γ و β که متصل به همدیگر باقی می‌مانند پیام‌ها را منتقل می‌کنند.
- گیرنده‌های اشغال شده با هورمون بصورت فاکتورهای تبادل نوکلئوتیدگوانین (GEFها) برای پروتئین‌های $G\alpha$ عمل می‌کنند و جداسازی GDP و اتصال GTP را کاتالیز می‌کنند. تغییر حاصل در ساختار نواحی روشن / خاموش کننده در $G\alpha$ باعث جدایی آن از زیرواحد $G\beta\gamma$ و گیرنده می‌شود و با یک پروتئین اثرگر میانکنش می‌دهد.
- آزمایشات انتقال انرژی فلورسانس تجزیه بواسطه گیرنده زیرواحدهای $G\alpha$ جفت‌شده و $G\beta\gamma$ را در سلول‌های زنده توجیه می‌کند (شکل ۱۴-۱۵ را ملاحظه کنید).

۵-۱۵ گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین که کانال‌های یونی را تنظیم می‌کنند

یکی از ساده‌ترین پاسخ‌های سلولی به پیام، باز شدن کانال‌های یونی لازم برای انتقال ضربان عصبی است. ضربان‌های عصبی برای ادراک حسی محرک‌های محیطی از قبیل نور و بوهای معطر و انتقال به مغز و از آنجا به عضله حرکتی به منظور تحریک آن لازم و ضروری هستند. در خلال انتقال ضربان عصبی، باز و بسته شدن سریع کانال‌های یونی موجب تغییر پتانسیل غشاء می‌شود. بسیاری از گیرنده‌های ناقلین عصبی، کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند هستند که در پاسخ به اتصال لیگاند باز می‌شوند. این گیرنده‌ها شامل برخی از انواع گلوتامات، سروتونین و گیرنده استیل کولین نظیر گیرنده استیل‌کولین موجود در سیناپس عصب - عضله هستند. کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند که در نقش گیرنده‌های ناقلین عصبی فعالیت می‌کنند، در فصل ۲۲ بررسی شده‌اند.

با این حال، برخی از گیرنده‌های ناقلین عصبی، گیرنده‌های

1- Stimulatory G protein
2- Adnelylyl cyclase
3- Vibrio cholera
4- Cholera
5- Bordetella pertusis



▲ **شکل ۱۵ـ۱۵ فعال‌سازی گیرنده موسکارینی استیل کولین و کانال اثرگر K^+ در عضله قلب.** اتصال استیل کولین موجب فعال کردن زیرواحد $G\alpha_i$ و تفکیک آن از زیرواحد $G\beta\gamma$ در این مسیر می‌شود. (شکل ۱۵ـ۱۳ را ملاحظه کنید). در این حالت، زیرواحد $G\beta\gamma$ رها شده (به جای $G\alpha_i$.GTP) به پروتئین اثرگر وابسته متصل و آن را باز می‌کند (کانال K^+). فزایش در نفوذپذیری K^+، غشاء را هیپرپلاریزه می‌کند، که این امر نقباض عضله قلب را کاهش می‌دهد. به رغم آن‌که در اینجا نشان داده نشده است، فعال‌سازی وقتی خاتمه می‌یابد که GTP متصل شده به $G\alpha_i$ به GDP هیدرولیز شده و علاوه بر این $G\alpha_i$.GTP با $G\beta\gamma$ ترکیب شود.

جفت شده با G - پروتیئنی هستند که پروتئین اثرگر آنها یک کانال سدیمی (Na^+) و یا پتاسیمی (K^+) می‌باشد. اتصال ناقلین عصبی به این گیرنده‌ها موجب باز یا بسته شدن کانال‌های یونی وابسته به آنها شده که این نیز سبب تغییر در پتانسیل غشاء می‌شود. با وجود این، گیرنده‌های ناقلین عصبی دیگر، علاوه بر گیرنده‌های مواد معطر در بینی و گیرنده‌های نوری در چشم، گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین هستند که به طور غیرمستقیم فعالیت کانال‌های یونی را به واسطه‌ی عمل پیامبرهای ثانویه تنظیم می‌کنند. در این قسمت، دو گیرنده‌ی جفت شده با G- پروتئین را مورد بررسی قرار می‌دهیم که مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم را برای تنظیم کانال‌های یونی از خود نشان می‌دهند. اینها شامل گیرنده‌ی موسکارینی استیل کولین قلب و ردوپسین فعال شونده با نور در چشم هستند.

گیرنده‌های استیل کولین در عضله قلبی G- پروتئین بازکننده‌ی کانال‌های پتاسیمی (K^+) را فعال می‌کنند

فعال شدن گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین[1] در عضله‌ی قلبی، سرعت انقباض قلب را نشان می‌دهد. (به دلیل اینکه موسکارین (آنالوگ استیل کولین) نیز این گیرنده را فعال می‌کند، آنها را **موسکارینیک**[2] می‌نامند). این نوع از گیرنده استیل کولین با یک $G\alpha_i$ پروتئین جفت می‌شود و علاوه بر این، اتصال لیگاند منجر به باز شدن کانال‌های K^+ وابسته به آن (پروتئین اثرگر) در غشاء پلاسمایی می‌شود. (جدول ۱ـ۱۵ را ملاحظه کنید). انتشار متعاقب یون‌های K^+ از سیتوزول به خارج، سبب افزایش پتانسیل منفی داخلی و معمول عرض غشاء پلاسمایی می‌شود که برای چند ثانیه تداوم دارد. این وضعیت غشاء تحت نام هیپرپلاریزاسیون[3] فراوانی انقباض عضله را کاهش می‌دهد. این امر می‌تواند به طور تجربی با اضافه کردن مستقیم استیل کولین به سلول‌های عضلانی جدا شده از قلب و اندازه‌گیری پتانسیل با استفاده از میکروالکترود وارد شده به سلول، تعیین گردد. (شکل ۱۸ـ۱۱ را ملاحظه کنید).

همانگونه که در شکل ۱۵ـ۱۵ نشان داده شد، پیام از گیرنده فعال شده موسکارینی استیل کولین، به پروتئین اثرگر با رها شدن زیرواحد $G\beta\gamma$ به جای G_α.GTP انتقال داده می‌شود. $G\beta\gamma$ مذکور به طور مستقیم کانال K^+ را فعال می‌کند. این فرایند به وسیله‌ی آزمایش تکه - نگهداری[4] تعیین می‌شود، که این روش می‌تواند جریان یون را از طریق کانال یونی منفرد در قطعه‌ی کوچکی از غشاء محاسبه نماید. (شکل ۲۱ـ۱۱ را ملاحظه کنید).

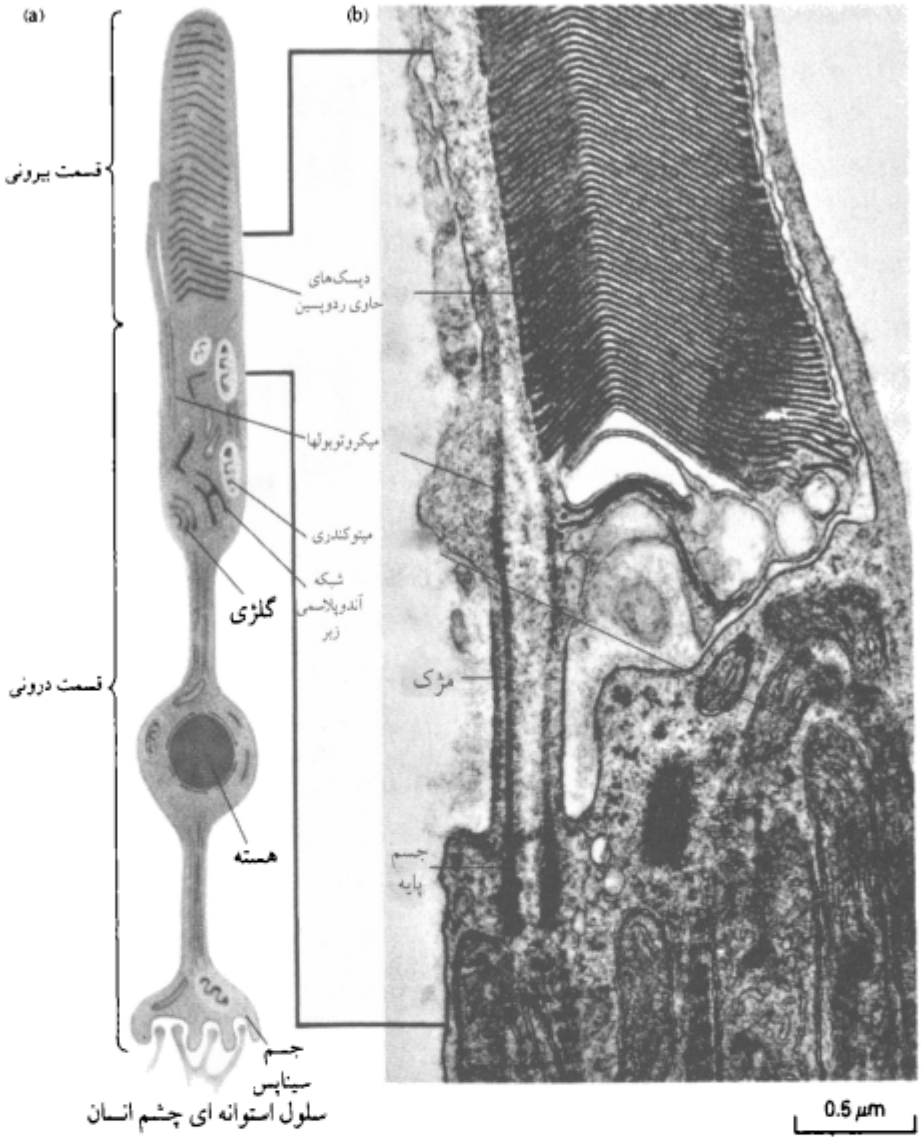
وقتی که پروتئین خالص شده‌ی $G\beta\gamma$ به طرف سیتوزولی قطعه‌ای از غشاء پلاسمایی عضله قلبی اضافه می‌شود، کانال‌های پتاسیمی حتی در عدم حضور استیل کولین یا ناقل عصبی دیگر، فورا باز می‌شود. این به وضوح نشان می‌دهد که $G\beta\gamma$- پروتئین مسئول باز شدن کانال‌های اثرگر K^+ است نه G_α.GTP.

نور ردوپسین‌های جفت شده با $G_{\alpha t}$ را فعال می‌کنند

شبکیه چشم انسان حاوی دو نوع از سلول‌های گیرنده‌ی نور است، استوانه‌ای[5] و مخروطی[6]. این سلول‌ها دریافت‌کننده‌های اولیه‌ی تحریکات نور مربی هستند. سلول‌های مخروطی در تشکیل تصویر رنگی نقش دارند، در حالی که سلول‌های استوانه‌ای به واسطه‌ی نور ضعیف همانند نور ماه، تحریک می‌شود.

همانگونه که قبلاً اشاره شد، ردوپسین از پروتئین اُپسین تشکیل

1- Muscarinic acetylcholine receptors
2- Muscarinic
3- Hyperpolarization
4- Patch - clamping
5- Rods
6- Cones



▲**شکل ۱۶ـ۱۵ سلول استوانه‌ای انسانی.** (a) طرح شماتیک یک سلول کامل استوانه‌ای. در جسم سیناپسی، سلول استوانه‌ای، با یک و یا تعداد بیشتری نورون بینابینی دو قطبی سیناپس تشکیل می‌دهد. ردوپسین (گیرنده جفت شده با G- پروتئین حساس به نور) در دیسک‌های صاف غشایی مربوط به بخش خارجی قرار گرفته است. (b) میکروگراف الکترونی ناحیه‌ای از سلول استوانه‌ای نشان داده شده به وسیله کروشه در شکل (a). این ناحیه شامل اتصال بخش‌های خارجی و داخلی است.

شده است که ساختار معمول GPCR را داشته و به طور کوالان به رنگیزه جذب‌کننده نور با نام ۱۱ - سیس - رتینال متصل می‌شود. ردوپسین شامل تعداد هزار یا بیشتر، از دیسک‌های تخت غشایی که قطعه‌ی خارجی سلول‌های استوانه‌ای را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۶ـ۱۵). سلول‌های استوانه‌ای انسان دارای ۴×۱۰^{۷} مولکول ردوپسین است. G- پروتئین سه زیرواحدی جفت شده با ردوپسین با نام ترانسدیوسین[1] (G_t) حاوی زیر واحد $G_{\alpha t}$ (جدول ۱ـ۱۵ را ملاحظه کنید) مانند ردوپسین است. $G_{\alpha t}$ تنها در سلول‌های استوانه‌ای مشاهده می‌شود. به دنبال جذب یک فوتون، نیمی از ردوپسین شبکیه، فوراً از ایزومرسیس به ترانس تبدیل می‌شوند که این امر موجب تغییر ساختمان فضایی در پروتئین اُپسین و فعال شدن آن می‌شود. (شکل ۱۷ـ۱۵).

این تغییر، معادل تغییر ساختمان فضایی است که به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین رخ می‌دهد. مشابه با گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین دیگر، شکل فعال شده با نور ردوپسین، با یک G_{α}- پروتئین میانکنش داده و آن را فعال

1- Transducin

می‌کند (در این مورد $G_{\alpha t}$). اپسین فعال شده ناپایدار است و خود به خود به دو قسمت تشکیل‌دهنده‌اش تجزیه می‌شود (اُپسین آزاد و تمام ترانس - رتینال) و بدین وسیله پیام‌رسانی برای نور مریی پایان می‌پذیرد. در تاریکی، تمام ـ ترانس ـ رتینال به ۱۱ـ سیس - رتینال بازگشت می‌کند و سپس می‌تواند به پروتئین اُپسین مجدداً متصل و ردوپسین دوباره شکل گیرد.

در تاریکی، پتانسیل غشاء سلول استوانه‌ای در حدود ۳۰ـ میلی‌ولت است که این خیلی کمتر از پتانسیل استراحت (۶۰ـ تا ۹۰ـ میلی‌ولت) معمول سلول‌های عصبی و سلول‌های فعال از نظر الکتریکی است. این وضعیت از غشاء که **دپلاریزاسیون**[1] نام دارد، موجب می‌شود که سلول‌های استوانه‌ای در تاریکی همواره ناقلین عصبی را ترشح کرده و از این رو نور و نهائی که با آنها سیناپس تشکیل می‌دهند به طور مداوم در حالت تحریک به سر ببرند. وضعیت دپلاریزه غشاء پلاسمایی مربوط به سلول‌های استوانه‌ای که در حالت استراحت هستند، منجر به باز شدن تعداد زیادی کانال‌های یونی غیرانتخابی[2] می‌شود که علاوه بر K^+، به Ca^{2+} و Na^{2+} اجازه ورود داده می‌شود. جذب نور به وسیله ردوپسین منجر به بسته شدن این کانال‌ها می‌شود که این نیز باعث منفی‌تر شدن پتانسیل داخلی غشاء است.

هنگام جذب فوتون بیشتر به وسیله ردوپسین، کانال‌های بیشتری بسته می‌شود و این با ورود کمتر Na^{2+} و Ca^{2+} از خارج غشاء و منفی‌تر شدن پتانسیل غشاء و علاوه بر این با آزاد شدن ناقلین عصبی کمتری همراه است. این تغییرات به مغز مخابره و به صورت نور مشاهده و درک می‌شود.

نکته جالب توجه اینکه، فوتون منفرد جذب شده توسط سلول در استوانه‌ای حال استراحت، پاسخ قابل ملاحظه‌ای را ایجاد می‌کند و سبب تغییر بار منفی بیشتر پتانسیل داخل غشاء تا حدود ۱ میلی‌ولت می‌شود که در دوزیستان یک یا دو ثانیه طول می‌کشد. انسان‌ها قادر به شناسایی تابشی به کوچکی پنج فوتون هستند.

فعال شدن ردوپسین، بسته شدن کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار وابسته به cGMP را القاء می‌کند

در قلب برای باز شدن کانال‌های پتاسیمی تحریک شونده با GPCR تنها فعال شدن G - پروتئین لازم است. در مقابل، بسته شدن کانال‌های کاتیونی در غشاء پلاسمایی سلول استوانه‌ای شبکیه چشم، مستلزم تغییر در غلظت پیامبرهای ثانویه‌ای نظیر GMP حلقوی (cGMP) است. (شکل ۹ـ۱۵ را ملاحظه کنید).

قطعه خارجی سلول‌های استوانه‌ای، حاوی معمولاً غلظت بالایی از cGMP (≈۰/۰۷mm) است که این همواره از GTP در واکنش کاتالیز شده با گوانیلیل سیکاز شکل می‌گیرد که به نظر می‌رسد غیر متأثر از نور باشد. با این وجود، جذب نور توسط ردوپسین، فعال‌سازی آنزیم cGMP - فسفودی استراز را موجب می‌شود (آنزیمی که تجزیه cGMP به cGMP - 5′ را کاتالیز می‌کند).

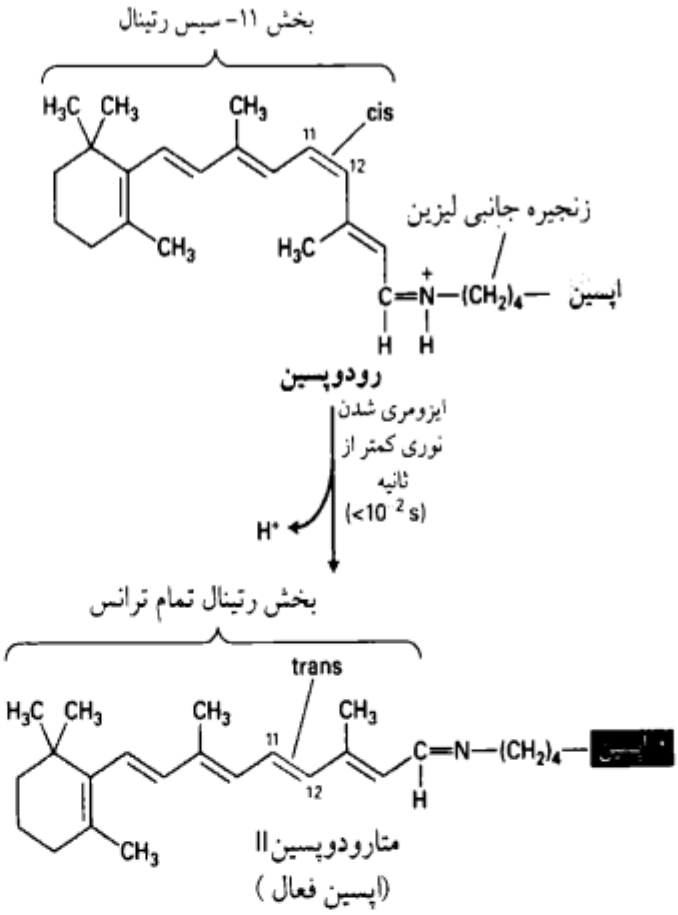
از این رو غلظت cGMP به دنبال تابش نور، کاهش می‌یابد. میزان بالای cGMP در تاریکی برای حفظ باز شدن کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار وابسته به cGMP عمل می‌کند. کاهش غلظت cGMP تحت اثر نور، منجر به بسته شدن کانال، هیپرپلاریزاسیون غشاء و کاهش رهاسازی ناقلیی عصبی می‌شود.

همانطور که در شکل ۱۸ـ۱۵ نشان داده شده، آنزیم cGMP - فسفودی استراز، پروتئین اثرگر برای $G_{\alpha t}$ است. کمپلکس آزاد $G_{\alpha t}$ GTP. که به دنبال جذب نور به وسیله‌ی ردوپسین تولید می‌شود، به دو زیرواحد مهاری آنزیم cGMP - فسفودی استراز متصل می‌شود و باعث آزاد شدن زیرواحدهای α و β کاتالیتیک و فعال این آنزیم شده و بدین وسیله cGMP به GMP تبدیل می‌شود. این یک مثال واضح از شیوه‌ای است که پیام القاء شده برای از بین بردن مهار، می‌تواند سریعاً یک آنزیم را فعال کند که این مکانیسم عمومی در مسیرهای پیام‌رسانی است.

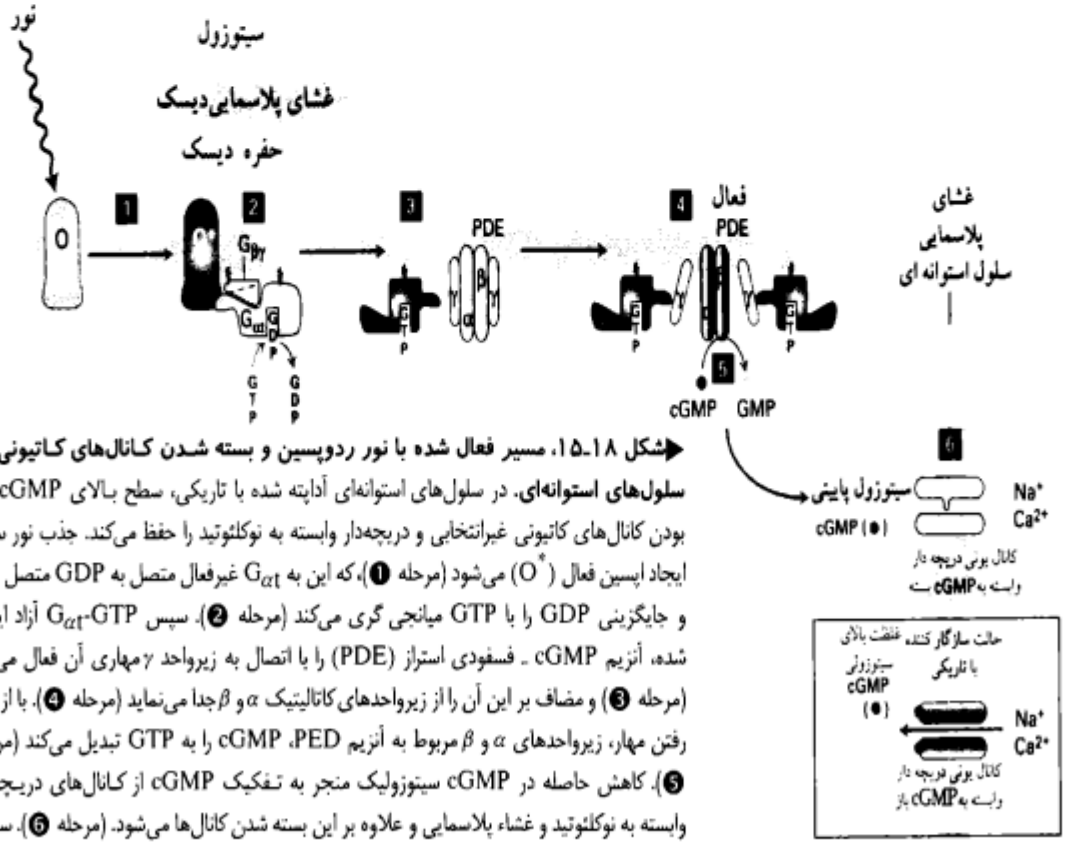
یک مولکول منفرد اُپسین فعال شده در غشاء دیسک، می‌تواند ۵۰۰ مولکول $G_{\alpha t}$ را فعال کند، که هر یک از اینها به نوبه خود یک آنزیم cGMP - فسفودی استراز را فعال می‌نماید و بدین وسیله پیام نخستین پرتو نوری آغاز این مسیر تشدید می‌شود. حمایت مستقیم در مورد نقش cGMP در فعالیت سلول استوانه‌ای شبکیه چشم در مطالعات تکه - نگهدار[3] با استفاده از قطعات جدا شده از بخش خارجی غشاء پلاسمایی به دست آمده است، که این بخش حاوی کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار وابسته به cGMP فراوانی است. وقتی که cGMP به سطح سیتوزولی این قطعات اضافه می‌شود با افزایش سریع در تعداد کانال‌های یونی باز همراه است. cGMP به طور مستقیم به جایگاهی بر روی کانال پروتئینی برای حفظ باز نگه داشتن آنها متصل می‌شود که این نشان می‌دهد که این کانال‌های، دریچه‌دار وابسته به نوکلئوتید هستند.

مشابه با کانال‌های پتاسیمی بحث شده در فصل ۱۱، کانال دریچه‌دار وابسته به cGMP حاوی چهار زیرواحد است (شکل

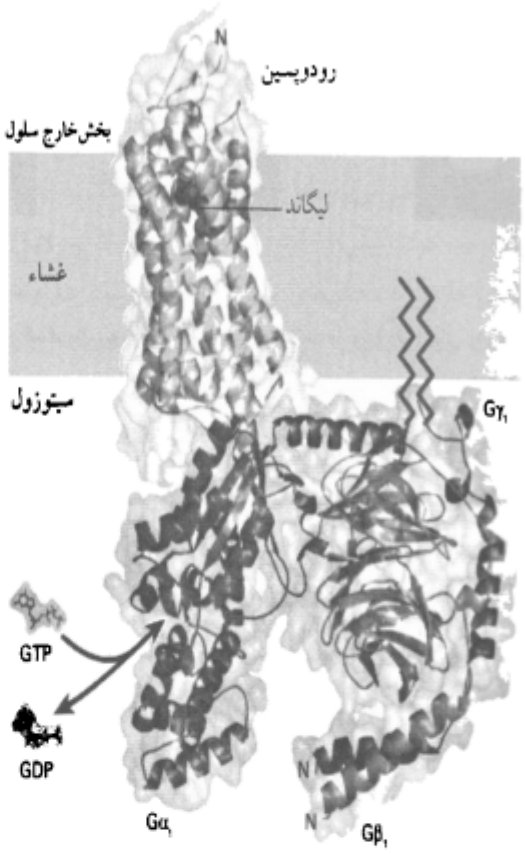
1- Depolarization 2- Nonselective
3- Patch - clamping



شکل ۱۵-۱۷، مرحله آغاز با نور در بینایی، رنگیزه جذب‌کننده نور ۱۱- سیس - رتینال به یک گروه آمینو از باقیمانده لیزین در اُپسین با پیوند کوالان متصل می‌شود (بخش پروتئینی از ردوپسین). جذب نور سبب فوتوایزمدیزاسیون سریع سیس- رتینال متصل شده به ایزومر تمام- ترانس و تشکیل حد واسط ناپایدار متا- ردوپسین II (اُپسین فعال شده) می‌شود که این پروتئین Gt را فعال می‌کند. در مدت چند ثانیه، تمام- ترانس- رتینال از اوپسین جدا شده و توسط یک آنزیم به ایزومرسیس تبدیل شود که این نیز مجدداً به مولکول اُپسین دیگری متصل می‌شود.



شکل ۱۵-۱۸، مسیر فعال شده با نور ردوپسین و بسته شدن کانال‌های کاتیونی در سلول‌های استوانه‌ای. در سلول‌های استوانه‌ای آداپته شده با تاریکی، سطح بالای cGMP باز بودن کانال‌های کاتیونی غیرانتخابی و دریچه‌دار وابسته به نوکلئوتید را حفظ می‌کند. جذب نور سبب ایجاد اپسین فعال (O^*) می‌شود (مرحله ❶)، که این به $G_{\alpha t}$ غیرفعال متصل به GDP متصل شده و جایگزینی GDP را با GTP میانجی گری می‌کند (مرحله ❷). سپس $G_{\alpha t}$-GTP آزاد ایجاد شده، آنزیم cGMP - فسفودی استراز (PDE) را با اتصال به زیرواحد γ مهاری آن فعال می‌کند (مرحله ❸) و مضاف بر این آن را از زیرواحدهای کاتالیتیک α و β جدا می‌نماید (مرحله ❹). با از بین رفتن مهار، زیرواحدهای α و β مربوط به آنزیم PED، cGMP را به GTP تبدیل می‌کند (مرحله ❺). کاهش حاصله در cGMP سیتوزولیک منجر به تفکیک cGMP از کانال‌های دریچه‌دار وابسته به نوکلئوتید و غشاء پلاسمایی و علاوه بر این بسته شدن کانال‌ها می‌شود. (مرحله ❻). سپس غشاء به طور موقت هیپرپلاریزه می‌شود.



▲شکل ۱۹ـ۱۵ مدل ساختاری ردوپسین و G- پروتئین سه زیرواحدی وابسته به آن، ترانسدوسین(Gt) . ساختار ردوپسین و زیرواحدهای $G\beta\gamma$ و $G_{\alpha t}$ با روش کریستالوگرافی اشعه x بدست آمده است. قطعه C- ترمینال ردوپسین که پس از مارپیچ ۷ گذرنده از غشاء (H_7) قرار گرفته، به داخل سیتوزول توسعه پیدا می‌کند (در این شکل نشان داده نشده است). جهت‌گیری $G_{\alpha t}$ با توجه به ردوپسین و غشاء فرضی است و این بر مبنای بار و آبگریزی سطوح پروتئین و جایگاه‌های اتصال شناخته شده ردوپسین بر روی $G_{\alpha t}$ است. همانند G- پروتئین‌های ۳ زیرواحدی دیگر، زیرواحدهای $G_{\alpha t}$ و $G\beta\gamma$ دارای لیپیدهایی هستند که با پیوند کوالان به غشاء چسبیده‌اند و تصور می‌شود که به داخل غشاء وارد می‌شوند. در شکل متصل به GDP نشان داده شده در اینجا، زیر واحد α و زیر واحد β با یکدیگر میانکنش می‌کنند (به همین صورت زیرواحدهای β و γ ولیکن زیرواحد کوچک γ که تنها دارای دو مارپیچ آلفا است، بازیرواحد α تماسی ندارد. تصور می‌شود که تعدادی از قطعات زیر واحد α با ردوپسین فعال شده میانکنش داده و سبب تغییر ساختمان فضایی می‌شود و این به رها شدن GDP و اتصال GTP کمک می‌کند. اتصال GTP به نوبه خود تغییرات ساختمان فضایی بزرگی را در نواحی سویچ G_α القاء کرده و موجبات تفکیک آن را از $G\beta\gamma$ فراهم می‌کند.

۱۹ـ۱۱ را ملاحظه کنید). در این مورد هر یک از این زیرواحدها، قادر به اتصال به مولکول cGMP هستند. ۳ یا ۴ مولکول از cGMP باید به هر کانال به منظور باز شدن آن، متصل شوند. این میانکنش آلوستریک باعث می‌شود که باز شدن کانال به تغییرات کوچک در سطح cGMP بسیار حساس باشد.

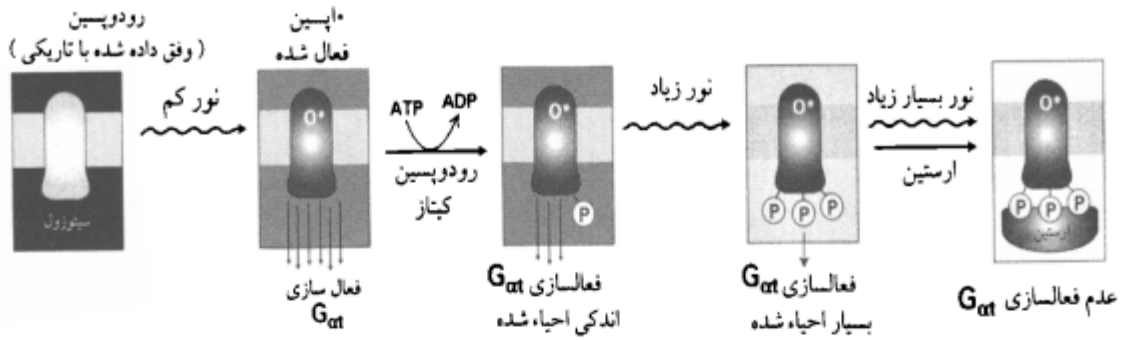
تبدیل شکل فعال $G_{\alpha t}$.GTP به شکل غیرفعال $G_{\alpha t}$.GDP با پروتئین فعال‌کننده GTPase ویژه (GAP) شدت می‌یابد. در پستانداران، $G_{\alpha t}$ به طور نرمال در وضعیت شکل فعال متصل به GTP، تنها چند ثانیه باقی می‌ماند. بنابراین، cGMP - فسفودی استراز به سرعت غیرفعال می‌شود و علاوه بر این میزان cGMP، وقتی که محرک‌های نوری حذف می‌شوند، به تدریج برای رسیدن به سطح اولیه‌اش، افزایش می‌یابد. این امکان پاسخ سریع چشم به حرکت و تغییر مکان اشیا را فراهم می‌کند.

مطالعات اخیر کریستالوگرافی اشعه X، چگونگی میانکنش زیرواحدهای پروتئین G_t را با یکدیگر و با ردوپسین فعال شده نشان می‌دهد و علاوه بر این سرنخ‌هایی را در مورد چگونگی اتصال GTP که منجر به جدا شدن G_α از $G_{\beta\delta}$ مهیا می‌کند. همانطور که در مدل ساختاری در شکل ۱۹ـ۱۵ نشان داده شده، دو سطح از $G_{\alpha t}$ با G_β میانکنش می‌دهد (ناحیه N- ترمینال نزدیک سطح غشاء و دو ناحیه سویچ I و II مجاور). این دو سطح در تمامی G_α - پروتئین‌ها مشاهده می‌شوند. G_γ به طور مستقیم با G_β تماس دارد ولی تماس مستقیم با G_α ندارد.

این مدل همچنین پیشنهاد می‌کند که دُمین اتصال به نوکلئوتید متعلق به زیرواحد $G_{\alpha t}$، همراه با لنگر لیپیدی در C- ترمینال G_γ و N- ترمینال $G_{\alpha t}$ سطحی را تشکیل می‌دهند که به ردوپسین فعال شده با نور متصل می‌شوند (در شکل ۱۸ـ۱۵ به صورت O^* نشان داده شده است) و این به رهایی GDP از $G_{\alpha t}$ و اتصال متعاقب GTP کمک می‌کند. به دنبال تغییر ساختمان فضایی در $G_{\alpha t}$ به ویژه در مناطق سویچ I و II، میانکنش مولکولی بین $G_{\alpha t}$ و $G_{\beta\gamma}$ از بین رفته و این امر منجر به تفکیک آنها می‌شود. مطالعات ساختاری بر روی ردوپسین و $G_{\alpha t}$ با اطلاعات مربوط به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین سازگار می‌باشد و مضاف بر اینکه تصور می‌شود که عموماً برای تمامی گیرنده‌ها از این نوع، قابل تعمیم است.

به دلیل فسفریلاسیون اپسین و اتصال ارستین، سلول‌های استوانه‌ای با میزان متفاوت نور محیطی خود را سازگار می‌کنند

سلول‌های مخروطی به سطح پایین نور غیرحساس‌اند و علاوه



▲شکل ۲۰ـ۱۵ سازگاری سلول استوانه‌ای با تغییرات سطح نور محیطی و فسفریلاسیون اُپسین، اُپسین فعال شده با نور (O^*) برای ردوپسین کیناز یک سوبسترا محسوب می‌شود (البته ردوپسین سازگار شده با تاریکی برای این آنزیم سوبسترا نمی‌باشد). دامنه فسفریلاسیون اپسین، با میزان مدت زمانی که هر مولکول اُپسین در شکل فعال شده با نور طی می‌کند، نسبت مستقیم دارد و از این رو به طور میانگین میزان نور محیطی بیش از چند دقیقه است. توانایی O^* برای فعال کردن $G_{\alpha t}$ با تعداد ریشه‌های فسفریله شده O^* رابطه معکوس دارد. لذا میزان بالای نور محیطی به عبارت دیگر دامنه فسفریلاسیون بالاتر اپسین و افزایش بیشتر میزان نور مورد نیاز برای فعال کردن تعداد یکسان از مولکول‌های $G_{\alpha t}$ را می‌طلبد. در میزان شدت بالای نور ارستین به اُپسین کاملاً فسفریله شده متصل شده و کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که به هیچ وجه قادر به فعال کردن $G_{\alpha t}$ نیست.

بر این فعالیت سلول‌های استوانه‌ای در شدت بالای نور مهار می‌شوند. بدین ترتیب، وقتی که ما از روشنایی نور در روز به سمت اتاقی با روشنایی بسیار ضعیف حرکت می‌کنیم، در ابتدا نابینا هستیم. چون سلول‌های استوانه‌ای به آهستگی به نور ضعیف حساس می‌شوند، از این رو ما نیز به تدریج قادر به دیدن و تشخیص اشیاء می‌شویم. این روند انطباق بینایی[1] سلول‌های استوانه را قادر به درک کنتراست یک صد هزار برابر بیشتر از سطح نور محیط می‌سازد. این دامنه‌ی وسیع از حساسیت امکان‌پذیر است، به این دلیل که تفاوت‌ها در سطح نور در حوزه بینایی (به جای میزان مطلق نور جذب شده) برای تشکیل تصاویر مرئی استفاده می‌شود. تنظیم وابسته به نور مسیر پیام‌رسانی ردوپسین (شکل ۱۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید) مسئول این دامنه‌ی فوق‌العاده حساس و وسیع است.

یک فرایند مؤثر و مهم برای انطباق بینایی شامل درگیرشدن فسفریلاسیون اُپسین در ساختمان فضایی فعال آن (O^*) به وسیله آنزیم ردوپسین کیناز[2] (عضوی از کلاس GPCR - کینازها) است (شکل ۲۰ـ۱۵). هر مولکول اُپسین سه جایگاه فسفریلاسیون اصلی برای سرین روی سطح سیتوزولی خود دارد. فسفریله‌شدن جایگاههای بیشتر موجب می‌شود که فرم فعال شده با نور اُپسین (O^*) توانایی کمتری برای فعال کردن $G_{\alpha t}$ داشته باشد، لذا بسته شدن کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار وابسته به cGMP را القاء می‌کند. به این دلیل گستردگی فسفریلاسیون اُپسین توسط ردوپسین کیناز، متناسب است با مدت زمانی که هر مولکول اُپسین در شکل فعال شده با نور آن طی می‌کند (مقیاسی از وضعیت سطح نور محیط). تحت شرایط نور زیاد، فسفریلاسیون اُپسین افزایش می‌یابد و بنابراین توانایی آن برای فعال کردن $G_{\alpha t}$ کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر ردوپسین با نور شدید حساسیت‌زدایی می‌شود و لذا افزایش بیشتری در شدت نور برای ایجاد تغییر در سطح cGMP و پیام بینایی ضروری است. وقتی که سطح نور محیط کاهش می‌یابد، اُپسین دِفسفریله شده و توانائیش برای فعال کردن $G_{\alpha t}$ افزایش می‌یابد (در این حالت فوتون‌های اضافی نسبتاً کمتری برای ایجاد پیام بینایی لازم است). اهمیت فسفریلاسیون اُپسین در انطباق بینایی با مطالعات بر روی سلول‌های استوانه‌ای موش‌ها با ردوپسین جهش یافته حامل فقط یک ریشه سرین هدف (و یا فاقد آن) حمایت می‌شود. این سلول‌های استوانه‌ای در مقایسه با سلول‌های نرمال با سرعت بسیار آهسته‌تری در نور شدید غیرفعال می‌شوند.

حساسیت‌زدایی وابسته به نور در سلول‌های میله‌ای با اتصال پروتئین سیتوزولیک βارستین بسیار افزایش می‌یابد. در شرایط نور شدید محیطی (مانند هوای آزاد در هنگام ظهر)، β- ارستین به ریشه‌های سرین فسفریله شده در قطعه C- ترمینال اپسین متصل می‌شود. β-ارستین متصل شده از میانکنش $G_{\alpha t}$ با O^* فسفریله شده کاملاً جلوگیری می‌کند. (بلوکه‌کننده کامل تشکیل کمپلکس فعال $G_{\alpha t}$.GTP و سبب مهار کل فعالیت سلول استوانه‌ای) تنظیم پس‌نورد منفی فعالیت سلول استوانه‌ای توسط ردوپسین کیناز و ارستین مشابه است با تطابق (یا حساسیت‌زدایی) گیرنده‌های جفت

1- Visual adaptation 2- Rhodopsinkinaze

شده با G- پروتئین دیگر با شدت بالای نور است.

مکانیسم دیگری که به نظر می‌رسد منحصر به سلول‌های باشد، استوانه‌ای همچنین برای تطابق بینایی شرکت می‌کند. در سلول‌های سازگار شده با تاریکی، تقریباً تمامی زیرواحدهای $G_{\alpha t}$ و $G_{\beta\gamma}$، در قطعه خارجی به سر می‌برند. اما ۱۰ دقیقه نوردهی با شدت نور اواسط روز، موجب حرکت بیش از ۸۰ درصد زیرواحدهای $G_{\alpha t}$ و $G_{\beta\gamma}$ از قطعه‌ی خارجی به بخش‌های سلولی دیگر می‌شود. علی‌رغم ناشناخته بودن مکانیسم حرکت این پروتئین‌ها، نتیجه اینکه پروتئین‌های $G_{\alpha t}$ از نظر فیزیکی برای اتصال به اُپسین فعال شده، ناتوانند.

همانند آنچه که در مسیرهای پیام‌رسانی دیگر رخ می‌دهد، لذا چندین مکانیسم برای غیرفعال شدن پیام‌رسانی در خلال تطابق بینایی استفاده می‌شوند (شاید به این منظور که کنترل کامل فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی در دامنه وسیعی از تابش امکان‌پذیر باشد).

نکات کلیدی بخش ۵-۱۵

گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین که کانالهای یونی را تنظیم می‌کنند

■ گیرنده موسکارینی استیل کولین قلبی یک GPCR است و پروتئین اثرگرش یک کانال K^+ است. فعالسازی گیرنده باعث رهایی زیرواحد $G_{\beta\gamma}$ می‌شود که کانالهای K^+ را باز می‌کند (شکل ۱۵-۱۵ را ملاحظه کنید). هیپرپلاریزاسیون غشاء پلاسمایی حاصل، سرعت انقباض ماهیچه‌ای را آهسته می‌کند.

■ رودوپسین، یک GPCR حساس به نور در سلول‌های استوانه‌ای است (که شامل پروتئین اپسین متصل به ۱۱سیس رتینال است). ایزمریزاسیون القاشده با نور بخش ۱۱سیس رتینال، اپسین فعال شده را ایجاد می‌کند، که سپس ترانس دوسین (G_t) که یک G پروتئین جفت شده است را توسط کاتالیز GTP آزاد برای GDP متصل شده بر روی زیرواحد Gt را فعال می‌کند.

■ پروتئین اثرگر در مسیر رودوپسین cGMP فسفودی استراز است که توسط رهایی به واسطه - GTP. $G\alpha$های زیرواحدهای مهاری فعال می‌شود. کاهش در میزان cG-MP توسط این آنزیم منجر به بسته‌شدن کانال‌های Na^+/Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به cGMP می‌شود (هیپرپلاریزاسیون غشاء) و رهایی ناقل عصبی کاهش می‌یابد (شکل ۱۸-۱۵ را ملاحظه کنید).

■ همانند سایر پروتئین‌های $G\tau$، اتصال GTP به Gt باعث تغییرات ساختاری آن در پروتئین می‌شود که میانکنش‌های مولکولی با $G\beta\gamma$ را تخریب می‌کند و $G\alpha$.GTP را قادر به اتصال به اثرگر پائین دستش می‌سازد.

■ فسفریلاسیون اپسین فعال شده با نور توسط رودوپسین کیناز با توانایی آن برای فعال کردن $G\alpha t$ مداخله می‌کند. اتصال بعدی ارستین به اپسین فسفریله‌شده توانایی آن را برای فعالسازی $G\alpha t$ بیشتر مهار می‌کند (شکل ۲۰-۱۵ راملاحظه کنید) این مکانیسم عمومی از سازش‌پذیری (یا غیرحساس شدن) توسط سایر GPCRها در میزان بالای لیگاند به کار گرفته می‌شود.

۶-۱۵ گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌هایی که آدنیلیل سیکلاز را مهار و یا فعال می‌کنند

مسیرهای GPCR که آدنیلیل سیکلاز را در نقش اثرگر و cAMP را به عنوان پیامبر ثانویه مورد استفاده قرار می‌دهند، در اکثر سلول‌های پستانداران یافت می‌شوند. مسیرهایی که مکانیسم عمومی GPCR را دنبال می‌کنند در شکل ۱۳-۱۵ به صورت کلی آورده شده است. اتصال لیگاند به گیرنده سبب فعال شده G- پروتئین سه زیرواحدی می‌شود که این نیز آدنیلیل سیکلاز را فعال می‌کند و این آنزیم پیامبر ثانویه قابل انتشار cAMP را سنتز می‌کند. cAMP به نوبه خود، پروتئین کیناز وابسته به cAMP را فعال کرده و این کیناز پروتئین‌های هدف ویژه‌ای را فسفریله می‌کند.

برای مطالعه این مسیر GPCR/cAMP، ما بر روی نخستین مسیر کشف شده از این نوع تمرکز می‌کنیم. [تولید گلوکز با تحریک هورمونی از گلیکوژن (پلی‌مر سنگین گلوکز)]. تجزیه گلیکوژن (گلیکولیز) در سلول‌های عضله وکبد در پاسخ به اپی‌نفرین، گلوکاگون و هورمون‌های دیگری که گیرنده‌هایشان با پروتئین $G\alpha s$ جفت می‌شود، اتفاق می‌افتد. (جدول ۱-۱۵ را ملاحظه کنید). این سیستم مثالی روشن برای اینکه چگونه فعال‌سازی یک مسیر می‌تواند فعالیت گروهی از آنزیم‌های داخل سلولی به سمت هدفی عمومی هماهنگ کند، و این آزاد شدن گلوکز از شکل ذخیره‌اش است.

آدنیلیل سیکلاز توسط کمپلکس‌های لیگاند -گیرنده متفاوتی تحریک و مهار می‌شود

تحت شرایطی که مطالبه‌ی گلوکز به دلیل پایین بودن قندخون، بالاست، گلوکاگون به وسیله‌ی جزایر کوچک پانکراس و هنگام

استرس ناگهانی، اپی‌نفرین از غدد آدرنال آزاد می‌شود. هم گلوکاگون و هم اپی‌نفرین، برای شکستن گلیکوژن به سلول‌ها پیام می‌دهند و این موجب آزاد شدن مولکول‌های گلوکز منفرد می‌شود. در کبد، گلوکاگون و اپی‌نفرین به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌های متفاوتی متصل می‌شوند، ولیکن هر دو گیرنده‌ها با $G_{\alpha s}$های یکسانی میانکنش کرده و آن را فعال می‌کنند و بدین ترتیب آدنیلیل سیکلاز فعال می‌شود. از این رو هر دو هورمون پاسخ‌های متابولیکی یکسانی را القاء می‌کنند. فعال‌سازی آدنیلیل سیکلاز و لذا سطح cAMP، متناسب با غلظت کل کمپلکس $G_{\alpha s}$ GTP حاصل از اتصال هر دو هورمون با گیرنده‌های پاسخ‌دهنده به آنها می‌باشد.

تنظیم مثبت (فعال‌سازی) و منفی (مهارسازی) فعالیت آدنیلیل‌سیکلاز در بسیاری از انواع سلول‌ها رخ می‌دهد که این کنترل دقیق سطح cAMP را مهیا می‌کند. (شکل ۱۵ـ۲۱) برای مثال، تجزیه تری گلیسرید به اسیدهای چرب در سلول‌های چربی (لیپولیز) با اتصال اپی‌نفرین، گلوکاگون یا ACTH به گیرنده‌های فعال‌کننده آدنیلیل‌سیکلاز تحریک می‌شود. از جهت دیگر، اتصال دو هورمون دیگر (پروستاگلندین E_1 یا آدنوزین) به گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین پاسخ‌دهنده‌شان، آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کند. گیرنده‌های پروستاگلندین و آدنوزین یک G_i- پروتئین مهاری را فعال می‌کنند که دارای زیرواحدهای β و γ مشابه با G_s- پروتئین تحریکی اما زیرواحد α متفاوت با آن هستند ($G_{\alpha i}$). بعد از اینکه کمپلکس فعال $G_{\alpha i}$.GTP از $G_{\beta\gamma}$ جدا شد، با اتصال به آدنیلیل سیکلاز آن را مهار می‌کند (به جای تحریک کردن) و این امر موجب پایین‌تر آمدن غلظت cAMP می‌شود.

مطالعات ساختاری شیوه‌ای راکه $G_{\alpha s}$.GTP به آدنیلیل سیکلاز متصل و آن را فعال می‌کند، اثبات کرده‌اند

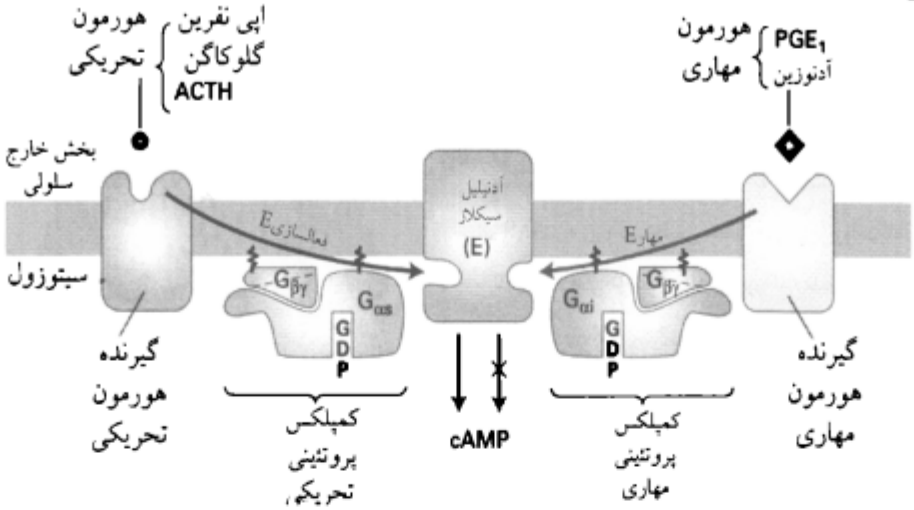
آنالیز کریستالوگرافی اشعه X محل دقیق نواحی میانکنش کمپلکس $G_{\alpha s}$.GTP با آدنیلیل سیکلاز را تعیین کرده است. این آنزیم یک پروتئین چندبار گذرنده از غشاء با دو قطعه سیتوزولیک بزرگ حاوی دُمین‌های کاتالیتیک است. (شکل ۱۵ـ۲۲ قسمت a). به دلیل اینکه کریستالیزه کردن این پروتئین گذرنده از غشاء، بسیار مشکل است، دانشمندان دو قطعه پروتئینی دربرگیرنده دو دُمین کاتالیتیک آنزیم آدنیلیل سیکلاز که به یکدیگر به صورت هترودایمر به طور محکمی متصل می‌شوند، آماده کردند. وقتی که به این دو قطعه کاتالیتیک در حضور $G_{\alpha s}$.GTP و فورسکولین[1] امکان اتصال داده می‌شود، آنها در ساختمان فضایی فعالشان تثبیت می‌شوند.

کمپلکس قابل حل در آب حاصله (دو قطعه از دُمین‌های آدنیلیل سیکلاز/ $G_{\alpha s}$.GTP یا فورسکولین از نظر کاتالیتیک فعال بوده و ویژگی‌های بیوشیمیایی و دارویی مشابه با آدنیلیل سیکلاز دست نخورده با طول کامل از خود نشان می‌دهند. در این کمپلکس، دو ناحیه از $G_{\alpha s}$.GTP (مارپیچ سویچ II و لوپ $\alpha3$-$\beta5$) با قطعات آدنیلیل سیکلاز، تماس برقرار می‌کنند (شکل ۱۵ـ۲۲ قسمت b). تصور می‌شود که این تماس‌ها مسئول فعال‌سازی آنزیم توسط GTP-$G_{\alpha s}$ باشد. یادآور می‌شویم که سویچ II، یکی از قطعات G_α- پروتئین است که ساختمان فضایی آن در وضعیت متصل به GTP با وضعیت اتصال به GDP متفاوت است (شکل ۱۵ـ۸ را ملاحظه کنید). ساختمان فضایی القا شده با GTP مربوط به $G_{\alpha s}$ که تفکیک آن را از $G_{\beta\gamma}$ امکان‌پذیر می‌سازد، دقیقاً همان ساختمان فضایی لازم برای اتصال $G_\alpha s$ به آدنیلیل سیکلاز است. بررسی‌های دیگر نشان می‌دهد که $G_{\alpha i}$ به ناحیه‌ای متفاوت از آدنیلیل سیکلاز متصل می‌شود و بدین ترتیب اثر متفاوتش را توجیه می‌کند.

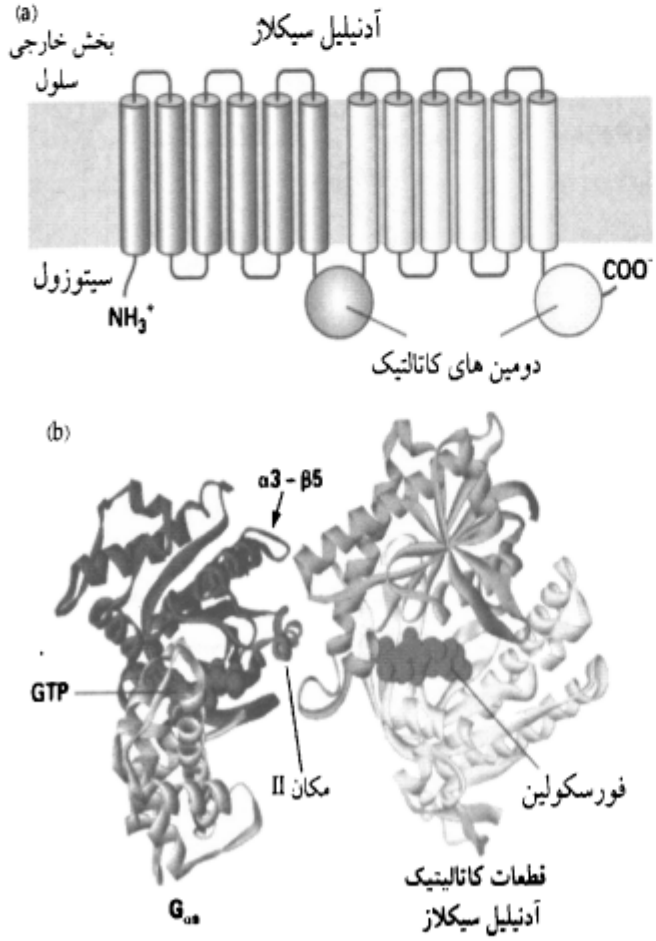
cAMP پروتئین کیناز A را با رهاسازی زیرواحد کاتالیتیک آن فعال می‌کند

در موجودات پرسلولی، تقریباً تمامی اثرات متنوع cAMP از طریق پروتئین کیناز A[2] (PKA) یا وساطت می‌شود. این آنزیم همچنین پروتئین کیناز وابسته به cAMP نامیده می‌شود. PKA[3] غیرفعال، تترامری تشکیل شده از دو زیرواحد تنظیمی (R) و دو زیرواحد کاتالیتیک است (C). (شکل ۱۵ـ۲۳ قسمت a). هر زیرواحد R دارای توالی سوبسترای کاذب است که به جایگاه فعال دُمین کاتالیتیک متصل می‌شود. با اتصال سوبسترای بلوکه کننده، زیر واحد R فعالیت زیرواحد کاتالیتیک را مهار می‌کند. PKAی غیرفعال با اتصال cAMP روشن می‌شود. هر زیرواحد R حاوی دو جایگاه اتصال cAMP متمایز با نام‌های CNB-A و CNB-B است (شکل ۱۵ـ۲۳ قسمت b). اتصال cAMP به زیرواحد R موجب تغییر ساختمان فضایی در دُمین سوبسترای کاذب می‌شود که این امر منجر به رها شدن زیرواحد C وابسته، آشکار شدن جایگاه کاتالیتیکش و فعال شدن فعالیت کینازی آن می‌شود (شکل ۱۵ـ۲۳ قسمت C). اتصال cAMP به زیر واحد R از پروتئین کیناز A با شیوه تعاونی رخ می‌دهد، به عبارت دیگر، اتصال نخستین مولکول

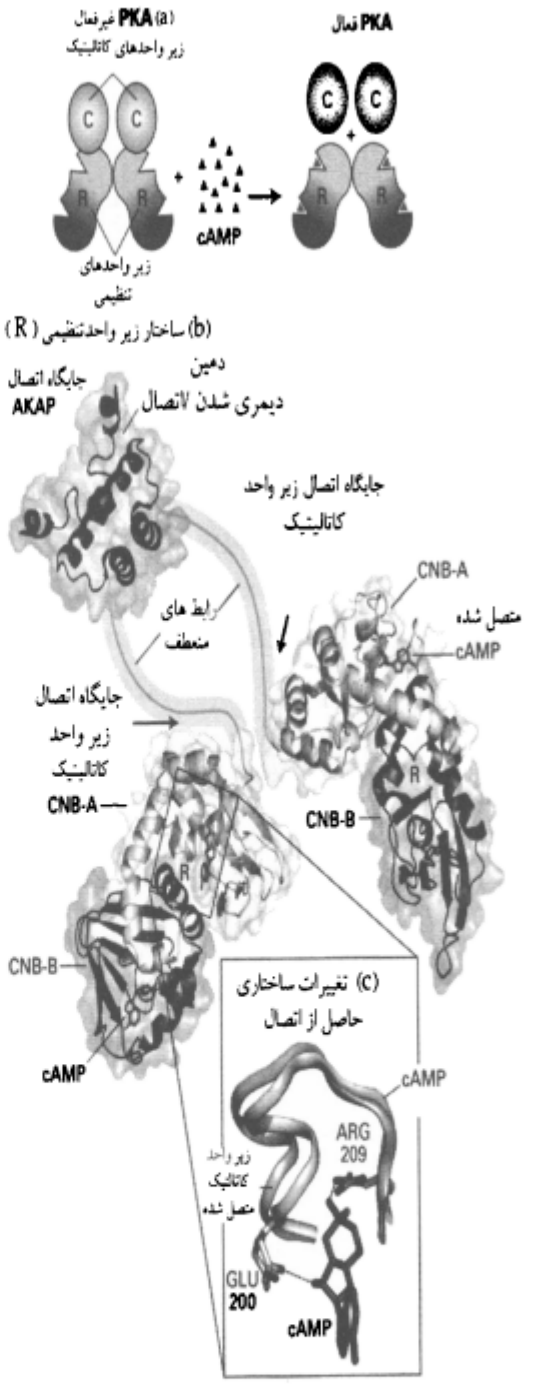
1- Forskolin
2- Proteinkinase A (PKA)
3- cAMP - dependent protein kinase



▲ **شکل ۱۵.۲۱ فعال‌سازی القاء شده با هورمون و مهار آدنیلیل سیکلاز در سلول‌های بافت چربی.** اتصال لیگاند به گیرنده جفت شده با $G_{\alpha s}$ موجب فعال‌سازی آدنیلیل سیکاز در حالی که اتصال لیگاند به گیرنده جفت شده با $G_{\alpha i}$ موجب مهار این آنزیم می‌شود. زیرواحد $G\beta\gamma$ در هر دو G- پروتئین مهاری و تحریکی یکسان است ولی زیرواحدهای G_{α} و گیرنده‌های مرتبط با آن متفاوت است. تشکیل کمپلکس‌های $G_{\alpha i}$.GTP فعال تحریک شده با لیگاند توسط مکانیسمی مشابه در هر دو پروتئین $G_{\alpha i}$ و $G_{\alpha s}$ انجام می‌شود، ولیکن کمپلکس‌های $G_{\alpha s}$.GTP و $G_{\alpha i}$.GTP به گونه‌ای متفاوت با آنیلیل سیکلاز میانکنش می‌دهند، به طوری که یکی فعالیت کاتالیتیکی آن را تحریک و دیگری مهار می‌کند.



◀ **شکل ۱۵.۲۲ (شکل رنگی) ساختار آدنیلیل سیکلاز پستانداران و میانکنش آن با $G_{\alpha s}$.GTP.** (a) طرح شماتیک آدنیلیل سیکلاز پستانداران. آنزیم متصل به غشاء مذکور، دارای دو دُمین کاتالیتیک مشابه در سمت سیتوزولیک غشاء و دو دُمین سرتاسری است که تخمین زده می‌شود که هر یک از این دو دُمین حاوی ۶ مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء هستند. (b) مدل ساختار ۳ بعدی $G_{\alpha s}$.GTP کمپلکس شده با دو قطعه احاطه‌کننده دُمین کاتالیتیک آدنیلیل سیکلاز با کریستالوگرافی اشعه x تعیین شده است. لوپ α_3-β_5 و مارپیچ موجود در سویچ II مربوط به $G_{\alpha s}$.GTP تواماً با ناحیه ویژه‌ای از آنزیم آدنیلیل سیکلاز میانکنش می‌کنند. بخش رنگی تیره‌تر $G_{\alpha s}$، دُمین GTPase است که این در ساختار مشابه با Ras (شکل ۱۵.۸ را ملاحظه کنید) است. بخش روشن‌تر یک دُمین مارپیچی است. دو قطعهٔ آدنیلیل سیکلاز به رنگهای نارنجی و زرد نشان داده شده است فورسکولین (سبز) قطعات سیکلاز را در ساختمان فضایی فعالشان قفل می‌کند.



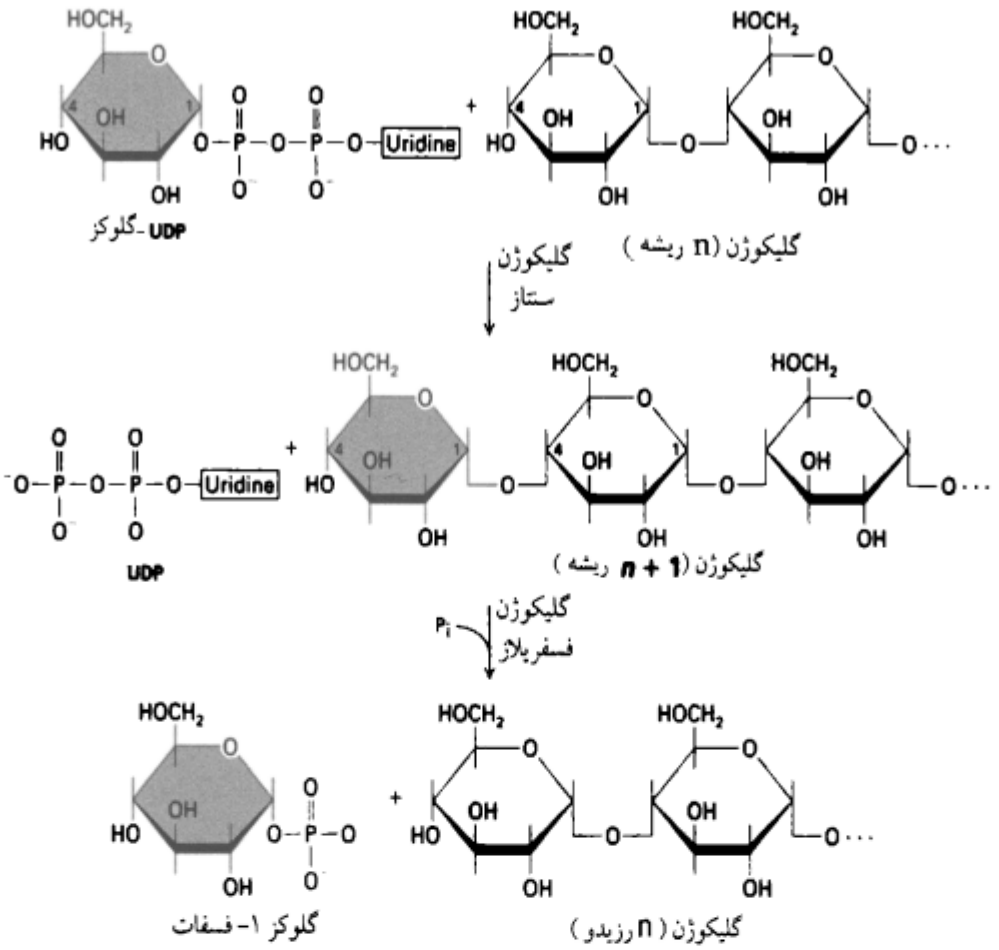
شکل ۲۳ـ۱۵ ساختار زیرواحد تنظیمی (R) پروتئین کیناز A و فعال‌سازی آن با cAMP. (a) پروتئین کیناز A(PKA) از دو زیر واحد تنظیمی (R) و دو زیرواحد کاتالیتیک (C)تشکیل شده است. هنگامی که cAMP به زیرواحد تنظیمی متصل می‌شود، زیرواحد کاتالیتیک رها شده و لذا PKA فعال می‌شود. (b) دو زیرواحد تنظیمی به یک رابط انعطاف‌پذیر متصل‌اند و علاوه بر این به یک دُمین Dimerization/Docking متصل‌اند که پروتئین فعال‌کننده کیناز A(AKAP، شکل ۲۸ـ۱۵) می‌تواند به آن متصل شود. هر زیرواحد R دارای دو دومین اتصال به cAMP (CNB-A و CNB-B) و یک جایگاه اتصال برای زیرواحد کاتالیتیک است. (c) اتصال cAMP به دُمین CNB-A با جابه جا کردن زیرواحد کاتالیتیک منجر به فعال شدن آن می‌شود. بدون اتصال cAMP به دُمین CNB-A در ساختمان فضایی قرار می‌گیرد که قادر به اتصال با زیرواحد کاتالیتیک (C) است. ریشه‌های گلوتامات (E200) و آرژینین (R209) در اتصال cAMP سهیم هستند و این موجب تغییر ساختمان فضایی در لوپ می‌شود که اتصال لوپ را به زیرواحد تنظیمی مهار می‌کند.

cAMP به CNB-B سبب پایین‌تر آمدن K_d برای اتصال دومین مولکول cAMP به CNB-A می‌شود. لذا تغییرات کوچک در سطح cAMP سیتوزولیک می‌تواند موجب تغییرات نسبتاً بزرگ در مقدار زیرواحدهای جدا شده و از این رو، فعالیت کیناز شود. فعال‌سازی سریع آنزیم‌ها توسط تفکیک القاء شده با هورمون مربوط به یک مهارکننده یک ویژگی مشترک در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی است.

متابولیسم گلیکوژن توسط فعال‌سازی القاء شده با هورمون مربوط به پروتئین کیناز A تنظیم می‌شود

گلیکوژن، پلیمر بزرگ گلوکز، شکل ذخیره‌ای اصلی گلوکز در حیوانات است. مانند تمامی پلیمرهای زیستی، گلیکوژن به وسیله‌ی یک مجموعه از آنزیم‌ها سنتز شده و توسط مجموعه دیگری تجزیه می‌شود (شکل ۲۴ـ۱۵)

تجزیه گلیکوژن (گلیکوژنولیز) مستلزم جدا شدن گام به گام ریشه‌های گلوکز از یک انتهای پلی‌مر به واسطه‌ی واکنش فسفرولیز است، که این واکنش توسط آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کاتالیز می‌شود (محصول آن گلوکز ـ۱ـ فسفات است). در هر کدام از سلول‌های کبدی و عضلانی، گلوکز ـ۱ـ فسفات تولید شده از گلیکوژن، به گلوکز ـ۶ـ فسفات تبدیل می‌شود. در سلول‌های عضلانی این متابولیت وارد مسیر گلیکولیز شده و برای تولید ATP لازم برای راه‌اندازی انقباض عضله متابولیزه می‌شود (فصل ۱۲). سلول‌های کبدی متفاوت با سلول‌های عضلانی، دارای آنزیم فسفاتازی هستند که گلوکز ـ۶ـ فسفات را به گلوکز، هیدرولیز می‌کند و سپس از این سلول‌ها تا حدی به وسیله‌ی ناقل گلوکز (GLUT2) موجود در غشاء پلاسمایی به خارج فرستاده می‌شود (فصل ۱۱). بنابراین ذخائر گلیکوژن در کبد، در ابتدا به گلوکز تجزیه می‌شود، که اینها نیز فوراً به داخل خون رها شده



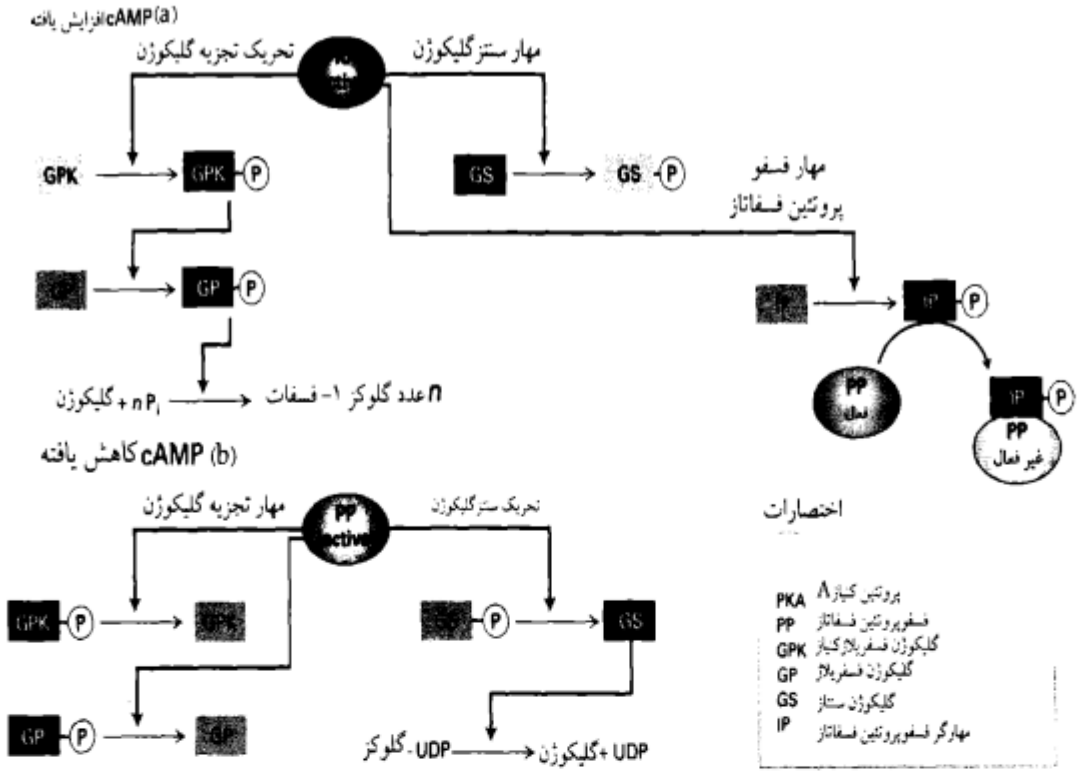
▲ **شکل ۲۴-۱۵ سنتز و تجزیه گلیکوژن.** الحاق گلوکز از UDP- گلوکز به گلیکوژن توسط آنزیم گلیکوژن سنتاز کاتالیز می‌شود. حذف واحدهای گلوکز از گلیکوژن توسط آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز کاتالیز می‌شود. به دلیل اینکه دو آنزیم متفاوت تشکیل وتجزیه گلیکوژن را کاتالیز می‌کنند. دو واکنش می‌توانند به طور مستقل تنظیم شوند.

و به بافت‌های دیگر منتقل می‌شوند (به ویژه عضلات و مغز).

آدنیلیل سیکلاز فعال شده با اپی‌نفرین که با افزایش در cAMP و فعال‌سازی متعاقب پروتئین کیناز A (PKA) همراه است، تبدیل گلیکوژن به گلوکز ـ۱ـ فسفات را در دو مسیر تشدید می‌کند: مهار سنتز گلیکوژن و تحریک تجزیه گلیکوژن (شکل ۲۵ـ۱۵ قسمت a). PKA آنزیم سنتزکنندهٔ گلیکوژن را فسفریله کرده و بدین ترتیب سنتز گلیکوژن را شدیداً غیرفعال می‌کند. PKA به طور غیرمستقیم با فسفریله کردن و لذا فعال کردن کیناز حد واسط، به تجزیه شدن گلیکوژن کمک می‌کند. این کیناز حدواسط همان گلیکوژن فسفریلاز کیناز (GPK) است که به نوبه خود گلیکوژن فسفریلاز (آنزیم تجزیه‌کننده گیلکوژن) را فسفریله و فعال می‌کند.

کل فرایند، با حذف اپی‌نفرین و لذا کاهش سطح cAMP (غیرفعال شدن PKA) معکوس می‌شود. این بازگشت توسط فسفوپروتئین فسفاتاز وساطت می‌شود که این آنزیم ریشه‌های فسفات را از شکل غیرفعال گلیکوژن سنتاز (فعال شدن آن) و از شکل فعال گلیکوژن فسفریلاز کیناز و گلیکوژن فسفریلاز (غیرفعال شدن آنها) حذف می‌کنند (شکل ۲۵ـ۱۵ قسمت b). فسفوپروتئین فسفاتاز، به تنهایی، توسط PKA تنظیم می‌شود. فسفوپروتئین‌فسفاتاز به طور نرمال غیرفعال است. وقتی که PKA فعال شده این پروتئین مهارکننده را فسفریله می‌کند و می‌تواند به فسفوپروتئین فسفاتاز متصل و فعالیت آن را مهار نماید. (شکل ۲۲۵ـ۱۵ قسمت a را ملاحظه کنید). در غلظت پایین cAMP (وقتی که PKA غیرفعال است) پروتئین مهارکننده، فسفریله نمی‌شود و فسفوپروتئین فسفاتاز، فعال می‌ماند. از این رو، در فقدان cAMP، سنتز گلیکوژن توسط گلیکوژن سنتاز شدت می‌یابد و علاوه بر این تجزیه شدن گلیکوژن به وسیله گلیکوژن فسفریلاز مهار می‌شود.

لذا گلیکوژنولیز القاء شده با اپی‌نفرین، تنظیم دوجانبه از خود نشان می‌دهد: فعال شدن آنزیم‌های کاتالیزکننده تجزیه گلیکوژن و



▲ **شکل ۲۵ـ۱۵ تنظیم متابولیسم گلیکوژن به وسیله cAMP در سلول‌های کبدی و عضله.** آنزیم‌های فعال در سایه‌های تیره‌تر و شکل غیرفعالشان به صورت سایه‌های روشن‌تر مشخص شده است. (a) افزایش cAMP سیتوزولیک، سبب فعال شدن پروتئین کیناز A(PKA) می‌شود، که این نیز گلیکوژن سنتاز را به طور مستقیم مهار کرده و تجزیه گلیکوژن را از طریق آبشار پروتئین کیناز پیش می‌برد. در غلظت بالای cAMP، PKA همچنین مهارکننده فسفوپروتئین فسفاتاز را (PP) فسفریله می‌کند. اتصال مهارکننده فسفریله شده به PP، این فسفاتاز را از دِفسفریله کردن آنزیم فعال در آبشار کینازی و یا گلیکوژن سنتاز غیرفعال، جلوگیری می‌کند.(b) کاهش در cAMP، PKA را غیرفعال می‌کند و این امر منجر به رها شدن شکل فعال PP می‌شود. عمل این آنزیم به سنتز گلیکوژن کمک کرده و تجزیه گلیکوژن را مهار می‌نماید.

مهار آنزیم‌های پیش‌برنده سنتز گلیکوژن. این تنظیم هماهنگ مسیرهای سنتز و تجزیه، مکانیسمی کارآمد برای دستیابی به پاسخ سلولی ویژه فراهم می‌کنند و مضاف بر اینکه پدیده‌ای عمومی در بیولوژی تنظیمی هستند.

فعال شدن پروتئین کیناز A با وساطت cAMP پاسخ‌های متعددی را در انواع سلول‌های مختلف موجب می‌شوند

در سلول‌های بافت چربی، فعال‌سازی پروتئین کیناز A با اپی‌نفرین، به فسفریلاسیون و فعال شدن آنزیم فسفولیپاز کمک می‌کند و این آنزیم تری گلیسرید ذخیره شده را به اسید چرب آزاد و گلیسرول هیدرولیز می‌کند. اسیدهای چرب یاد شده، به داخل خون آزاد شده و در نقش منبع انرژی توسط سلول‌ها در سایر بافت‌ها مانند کلیه، قلب و عضله جذب می‌شوند. بدین ترتیب فعال شدن PKA با اپی‌نفرین در دو نوع سلول مختلف (کبد و بافت چربی) اثرات متفاوتی دارد. در حقیقت cAMP و PKA مجموعه بزرگی از پاسخ‌های سلولی القاء شده با هورمون را در سلول‌های گوناگون بدن وساطت می‌کنند. (جدول ۲ـ۱۵). به رغم آنکه پروتئین کیناز A در انواع مختلف سلول‌ها بر روی سوبستراهای متفاوتی عمل می‌کند، ولیکن همیشه ریشه سرین یا ترئونین راکه در داخل توالی یکسانی از موتیف فسفریله می‌کند X،X-Arg-(Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)- ϕ نشان دهنده هر اسیدآمینه و ϕ اسیدهای‌آمینه آبگریز را نشان می‌دهد. سرین / ترئونین کینازهای دیگر، ریشه‌های هدف را در داخل توالی‌های دیگر موتیف فسفریله می‌کنند.

تشدید پیام عموماً در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی رخ می‌دهد

گیرنده‌ها، پروتئین‌هایی با فراوانی پایین هستند و معمولاً تنها چند هزار نسخه در هر سلول حضور دارند. با این وجود، پاسخ‌های

سلولی القاء شده با اتصال تعداد نسبتاً کمی از هورمون‌ها به گیرنده‌های موجود، ممکن است که به تولید ده‌ها هزار و یا حتی میلیون‌ها پیامبر ثانویه یا آنزیم فعال شده در هر سلول نیاز داشته باشد. لذا اغلب باید تشدید پیام[1] اساسی برای یک پیام هورمونی رخ دهد تا اینکه پاسخ سلولی القاء شود. در مورد گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین، تشدید پیام تا حدی امکان‌پذیر است، چون هم گیرنده و هم G- پروتئین توانایی انتشار سریع را از غشاء پلاسمایی دارند. یک کمپلکس اپی‌نفرین ـ GPCR منفرد موجب تبدیل حدود یکصد مولکول $G_{\alpha s}$ غیرفعال به شکل فعال قبل از تفکیک اپی‌نفرین از گیرنده می‌شود.

هر کمپلکس فعال $G_{\alpha s}$.GTP به نوبهٔ خود یک مولکول آدنیلات سیکلاز را فعال می‌کند، که این آنزیم نیز سپس سنتز تعداد زیادی مولکول cAMP را در خلال مدت زمان اتصال $G_{\alpha s}$.GTP به آن کاتالیز می‌کند.

تشدید مذکور که در یک آبشار تشدیدی رخ می‌دهد، به تعداد مراحل آن و غلظت نسبی عوامل متعدد آن بستگی دارد. در آبشار القاء شده با اپی‌نفرین که در شکل ۱۵ـ۲۶ نشان داده شده است، میزان اپی‌نفرین خون به پایینی 10^{-10} مولار، توانایی تحریک گلیکوژنولیز کبدی و رها شدن گلوکز را دارد. این مقدار محرک اپی‌نفرینی، غلظت داخل سلولی cAMP به اندازه 10^{-6} مولار تولید می‌کند (یک تشدید 10^{4} برابری). تشدید دیگری می‌تواند رخ دهد که این باعث تشدید 10^{8} برابر شدن پیام اپی‌نفرین شود. در عضله مخطط، تشدید برجستگی کمی دارد، زیرا غلظت ۳ آنزیم متوالی در آبشار گلیکوژنولیز (پروتئین کیناز A، گلیکوژن فسفریلاز کیناز و گلیکوژن فسفوریلاز)، به نسبت ۱:۱۰:۲۴۰ هستند (پتانسیل تشدید ماکزیمم ۲۴۰ برابری). مسیر GPCR القاء شده با اپی نفرین، منجر به گلیکوژنولیز می‌شود، خواه در کبد و خواه در عضله مخلط، به نحوه شگفت‌انگیزی چگونگی امکان تشدید اثرات یک پیام خارج سلولی را نشان می‌دهد.

چندین مکانیسم موجب تنظیم کاهشی پیام‌رسانی از گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین می‌شوند

برای اینکه سلول‌ها به طور مؤثری به تغییرات در محیط اطرافشان پاسخ دهند، باید مکانیسم‌هایی برای خاتمه دادن به فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی وجود داشته باشد. چندین مکانیسم برای اختتام پاسخ‌های سلولی به هورمون‌های وساطت شده با گیرنده‌های β - آدنرژیک و گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها ($G_{\alpha s}$) شرکت می‌کنند. نخست اینکه، تمایل گیرنده برای لیگاندش وقتی که GDP متصل به $G_{\alpha s}$ با GTP جایگزین می‌شود، کاهش می‌یابد. این افزایش در K_d، کمپلکس هورمون - گیرنده را به تفکیک لیگاند از گیرنده تشدید می‌کند و بدین وسیله تعداد پروتئین‌های $G_{\alpha s}$ فعال محدود می‌شود. دوم اینکه، فعالیت GTPase ذاتی $G_{\alpha s}$، GTP متصل را به GDP تبدیل می‌کند و این امر باعث غیرفعال شدن پروتئین و کاهش فعالیت آدنیلیل سیکلاز می‌شود. اساساً، سرعت هیدرولیز GTP متصل به $G_{\alpha s}$ هنگام اتصال این فاکتور به آدنیلیل سیکلاز تشدید می‌شود که این کاهش دهنده‌ی مدت زمان تولید cAMP است و لذا آدنیلیل سیکلاز در نقش GAP برای $G_{\alpha s}$ عمل می‌نماید. به طور کلی اتصال اکثر کمپلکس‌های G_{α}.GTP به پروتئین‌های اثرگرشان، سرعت هیدرولیز GTP را افزایش می‌دهد. سرانجام اینکه، cAMP فسفودی استراز برای هیدرولیز cAMP به 5'-AMP عمل می‌نماید و بدین ترتیب پاسخ سلولی خاتمه می‌یابد. لذا حضور مداوم هورمون با غلظت کافی برای فعال‌سازی مداوم آدنیلیل سیکلاز و حفظ سطح افزایش یافته cAMP لازم است. وقتی که غلظت هورمون به قدر کافی بالا رفت، پاسخ سلولی سریعاً خاتمه می‌یابد.

گیرنده‌ها همچنین می‌توانند با سرکوب پس‌نوردی[2] متحمل تنظیم کاهشی شوند، که محصول پایانی از یک مسیر، مرحله ابتدایی آن مسیر را بلوکه می‌کند. برای مثال، وقتی که گیرنده جفت شده با $G_{\alpha s}$ پروتئین در معرض تحریک هورمونی برای چند ساعت قرار می‌گیرد، چندین ریشه سرین و ترئونین در دُمین سیتوزولیک گیرنده توسط PKA فسفریله می‌شوند (محصول پایانی مسیر $G_{\alpha s}$). گیرنده فسفریله شده قادر به اتصال به لیگاندش می‌شود و لیکن نمی‌تواند به طور کارآمد، $G_{\alpha s}$ را فعال کند، لذا اتصال لیگاند به گیرنده فسفریله شده منجر به کاهش فعال‌سازی آدنیلیل سیکلاز در مقایسه با اتصال لیگاند به گیرنده فسفریله نشده است. به دلیل اینکه فعالیت PKA با میزان بالای cAMP القاء شده توسط هر هورمون فعال‌کننده $G_{\alpha s}$، تشدید می‌شود، عرضه طولانی مدت با چنین هورمونی مانند اپی‌نفرین، نه تنها گیرنده‌های β - آدرنرژیک بلکه گیرنده‌های جفت شده با $G_{\alpha s}$ - پروتئین که با لیگاندهای متفاوتی متصل می‌شوند را حساسیت‌زدایی می‌کنند (مانند گیرنده گلوکاگون در کبد). این تنظیم متقابل **حساسیت‌زدایی ناهمگن**[3] نامیده می‌شود.

عرضه سلول‌ها با اپی‌نفرین، همچنین منجر به اشکال دیگر از

1- Signal amplification 2- Feedback repression
3- Heterologous desensitization

جدول ۲-۱۵: پاسخ سلولی به افزایش القاء شده توسط هورمون cAMP در برخی از بافت‌ها*

بافت	هورمون افزایش‌دهنده میزان cAMP	پاسخ سلولی
چربی	اپی نفرین، ACTH؛ گلوکاگن	افـزایش هـیدرولیز تـری گـلسیریدها؛ کـاهش در جـذب اسیدآمینه
کبد	اپی‌نفرین؛ نوراپی‌نفرین، گلوکاگن	افزایش در تبدیل گلیکوژن به گلوکز ؛ مهار سنتزگلیکوژن؛ افـــزایش در جـــذب اســـیدآمینه ؛ افـــزایش در گلوکونئوژنز(سنتزگلوکز از اسیدهای آمینه)
فولیکول تخمدانی	LH،FSH	افزایش در سنتز استروژن، پروژسترون
قشر غده فوق کلیوی	ACTH	افزایش در سنتز آلدوسترون، کورتیزول
عضله قلبی	اپی‌نفرین	افزایش در سرعت انقباض
غده تیروئید	TSH	ترشح تیروکسین
استخوان	هورمون پاراتیروئید	افزایش در جذب کلسیم از خون
ماهیچه اسکلتی	اپی‌نفرین	تبدیل گلیکوژن به گلوکز
روده	اپی‌نفرین	ترشح مایع
کلیه	وازوپرسین	بازجذب آب
پلاکت‌های خونی	پروستاگلندین I	مهار تجمع و ترشح

* تقریباً همه اثرات cAMP از طریق پروتئین کیناز A(PKA) واسطه‌گری می‌شود که توسط cAMP فعال می‌شود.

حساسیت‌زدایی می‌شود. ریشه‌های ویژه در دُمین سیتوزولیک مربوط به گیرنده β - آدرنرژیک که با PKA فسفریله نمی‌شوند، می‌تواند توسط آنزیم کیناز گیرنده β - آدرنرژیک[1] یا βARK فسفریله شوند، ولیکن این وقتی اتفاق می‌افتد که اپی‌نفرین یا یک آگونیست به گیرنده متصل شود و مضاف بر اینکه گیرنده در ساختمان فضایی فعالش قرار داشته باشد. این فرایند **حساسیت‌زدایی همگن**[2] نامیده می‌شود، زیرا گیرنده‌هایی که در ساختمان فضایی فعالشان قرار دارند، در معرض غیرفعال شدن با فسفریلاسیون قرار می‌گیرند. مثال دیگر از این مکانیسم تنظیمی، همان حساسیت‌زدایی ردوپسین به وسیله‌ی ردوپسین کیناز است.

بحث ما را در مورد سیر رودوپسین به خاطر آورید که اتصال β-ارستین به اُپسین به شدت فسفریله شده، موجب مهار کامل فعال‌سازی G- پروتئین‌های جفت شده با اُپسین فعال می‌شود. (شکل ۲۰-۱۵ را ملاحظه کنید). در واقع، β-ارستین نقش مشابهی را در حساسیت‌زدایی گیرنده‌های دیگر جفت شده با G- پروتئین بازی می‌کند (نظیر گیرنده‌های β - آدرنرژیک).

فعالیت دیگر β-ارستین در تنظیم گیرنده‌های سطح سلول، در آغاز با این مشاهده پیشنهاد شد که ناپدید شدن گیرنده‌های β - آدرنرژیک از سطح سلول در پاسخ به اتصال لیگاند با افزایش بیان βARK و β-ارستین تحریک می‌شود. مطالعات بعدی نشان داد که β-ارستین نه تنها به گیرنده‌های فسفریله شده بلکه همچنین به کلاترین[3] و یک پروتئین همراه که AP2 نامیده می‌شود، (دو عامل کلیدی و مهم متعلق به وزیکول‌های پوشش‌دار که در نوعی از اندوسیتوز درگیر می‌شوند) متصل می‌شود.

این میانکنش به تشکیل وزیکول‌های پوشش‌دار و اندوسیتوز گیرنده‌های مربوطه کمک می‌کند و بدین وسیله تعداد گیرنده‌های موجود در سطح سلول کاهش می‌یابد. (شکل ۲۷-۱۵)

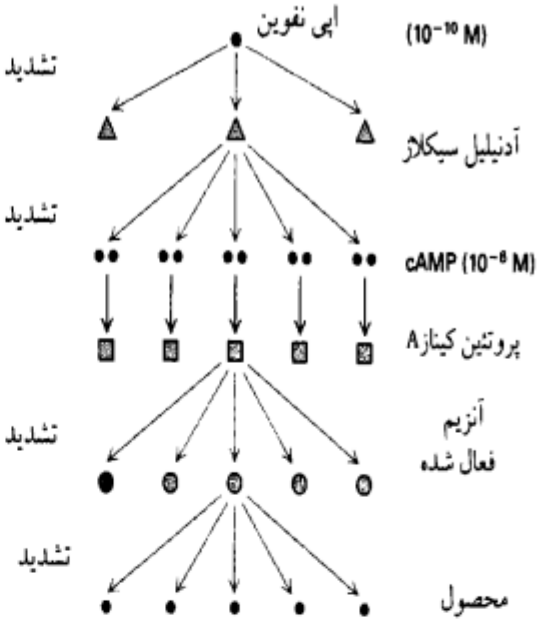
سرانجام برخی از گیرنده‌های جذب شده در درون سلول تجزیه می‌شوند و برخی در آندوزوم، دِفسفریله می‌شوند. به دنبال تفکیک β-ارستین، (حساسیت مجدد گیرنده‌ها (دِفسفریله شده) برای بازیافت، در سطح سلول ظاهر می‌شوند. (مشابه با بازیافت گیرنده‌های LDL) (فصل ۱۴).

حساسیت‌زدایی از بسیاری از GPCRs و کلاس‌های دیگر گیرنده‌ها به وسیله فسفریلاسیون گیرنده، اتصال ارستین و اندوسیتوز گیرنده‌های اشغال شده با لیگاند انجام می‌شود که با تجزیه این

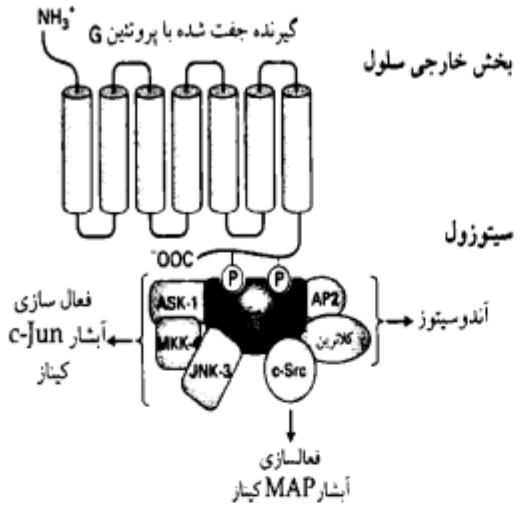
1- β - adrenergic receptor kinase

2- Homologous desensitization

3- Clathrin



▲ **شکل ۱۵ـ۲۶ تشدید یک پیام خارجی در پایین دست یک گیرنده سطح سلول.** در این مورد، اتصال مولکول پیام اندوکرین به یک مولکول گیرندهٔ جفت شده با $G_{\alpha s}$- پروتئین، سنتز تعداد زیادی مولکول cAMP را القاء می‌کند (نخستین سطح تشدید). ۴ مولکول cAMP، ۲ مولکول پروتئین PKA(A) را فعال می‌کند، ولیکن هر PKA فعال چندین مولکول محصول را فسفریله و فعال می‌کند. این دومین سطح از تشدید احتمالاً تعدادی از واکنش‌های پی در پی را درگیر می‌کند که محصول یک واکنش، آنزیم کاتالیز کنندهٔ واکنش بعدی را فعال می‌نماید. مراحل بیشتر در این آبشار، احتمالاً تشدید پیام بزرگتری را ایجاد می‌کند.



▲ **شکل ۱۵ـ۲۷ نقش β-ارستین در حساسیت زدایی GPCR و انتقال پیام.** β-ارستین به باقیمانده‌های سرین و ترئونین فسفریله شده بر روی قطعه C- ترمینال گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها (GPCRs) متصل می‌شود. کلاترین و AP2 (۲ پروتئین دیگر متصل شده به β-ارستین) به اندوسیتوز گیرنده کمک می‌کند. β-ارستین همچنین در انتقال پیام از گیرنده‌های فعال شده توسط اتصال و فعال کردن تعدادی از پروتئین کینازهای سیتوزولیک عمل می‌نماید. c-Src، مسیر MAP کیناز را فعال می‌کند و منجر به فسفریلاسیون فاکتورهای کلیدی رونویسی می‌شود (فصل ۱۶). برهمکنش β-ارستین با ۳ پروتئین دیگر مانند JKN-3[۲] موجب فسفریلاسیون و فعال‌سازی فاکتور رونویسی دیگر (c-Jun) می‌شود.

گیرنده‌ها در داخل سلول همراه است. علاوه بر نقش آن در تنظیم فعالیت گیرنده، β - ارستین، همچنین در نقش یک پروتئین سازش‌دهنده[۱] در انتقال پیام‌ها از گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین به هسته فعالیت می‌کند (فصل ۱۶). فعالیت‌های متعدد و گوناگون β- ارستین، اهمیت پروتئین سازش‌دهنده را هم تنظیم در پیام‌رسانی و هم در انتقال پیام از گیرنده‌های سطح سلول نشان می‌دهد.

پروتئین‌های لنگری، اثرات cAMP را به نواحی خاصی از سطح سلول محدود می‌کنند

در بسیاری از انواع سلول‌ها، افزایش در سطح cAMP ممکن است موجب پاسخ لازم برای یک قسمت از سلول شود، که اما برای قسمت‌های دیگر سلول الزامی نباشد (به عبارت دیگر برای ناحیه دیگر سلول مضر باشد). خانواده‌ای از پروتئین‌های لنگرانداز، ایزوفرم‌های آنزیم پروتئین کیناز A را به بخش خاصی از سلول محدود می‌کنند و بدین وسیله پاسخ‌های وابسته به cAMP به این نواحی محدود می‌شوند. پروتئین‌های مذکور که به پروتئین‌های مرتبط با کیناز A[۳] نسبت داده می‌شوند، (AKAPs)، واحد دو دُمین ساختاری هستند که یک دُمین اعطاءکننده منطقه تحت سلولی خاص و دُمین دیگر به زیرواحد تنظیمی (R) مربوط به پروتئین کیناز PKA)A) متصل می‌شود. (شکل ۱۵ـ۲۳ قسمت b را ملاحظه کنید). این پروتئین لنگری (AKAP15) به سمت سیتوزولیک غشاء پلاسمایی در نزدیکی نوع ویژه‌ای از کانال‌های Ca^{2+} دریچه‌دار در سلول‌های عضلانی قلب به طور محکم متصل می‌شود. در قلب، فعال‌سازی گیرنده‌های β - آدرنرژیک به وسیله

1- Adaptor protein 2- Jun N-terminal Kinase
3- A kinase - associated proteins

اپی‌نفرین (به عنوان قسمتی از پاسخ) منجر به فسفریلاسیون کاتالیز شده با PKA این کانال‌های Ca^{2+} و بازشدن آنها می‌شود و جریان Ca^{2+} حاصله، سرعت انقباض عضله قلبی را افزایش می‌دهد. اتصال AKAp15 به پروتئین کیناز A، فعالیت کینازی این آنزیم را به این کانال‌ها محدود می‌کند و بدین وسیله مدت زمان لازم برای انتشار زیرواحدهای کاتالیتیک PKA از جایگاهشان تا سوبسترا را (کانال‌های Ca^{2+}) کاهش می‌دهد.

یک AKAP متفاوت در عضله قلب هم به پروتئین کیناز A و هم به فسفودی استراز (PDE) در سمت خارجی غشاء پلاسمایی لنگراندازی می‌کند. به دلیل نزدیکی PDE به PKA، پس‌نورد منفی، کنترل شدید غلظت موضعی cAMP و به همین دلیل فعالیت موضعی PKA را فراهم می‌کند. (شکل ۲۸ـ۱۵). علاوه بر این محدودیت پروتیئن کیناز A در نزدیکی غشاء هسته، ورود زیرواحدهای کاتالیتیک را به داخل هسته تسهیل می‌کند، جایی که آنها فاکتورهای رونویسی خاصی را فسفریله و فعال می‌کنند. (فصل ۱۶ را ملاحظه کنید).

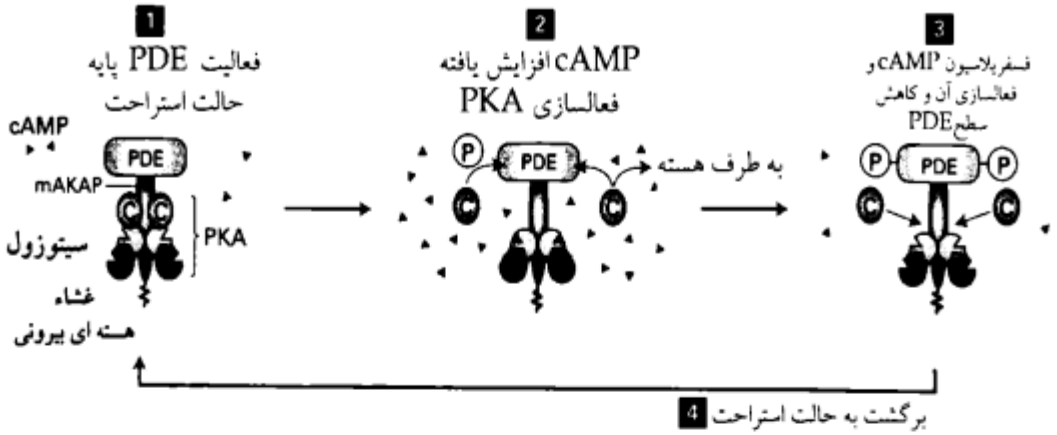
نکات کلیدی بخش ۶-۱۵

گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین که آدنیلیل سیکلاز را فعال و مهار می‌کنند

- فعال‌سازی لیگاندی گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین که $G\alpha s$ را فعال می‌کنند نتیجه‌اش فعالسازی آنزیم آدنیلیل سیکلاز متصل به غشاء است که ATP را به پیامبر ثانویه یعنی AMP حلقوی (cAMP) تبدیل می‌کند.
- فعال‌سازی لیگاندی گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G که $G\alpha i$ را فعال می‌کنند نتیجه‌اش مهار آدنیلین سیکلاز و سطوح پائین cAMP است.
- نواحی روشن/خاموش‌کننده در انواع فعال‌شده و $G\alpha i$-GTP به دُمین‌های جایگاه فعال هترودیمری در آدنیلیل سیکلاز به ترتیب به منظور فعال‌سازی یا مهار آنزیم متصل می‌شوند.
- cAMP به صورت تعاونی به زیرواحد تنظیمی پروتئین کیناز A(PKA) متصل می‌شود و زیرواحد کاتالتیک کیناز فعال را آزاد می‌سازد (شکل ۲۳-۱۵ را ملاحظه کنید).
- PKA اثرات متنوع cAMP را در اغلب سلول‌ها واسطه‌گری می‌کند (جدول ۲-۱۵ را ملاحظه کنید). سوبستراهای PKA و بنابراین پاسخ سلولی به فعال‌سازی القاشده با هورمون PKA در بین انواع سلولی تغییر می‌کند.
- در سلول‌های ماهیچه‌ای و کبدی، فعالسازی PKA توسط اپی‌نفرین و سایر هورمون‌ها یک اثر دو گانه‌ای را اعمال می‌کند که سنتز گلیکوژن را مهار می‌کند و تجزیه گلیکوژن را از طریق یک آبشار کینازی تحریک می‌کند (شکل ۲۵-۱۵ را ملاحظه کنید).
- مسیرهای پیام‌رسانی شامل پیامبرهای ثانویه و آبشارهای کینازی هستند که پیام خارجی را به طور زیادی تشدید می‌کنند (شکل ۲۶-۱۵ را ملاحظه کنید).
- βARK گیرنده‌های بتا آدرنرژیک متصل به لیگاند را فسفریله می‌کند و منجر به اتصال بتا ارستین و آندوسیتوز می‌شود. کاهش حاصل درتعداد گیرنده‌های سطح سلولی، حساسیت سلول را به هورمون‌های اضافی کمتر می‌کند.
- قرارگیری PKA در نواحی ویژه سلول توسط پروتئین‌های لنگری اثرات cAMP را به جایگاههای سلولی خاص محدود می‌کند.

۱۵ـ۷ گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین که فسفولیپاز C را فعال می‌کنند

یون کلسیم نقش مهمی را در تنظیم پاسخ سلولی به پیام‌های خارجی و تغییرات متابولیک داخلی بازی می‌کند. همانگونه که در فصل ۱۱ مشاهده کردیم، میزان Ca^{2+} در سیتوزول در سطح کمتر از میکرومولار ($<۰/۲\mu m$) توسط فعالیت مداوم پمپ‌های Ca^{2+} با انرژی ATP، حفظ می‌شود که این پمپ یون‌های Ca^{2+} را از میان غشاء پلاسمایی به خارج سلول و یا به داخل شبکه آندوپلاسمیک و وزیکول‌های دیگر منتقل می‌کند. مقادیر بیشتری از Ca^{2+} داخل سلولی نیز توسط میتوکندری برداشته می‌شوند. افزایش اندک در غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک، مجموعه متنوعی از پاسخ‌های سلولی مانند ترشح هورمون به وسیله سلول‌های اندوکرین، ترشح آنزیم‌های هضمی به وسیله سلول‌های اگزوکراین پانکراس و انقباض عضله را موجب می‌شوند (جدول ۱۲ـ۱۵). برای مثال، تحریک گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین با واسطهٔ استیل‌کولین در سلول‌های ترشحی پانکراس و غدد پاروتید (بزاقی) موجب افزایش در غلظت Ca^{2+} می‌گردد که این نیز موجب امتزاج وزیکول‌های ترشحی با غشاء پلاسمایی و رها شدن محتوای پروتئینی آنها به داخل فضای خارج سلولی می‌شود. در پلاکت‌های خونی، افزایش در غلظت Ca^{2+} القاء شده با تحریک ترومبین، موجب تغییر ساختمان فضایی آنها و تجمعشان در این بخش‌های سلولی می‌شود که این مرحله مهمی در



▲ **شکل ۲۸-۱۵ موضع‌گیری پروتئین کیناز A(PKA) در غشاء هسته عضله قلب توسط پروتئین متصل به کیناز A.** عضوی از خانواده AKAP(با نام mAKAP) موجب لنگراندازی هم cAMP ـ فسفودی استراز (PDE) و هم زیرواحد تنظیمی PKA به غشاء هسته می‌شود و آنها را در یک حلقه پس نورد منفی نگه می‌دارد که یک کنترل موضعی دقیق را برای سطح cAMP و فعالیت PKA فراهم می‌نماید. مرحله ❶ : سطح پایه‌ای فعالیت PDE در نبود هورمون (وضعیت استراحت) سطح cAMP را پایین‌تر از میزان لازم برای فعال‌سازی PKA نگه می‌دارد. مرحله ❷ و ❸: فعال‌سازی گیرنده‌های β- آدرنرژیک موجب افزایش در سطح cAMP، بالاتر از توانایی تجزیه PDE می‌شود. در نتیجه‌ی اتصال cAMP به زیرواحدهای تنظیمی PKA(R)، موجب رها شدن زیرواحدهای کاتالیتیکی (C) آن به داخل سیتوزول می‌شود. برخی از یرواحدهای C به هسته وارد می‌شوند و در آنجا فاکتورهای رونویسی معینی را فسفریله و لذا فعال می‌کنند (فصل ۱۶). فسفریلاسیون توأم با PDE توسط زیرواحدهای تنظیمی و فعال PKA، فعالیت کاتالیتیکی آن را تحریک می‌کند و بدین وسیله cAMP را هیدرولیز کرده و سطح cAMP را به سطح پایه‌ای سوق داده و موجب تشکیل مجدد PKA می‌شود. مرحله ❹: دفسفریلاسیون متعاقب PDE، کمپلکس را به وضعیت استراحت باز می‌گرداند.

جدول ۳-۱۵: پاسخ‌های سلولی به افزایش القاء شده توسط هورمون از Ca^{2+} سیتوزولی در برخی از بافت‌ها*

بافت	هورمون افزاینده Ca^{2+}	پاسخ سلولی
پانکراس (سلول‌های آسینی)	استیل کولین	ترشح آنزیمهای گوارشی مانند آمیلازو تریپسین
غده پاروتید (بزاق)	استیل کولین	ترشح آمیلاز
ماهیچه صاف عروقی و معده	استیل کولین	انقباض
کبد	وازوپرسین	تبدیل گلیکوژن به گلوکز
پلاکت‌های خونی	ترومبین	تجمع، تغییر شکل، ترشح هورمون‌ها
ماست سل‌ها	آنتی‌ژن	ترشح هیستامین
فیبروبلاست‌ها	فاکتورهای رشد پپتیدی(مانند بومبزین و PDGF)	سنتیز DNA، تقسیم سلولی

* تحریک هورمونی منجر به تولید اینوزیتول ۱و۴و۵تری‌فسفات (IP_3) می‌شود که پیامبر ثانویه‌ای است که باعث رهایی Ca^{2+} ذخیره شده در شبکه آندوپلاسمی می‌شود.

انعقاد خون برای جلوگیری از نشت خون موجود در رگ‌ها به خارج است.

در این بخش ما مسیر مهم انتقال پیام آغاز شده با GPCR را مورد مطالعه قر ار می‌دهیم که باعث افزایش یون‌های Ca^{2+} سیتوزولیک می‌شود. اتصال بسیاری از هورمون‌ها به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها در سلول‌های کبد، بافت چربی و سلول‌های دیگر، G- پروتئین‌های دارای $G_{\alpha o}$ یا $G_{\alpha q}$ را فعال می‌کند. پروتئین افکتور فعال شده توسط $G_{\alpha q}$ یا $G_{\alpha o}$ متصل به GTP، فسفولیپاز C (PLC) است که این آنزیم پیوند فسفواستر موجود در فسفولیپید خاص را هیدرولیز کرده و دو پیامبر ثانویه را به

وجود می‌آورد که در بالا بردن مقدار Ca^{2+} سیتوزولیک و فعال‌سازی پروتئین کیناز C (PCK) عمل می‌نماید. کیناز نام برده (PKC) به نوبه خود، بسیاری از فرایندهای سلولی مهم از قبیل رشد و تمایز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این مسیرها، همچنین پیامبرهای ثانویه‌ای تولید می‌کنند که برای تغییر شکل پروتئین‌های اکتین اسکلت سلولی و برای اتصال پروتئین‌های لازم برای اندوسیتوز و امتزاج وزیکول‌ها مهم هستند.

مشتقات فسفریله شده اینوزیتول، پیامبرهای ثانویه مهمی هستند

تعدادی از پیامبرهای ثانویه مهم که در مسیرهای انتقال پیام مختلفی کاربرد دارند، از لیپید غشایی با نام فسفاتیدیل اینوزیتول[1] یا PI به دست می‌آیند. گروه اینوزیتول در این فسفولیپید که در سمت سیتوزولی قرار دارد، می‌تواند به طور برگشت‌پذیر در یک یا چند موقعیت با فعالیت ترکیبی کینازها و فسفاتازهای متعدد، فسفریله شود (فصل ۱۶).

یکی از مشتقات PI یعنی لیپید فسفاتیدل اینوزیتول ۴ و ۵ـ بیس فسفات (PIP_2) توسط فسفولیپاز C فعال به دو پیامبر ثانویه مهم می‌شکند: ۱ و ۲ ـ دی آسیل گلیسرول (DAG) (یک مولکول لیپوفیل که متصل به غشاء باقی می‌ماند) و اینوزیتول ۱ و ۴ و ۵ – تری فسفات (IP_3) که می‌تواند به طور آزادانه در سیتوزول منتشر شود (شکل ۱۵ـ۲۹) به وقایع پایین دست درگیرکننده این دو پیامبر ثانویه مجموعاً تحت عنوان مسیر IP_3/DAG اشاره می‌کنیم.

رهایی یون کلسیم از شبکه اندوپلاسمی توسط IP_3 انجام می‌گیرد

گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین که فسفولیپاز C را فعال می‌کنند، موجب ارتقای Ca^{2+} سیتوزولیک می‌شوند، حتی وقتی که یون‌های Ca^{2+} در مایع احاطه‌کننده خارج سلولی وجود ندارند. در این وضعیت ، Ca^{2+} از شبکه آندوپلاسمی به داخل سیتوزول به واسطهٔ عمل کانال Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به IP_3 در غشاء شبکه آندوپلاسمی رها می‌شوند. (در شکل ۱۵ـ۳۰ در مرحله ❹ نشان داده شده است). این کانال بزرگ پروتئینی، از چهار زیرواحد همسان تشکیل شده است. هر یک از این زیرواحدها دارای جایگاه اتصال IP_3 در دُمین سیتوزولیک (N- ترمینال) است. اتصال IP_3 موجب باز شدن کانال و جریان کلسیم در جهت شیب غلظت آن از شبکه آندوپلاسمی به سمت سیتوزول می‌شود. وقتی که اینوزیتول‌های فسفریله شده متعدد موجود در سلول به فراورده‌های وزیکول‌های شبکه آندوپلاسمی اضافه می‌شوند، فقط IP_3 سبب رهاسازی یون‌های Ca^{2+} از وزیکول‌ها می‌شوند. این مثال تجربی، اختصاصی بودن اثر IP_3 را نشان می‌دهد.

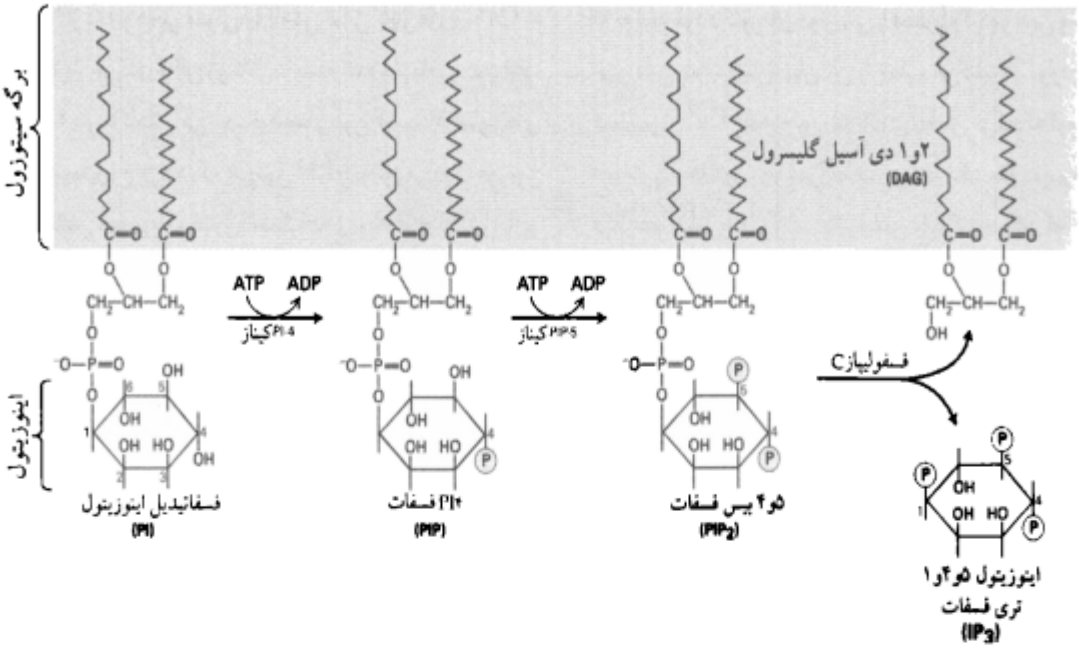
افزایش در میزان Ca^{2+} سیتوزولیک با واسطه‌ی IP_3، موقتی است زیرا پمپ‌های کلسیم که در غشاء پلاسمایی و غشاء شبکه آندوپلاسمی قرار دارند، به طور فعال، Ca^{2+} را به ترتیب از سیتوزول به خارج سلول و حفره شبکه آندوپلاسمی می‌فرستند. از این گذشته، در ظرف چند ثانیه بعد از تولیدشان، فسفات متصل شده به کربن شماره ۵ IP_3 (شکل ۱۵ـ۲۹ را ملاحظه کنید) هیدرولیز شده و اینوزیتول ۱ و ۴ – بیس فسفات، به دست می‌آید. این ترکیب نمی‌تواند به کانال پروتینی Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به IP_3 متصل شود و لذا رها شدن Ca^{2+} از شبکه آندوپلاسمی را تحریک نمی‌کند.

بدون در نظر گرفتن برخی از مسیرها که جبران‌کننده کاهش ذخیره Ca^{2+} داخل سلولی‌اند، سلول به زودی قادر به افزایش میزان Ca^{2+} سیتوزولیک در پاسخ به IP_3 القاء شده با هورمون نخواهد بود. مطالعات تکه – نگهداری (شکل ۱۱ـ۲۱ را ملاحظه کنید) نشان داده است که کانال Ca^{2+} در غشاء پلاسمایی تحت عنوان کانال عامل ذخیره‌سازی[2] در پاسخ به کاهش ذخایر Ca^{2+} در شبکه آندوپلاسمی باز می‌شود. در مسیری که کاملاً شناخته شده نیست، کاهش Ca^{2+} در فضای داخلی شبکه آندوپلاسمی منجر به تغییر ساختمان فضایی در پروتئین متصل به کانال Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به IP_3 در غشاء پلاسمایی و موجب باز شدن متعاقب آن می‌شود. (شکل ۱۵ـ۳۰ مرحله ❽ را ملاحظه کنید).

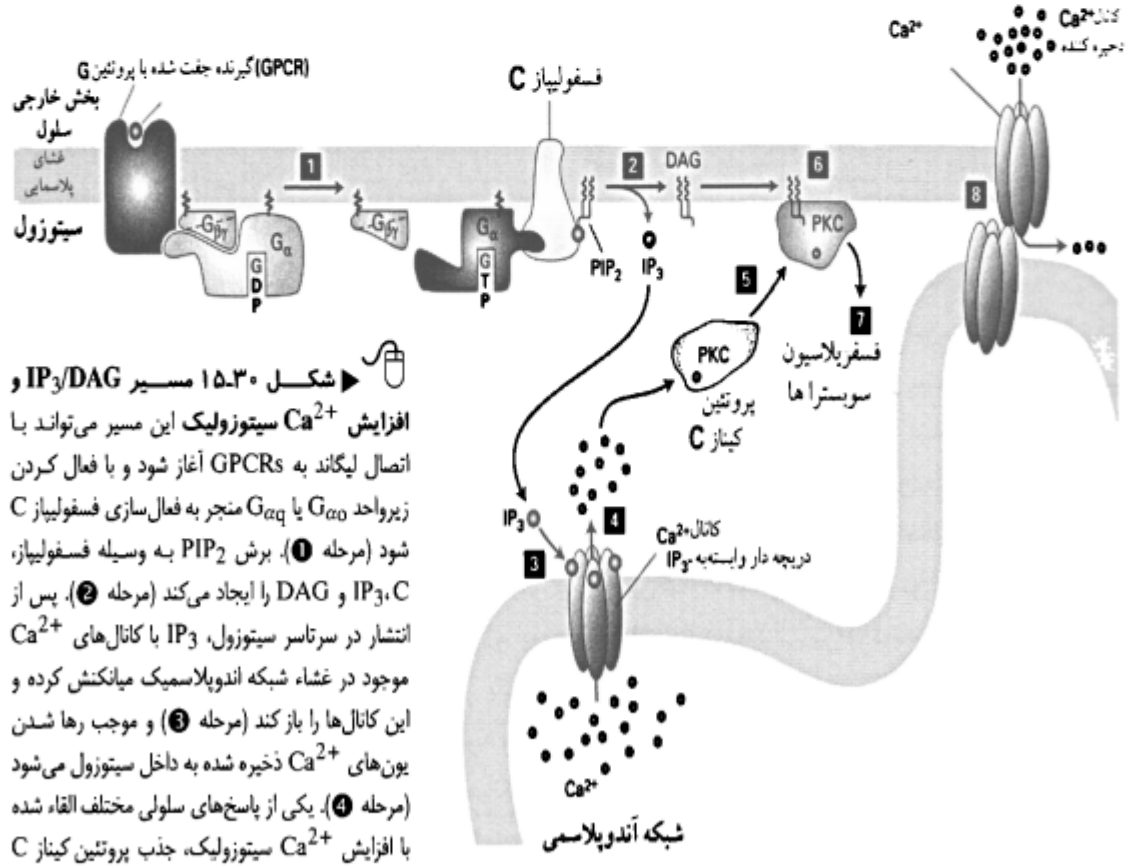
فعال‌سازی مداوم گیرنده‌های ویژه جفت شده با G- پروتئین سبب خوشه‌های بزرگ و مکرر در مقدار Ca^{2+} سیتوزولیک می‌شوند. این افزایش ناگهانی در مقدار Ca^{2+}، سبب میانکنش پیچیده بین غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک و کانال پروتئینی Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به IP_3 می‌شود. میزان زیرمیکرومولار غلظت سیتوزولیک Ca^{2+} در وضعیت استراحت، باز شدن این کانال‌ها را به وسیله IP_3 امکان‌پذیر می‌سازد و لذا افزایش سریع Ca^{2+} سیتوزولیک به دنبال تحریک هورمونی گیرنده جفت شده با G- پروتئین در سطح سلول را تسهیل می‌نماید. لیکن، کسب میزان بالای Ca^{2+} سیتوزولیک در اوج خوشه، رهایی Ca^{2+} القاء شده با

1- Phophatidylinositol

2- Store - opreated channel



▲ **شکل ۱۵-۲۹ سنتز پیامبران ثانویه DAG و IP_3 از فسفاتیدیل اینوزیتول (PI).** هر PI-کیناز متصل به غشاء، یک فسفات را بر روی یک گروه هیدروکسیل ویژه موجود در حلقه اینوزیتول قرار می‌دهد و مشتقات PIP و PIP_2 فسفریله شده را تولید می‌کند. برش PIP_2 توسط فسفولیپاز C، دو پیامبر ثانویه DAG و IP_3 را به بار می‌آورد.



◀ **شکل ۱۵-۳۰ مسیر IP_3/DAG و افزایش Ca^{2+} سیتوزولیک** این مسیر می‌تواند با اتصال لیگاند به GPCRs آغاز شود و با فعال کردن زیرواحد $G_{\alpha o}$ یا $G_{\alpha q}$ منجر به فعال‌سازی فسفولیپاز C شود (مرحله ❶). برش PIP_2 به وسیله فسفولیپاز C، IP_3 و DAG را ایجاد می‌کند (مرحله ❷). پس از انتشار در سرتاسر سیتوزول، IP_3 با کانال‌های Ca^{2+} موجود در غشاء شبکه اندوپلاسمیک میانکنش کرده و این کانال‌ها را باز کند (مرحله ❸) و موجب رها شدن یون‌های Ca^{2+} ذخیره شده به داخل سیتوزول می‌شود (مرحله ❹). یکی از پاسخ‌های سلولی مختلف القاء شده با افزایش Ca^{2+} سیتوزولیک، جذب پروتئین کیناز C (PKC) به غشاء پلاسمایی است (مرحله ❺)، جایی که توسط DAG فعال می‌شود (مرحله ❻). کیناز متصل به غشاء فعال یاد شده می‌تواند آنزیم‌ها و گیرنده‌های سلولی متعددی را فسفریله کند و بدین وسیله فعالیت آنها را تغییر دهد (مرحله ❼). همانطور که ذخایر Ca^{2+} شبکه اندوپلاسمیک کاهش می‌یابد، یک پروتئین متصل شونده به کانال‌های Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به IP_3 به کانال‌های ذخیره‌کننده Ca^{2+} موجود در غشاء پلاسمایی متصل و آنها

IP_3 را از ذخایر داخل سلولی، با کاهش تمایل کانال‌های Ca^{2+} به IP_3 مهار می‌کند. از این رو کانال‌ها بسته شده و سطح سیتوزولیک Ca^{2+} سریعاً کاهش می‌یابد. خوشه‌های یون کلسیم، در سلول‌های غده هیپوفیز رخ می‌دهد که هورمون LH را ترشح می‌کنند. هورمون LH نقش مهمی را در کنترل تخمک‌گذاری و لذا لقاح در زنان بازی می‌کند. ترشح LH با اتصال هورمون LHRH[1] به گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین در این سلول‌ها القاء می‌شود. اتصال LHRH خوشه‌های تکراری Ca^{2+} را القاء می‌کند. هر خوشه Ca^{2+}، آندوسیتوز تعداد کمی از وزیکول‌های ترشحی حاوی LH را القاء می‌کند (شاید در نزدیک‌شدنشان به غشاء پلاسمایی نقش داشته باشند). مزیت نوسان القاء شده با هورمون، در میزان Ca^{2+} سیتوزولیک و ترشح پروتئین به جای افزایش ثابت در غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک شناخته نشده است.

کمپلکس کلسیم/کالمودولین، بسیاری از پاسخ‌های سلولی را به پیام‌های خارجی وساطت می‌کند

پروتئین کوچک سیتوزولیک و متداول کالمدولین[2] به عنوان یک پروتئین سویچ چند منظوره فعالیت می‌کند و بسیاری از اثرات سلولی یون‌های Ca^{2+} را وساطت می‌نماید. اتصال Ca^{2+} به چهار جایگاه بر روی کالمودولین سبب ایجاد کمپلکسی می‌شود که با بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌های دیگر میانکنش داده و فعالیت آنها را تنظیم می‌کنند. (شکل ۳۱ـ۳ را ملاحظه کنید).

به دلیل اینکه چهار یون کلسیم به کالمودولین به شیوه تعاونی متصل می‌شوند، تغییری کوچک در مقدار Ca^{2+} سیتوزولیک منجر به تغییر وسیع در سطح فعالیت کالمودولین می‌شود.

یک آنزیم فعال شونده با کمپلکس Ca^{2+} ـ کالمودولین که به خوبی مطالعه شده است، کیناز زنجیره سبک میوزین می‌باشد که این کیناز فعالیت میوزین را در سلول‌های عضله تنظیم می‌کند (فصل ۱۷). آنزیم دیگر cAMP فسفو دی استراز است، که cAMP را به 5′-AMP/ تجزیه کرده و اثراتش را خاتمه می‌دهد. از این رو، این واکنش Ca^{2+} و cAMP را به هم مرتبط می‌کند و این یکی از مثال‌های فراوان است که دو مسیر با وساطت پیامبر ثانویه برای دقیق‌تر کردن جنبه‌های خاص از تنظیم سلول با هم میانکنش می‌دهند. در بسیاری از سلول‌ها به دنبال پیام‌رسانی با گیرنده و افزایش در مقدار Ca^{2+} سیتوزولیک به واسطهٔ IP_3 تولید شده با فسفولیپاز C، فاکتورهای رونویسی ویژه‌ای فعال می‌شوند. در برخی موارد، کمپلکس Ca^{2+}/کالمودولین، پروتئین کینازی را فعال می‌کند که به نوبه خود فاکتورهای رونویسی را فسفریله کرده و بدین وسیله با تغییر دادن فعالیت‌شان، بیان ژن را تنظیم می‌کنند. در موارد دیگر، کمپلکس Ca^{2+}/کالمودولین، فسفاتازی را فعال می‌کند که گروه‌های فسفات را از فاکتور رونویسی حذف می‌کند. یک مثال مهم از این مکانیسم، سلول‌های T سیستم ایمنی را درگیر می‌کند که در آن یون‌های Ca^{2+} فعالیت یک فاکتور رونویسی ضروری تحت عنوان NFAT[3] را تشدید می‌کند. در سلول‌های تحریک نشده، NFAT فسفریله شده در سیتوزول قرار دارد. به دنبال تحریک گیرنده و افزایش Ca^{2+} سیتوزولیک، کمپلکس Ca^{2+}/کالمودولین به کلسی‌نورین[4] متصل و آن را فعال می‌کند (پروتئین - سرین فسفاتاز). سپس این فاکتور فعال شده، ریشه‌های کلیدی را در NFAT سیتوزولیک فسفریله کرده و توالی مکان‌یابی هسته‌ای (NLS) آن را آشکار می‌کند که بدین ترتیب به NFAT اجازه می‌دهد که به سمت هسته حرکت کرده و بیان ژن‌های لازم برای فعالیت سلول‌های T را تحریک کند.

دی آسیل گلیسرول با فعال کردن پروتئین کیناز C، بسیاری از پروتئین‌های دیگر را تنظیم می‌کند

بعد از تشکیل DAG با هیدرولیز کاتالیز شده با فسفولیپاز C، این پیامبر ثانویه متصل به غشاء پلاسمایی باقی می‌ماند (شکل ۲۹ـ۱۵ را ملاحظه کنید). فعالیت اصلی DAG، فعال کردن خانواده‌ای از پروتئین کینازها است که مجموعاً پروتئین کیناز C یا PKC نامیده می‌شوند. در فقدان تحریک هورمونی، پروتئین کیناز C به‌عنوان پروتئین سیتوزولیک محلول و از نظر کاتالیتیکی غیرفعال، حضور دارد. افزایش در سطح سیتوزولیک Ca^{2+} موجب می‌شود که به سمت نیمه سیتوزولیک غشاء پلاسمایی نقل مکان کرده و در آنجا می‌تواند با DAG متصل به غشاء میانکنش می‌کند. (شکل ۳۰ـ۱۵ مراحل ❺ و ❻ را ملاحظه کنید). لذا فعال شدن پروتئین کیناز C بستگی به افزایش هر دو Ca^{2+} و DAG دارد که به نظر می‌رسد میانکنشی بین دو شاخه مسیر IP_3/DAG وجود دارد.

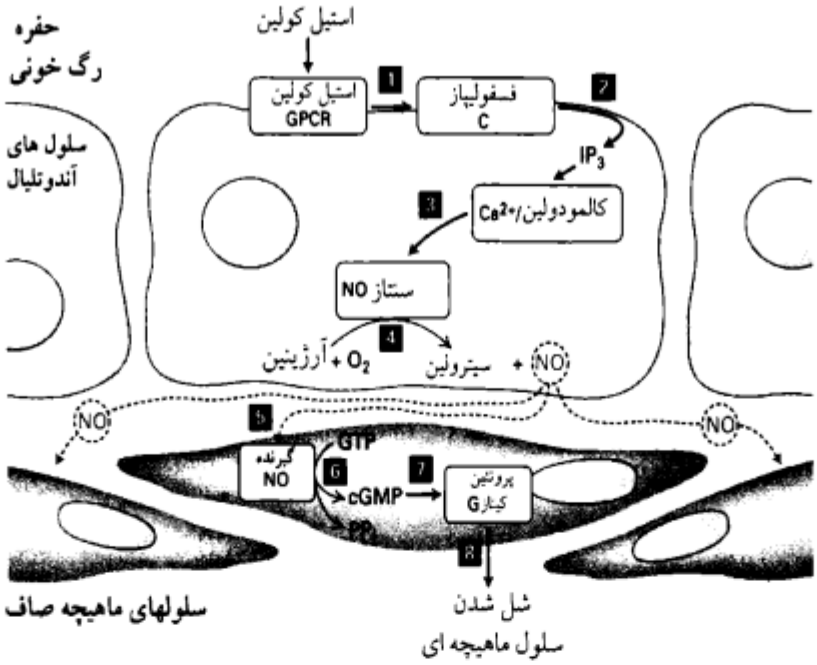
فعال شدن پروتئین کیناز C در سلول‌های مختلف، مجموعه متفاوتی از پاسخ‌های سلولی را باعث می‌شود که نشان می‌دهد نقش

1- Luteinizing hormone - releasing hormone

2- Calmodulin

3- Nuclear factor of activated T Cells

4- Calcineurin



▲ **شکل ۱۵-۳۱ مسیر cGMP/NO و شل شدگی شریان عضله صاف.** اکسید نیتریک (NO) در سلول‌های اندوتلیال در پاسخ به استیل کولین و افزایش متعاقب در غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک سنتز می‌شود. (❶-❹). NO به طور موضعی در سرتاسر بافت منتشر می‌شود و یک گیرنده داخل سلولی NO را با فعالیت گوانیلیل سیکلاز موجود در نزدیکی سلول‌های عضله صاف فعال می‌کند (❺). در نتیجه افزایش در CGMP، پروتئین کیناز G(PKG) فعال شده (❻ و ❼) و منجر به شل شدگی عضله و لذا اتساع عروق [1] می‌شود (❽). گیرنده سطح سلول متعلق به ANF[2] همچنین دارای فعالیت گوانیلیل سیکلازی ذاتی است. تحریک این گیرنده بر روی سلول‌های عضله صاف همچنین منجر به‌افزایش cGMP و شل‌شدگی متعاقب عضله می‌شود. PPi=پیروفسفات[3]

کلیدی را در بسیاری از جنبه‌های رشد سلولی و متابولیسم ایفاء می‌کند. برای مثال، در سلول‌های کبدی، پروتئین کیناز C به تنظیم متابولیسم گلیکوژن با فسفویلاسیون و لذا مهار سنتز گلیکوژن کمک می‌کند. پروتئین کیناز C، همچنین فاکتورهای رونویسی متنوعی را فسفریله می‌کند و بسته به نوع سلول، سنتز mRNA مربوط به تقسیم سلول را القا می‌کند.

استراحت القاءشده با پیام در عضله صاف عروقی به واسطه‌ی پروتئین کیناز G فعال شده با cGMP انجام می‌شود

نیتروگلیسرین، بیش از یک قرن برای درمان درد شدید قفسه صدری ناشی از آنژین استفاده می‌شود. مشخص شده است که این ترکیب به آهستگی در بدن به اکسید نیتریک (NO)[4] تجزیه می‌شود و ماده حاصله نیز سبب شل شدگی سلول‌های عضلات صاف احاطه کننده‌ها رگ‌های خونی تغذیه کنندهٔ عضلات قلبی می‌شود و بدین وسیله قطر رگ‌های خونی و جریان خون حامل اکسیژن را به عضلات قلبی افزایش می‌دهند. یکی از جذاب‌ترین موضوعات در پزشکی مدرن، کشف اکسید نیتریک (گازی سمی موجود در دود اگزوز ماشین) است که در واقع یک مولکول پیام‌رسانی طبیعی است. مدرک قطعی در مورد نقش NO در مواردی نظیر شل شدن عضله صاف از مجموعه‌ای از آزمایشات به دست آمده است که استیل کولین به فرآورده‌های آزمایشگاهی سلول‌های عضله صاف احاطه‌کننده رگ‌های خونی اضافه می‌شود. استعمال مستقیم استیل کولین، به این سلول‌ها موجب انقباض آنها می‌شود (اثر مورد انتظار استیل کولین بر روی این سلول‌های عضلانی)

اما اضافه شدن استیل کولین به داخل رگ‌های خونی کوچک جدا شده، موجب شل شدن عضلات صاف (به جای انقباض) می‌شود. مطالعات بعدی نشان داد که سلول‌های اندوتلیال (آستر فضای داخلی رگ‌های خونی) در پاسخ به استیل کولین برخی ماده‌ها را آزاد می‌کنند که به نوبه خود سبب شل‌شدگی سلول عضلانی می‌شود. ترکیبات مذکور به تدریج به NO تبدیل می‌شوند.

ما اکنون می‌دانیم که سلول‌های اندوتلیال دارای یک گیرنده جفت شده با G- پروتئین است که به استیل کولین متصل شده و فسفولیپاز C را فعال می‌کند و منجر به افزایش مقدار Ca^{2+} سیتوزولیک می‌شود. بعد از اتصال Ca^{2+} به کالمودولین، کمپلکس حاصله، فعالیت آنزیم NO سنتاز را تحریک می‌کند و تشکیل NO از O_2 و اسیدآمینه آرژینین را کاتالیز می‌کند. به دلیل اینکه

1- Vasodilation

2- Atriol Natriuretic Factor

3- Pyrophosphate 4- Nitric Oxide

NO نیمه عمر کوتاهی دارد (۲ تا ۳۰ ثانیه) بنابراین فقط به طور موضعی در بافت‌ها از جایگاه سنتزش انتشار می‌یابد. به خصوص NO از سلول اندوتلیال به داخل سلول‌های عضله صاف مجاورش منتشر و سبب شل شدن عضله می‌شود.

اثر NO بر روی عضله صاف توسط پیامبر ثانویه cGMP وساطت می‌شود که این به وسیله گیرنده NO داخل سلولی بیان شده در سلول‌های عضله صاف تشکیل می‌شود. اتصال NO به گروه هم در این گیرنده منجر به تغییر ساختمان فضایی می‌شود که این امر فعالیت گوانیلیل سیکلازی ذاتی آن را افزایش داده و موجب افزایش سطح cGMP سیتوزولیک می‌شود.

اکثر اثرات cGMP به وسیله پروتئین کیناز وابسته به cGMP با نام پروتئین کیناز G(PKG) وساطت می‌شود. در عضله صاف موجود در دیواره عروق، PKG مسیر پیام‌رسانی را که سبب مهار کمپلکس اکتین - میوزین، آرامش سلول و لذا اتساع عروق خونی می‌شود را فعال می‌کند. در این مورد، cGMP به طور غیرمستقیم از طریق پروتئین کیناز G عمل می‌کند، این در حالی است که در سلول‌های استوانه‌ای cGMP به طور مستقیم با اتصال به کانال‌های کاتیونی در غشاء پلاسمایی موجب باز شدن آنها می‌شود. (شکل ۱۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید).

شل شدن عضله صاف عروقی همچنین با اتصال فاکتور ANF[1] و برخی از هورمون‌های پپتیدی دیگر به گیرنده‌هایشان در سطح سلول‌های عضله صاف ایجاد می‌شود. دُمین سیتوزولیک این گیرنده‌های سطح سلول (مانند گیرنده داخل سلولی NO) دارای فعالیت گوانیلیل سیکلاز ذاتی است. وقتی که افزایش حجم خون در دهلیز قلب، به سلول‌های عضله قلبی فشار وارد کند، ANF توسط این سلول‌ها آزاد می‌شود. اتصال چرخه‌ای ANF به گیرنده‌اش بر روی سطح سلول‌های عضله صاف احاطه‌کننده رگ‌های خونی، فعالیت گوانیلیل سیکلازی این فاکتور و تشکیل cGMP را القاء می‌کند. فعال‌سازی متعاقب پروتئین کیناز G موجب اتساع عروق می‌شود. (مکانیسم آن در بالا شرح داده شد). اتساع عروق مذکور فشار خون را کاهش داده و با محرک مسبب رها شدن ابتدایی ANF مقابله می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۷-۱۵

گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین که فسفولیپاز C را فعال می‌کنند

- تحریک برخی گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین منجر به فعالسازی پروتئین‌های G دارای زیرواحد آلفای $G\alpha o$ و $G\alpha q$ می‌شود.
- این G پروتئین فسفولیپاز C را فعال می‌کنند که دو پیامبر ثانویه تولید می‌کند، IP3 قابل انتشار وDAG متصل به غشاء (شکل ۲۹-۱۵ را ملاحظه کنید).
- IP3 شروع به بازکردن کانالهای Ca^{+2} دریچه‌دار وابسته به IP3 در شبکه آندوپلاسمی می‌کند و Ca^{+2} آزاد وسیتوزولی را بالا می‌برد. در پاسخ به Ca^{+2} سیتوزولی بالا رفته پروتئین کیناز C به غشاء پلاسمایی فراخوانده می‌شود و در آنجا توسط DAG فعال می‌شود (شکل ۳۰-۱۵ را ملاحظه کنید).
- کاهش کمی در Ca^{+2} سیتوزولی یک عده از پاسخهای سلولی شامل ترشح هورمون، انقباض ماهیچه و تجمع پلاکت را القاء می‌کند.
- کمپلکس کالمودولین- Ca^{2+} فعالیت بسیاری از پروتئین‌های مختلف مانند cAMP فسفودی استراز، نیتریک اکسید سنتاز و پروتئین کینازها یا فسفاتازها را تنظیم می‌کند که فعالیت انواع فاکتورهای رونویسی را کنترل می‌کنند.
- تحریک استیل کولینی گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین در سلول‌های آندوتلیال افزایشی را در Ca^{2+} سیتوزولی در نتیجه سنتز NO القاء می‌کند. بعد از انتشار NO به سلول‌های ماهیچه‌ای اطراف آن گوانیلیل سیکلاز را به منظور سنتز cGMP فعال می‌کند. افزایش حاصل در cGMP منجر به فعالسازی پروتئین کیناز G می‌شود که مسیری را که باعث شل شدن ماهیچه و وازودیلاسیون می‌شود به راه می‌اندازد.
- cGMP همچنین در سلول‌های ماهیچه صاف رگی توسط تحریک گیرنده‌های سطح سلولی که فعالیت گوانیلیل سیکلازی ذاتی دارند تولید می‌شود. این سلول‌ها گیرنده‌هایی را برای فاکتور ناتریورتیک (ANF) بطنی دارند.

۸ـ۱۵ پاسخ‌های هماهنگ‌کننده سلول‌ها با اثرات محیطی

همانطور که هیچ سلولی جدا از سلول‌های دیگر زندگی نمی‌کند، هیچ مسیر پیام‌رسانی سلولی به تنهایی فعالیت نمی‌کند. تمامی سلول‌ها به طور مداوم پیام‌های متعددی را از محیط اطرافشان مانند تغییرات در مقدار هورمون‌ها، متابولیت‌ها و گازهایی نظیر اکسیژن دریافت می‌کنند. همه سلول‌های بدن همواره به نیازهای مربوط به عملکردشان علاوه بر جراحات و عفونت پاسخ می‌دهند. در این بخش ما پاسخ‌های سلولی به تغییرات در نیازمندی به متابولیت کلیدی گلوکز را مورد بررسی قرار می‌دهیم. پاسخ‌های سلولی به تغییرات مربوط به مواد غذایی دیگر و علاوه بر این به اکسیژن که به طور وسیعی در تغییر بیان ژن منعکس می‌شود، در فصل ۷ پوشش داده شده است.

ادغام و هماهنگی پیامبرهای ثانویه متعدد گلیکوژنولیز را تنظیم می‌کند

یکی از راه‌هایی که برای پاسخ مناسب به عوامل محیطی

1- Atrial natriuretic factor

پیچیده در مورد سلول‌ها وجود دارد، حس کردن و ادغام بیش از یک پیام است. مجدداً، شکست گلیکوژن به گلوکز (گلیکوژنولیز) مثالی فوق‌العاده را فراهم می‌کند. آنچنان که در بخش ۱۵.۶ بیان شد، تحریک سلول‌های عضلانی و کبدی با اپی‌نفرین منجر به افزایش پیامبر ثانویه cAMP می‌شود که به شکست گلیکوژن کمک می‌کند (شکل ۱۵.۲۵ قسمت a را ملاحظه کنید). در هر دو سلول‌های کبدی و سلول‌های عضلانی پیامبرهای ثانویه دیگر نیز پاسخ سلولی یکسانی را ایجاد می‌کنند.

در سلول‌های عضلانی، تحریک به وسیله ضربان عصبی موجب رها شدن یون‌های Ca^{2+} از شبکه سارکوپلاسمیک شده و علاوه بر این غلظت Ca^{2+} سیتوزولیک افزایش می‌یابد، که این امر سبب انقباض عضله می‌شود. افزایش در Ca^{2+} سیتوزولیک، همچنین، آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کیناز (GPK) را فعال کرده و بدین وسیله با تحریک تجزیه گلیکوژن به گلوکز -۱ - فسفات، انقباض طولانی‌تر می‌شود (با سوخت‌رسانی). به یاد دارید که فسفریلاسیون به واسطه‌ی پروتئین کیناز A وابسته به cAMP، همچنین آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز کیناز را فعال می‌کند. لذا این آنزیم کلیدی تنظیم‌کننده در گلیکوژنولیز، در عضله در هر دو معرض تنظیم هورمونی و تنظیم عصبی قرار می‌گیرد. (شکل ۱۵.۳۲ قسمت a).

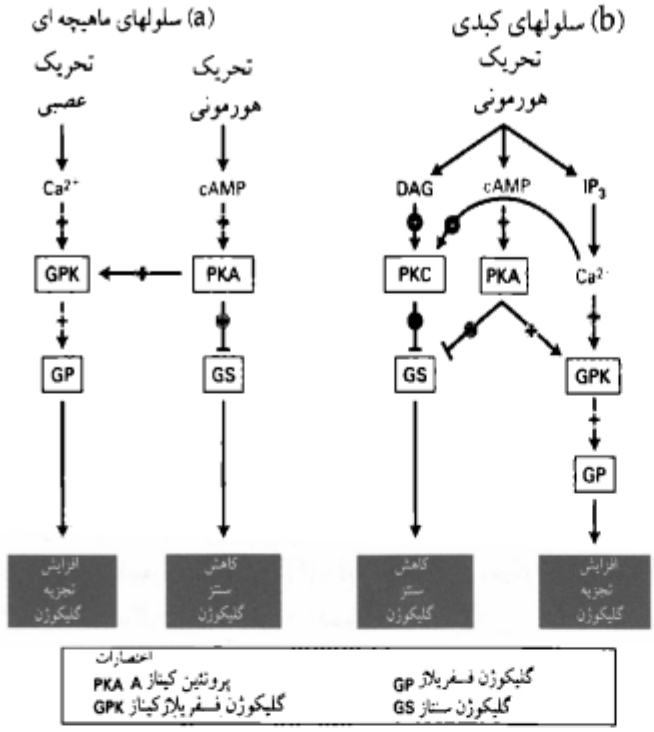
در سلول‌های کبدی، فعال‌سازی فسفولیپاز C (پروتئین اثرگر) با هورمون نیز شکست گلیکوژن را با ایجاد دو پیامبر ثانویه (DAG و IP_3) تنظیم می‌کند. همانگونه که در بخش ۱۵.۷ مشاهده کردیم، IP_3 موجب افزایش Ca^{2+} سیتوزولیک می‌شود و همانند سلول‌های عضلانی، باعث فعال شدن آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کیناز و تجزیه گلیکوژن می‌شود. از این گذشته، اثر ترکیبی DAG و افزایش Ca^{2+}، پروتئین کیناز C را فعال می‌کند (شکل ۱۵.۳۰ را ملاحظه کنید). کیناز مذکور می‌تواند گلیکوژن سنتاز را فسفریله کند و بدین وسیله با مهار آنزیم، سرعت سنتز گلیکوژن را کاهش می‌دهد. در این حالت، مسیرهای انتقال پیام گوناگون، توسط پیام مشابه فعال می‌شوند (شکل ۱۵.۳۲ قسمت b). تنظیم دوگانه گلیکوژن فسفریلاز کیناز با Ca^{2+} و پروتئین کیناز A هم در کبد، و هم در ماهیچه حاصل ساختار چند زیرواحدی آن است $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. زیر واحد γ آنزیم کاتالیتیک است و زیرواحدهای تنظیمی α و β که در ساختار مشابه‌اند، به وسیله پروتئین کیناز A فسفریله می‌شوند و زیرواحد δ نیز کالمودولین است. ماکزیمم فعالیت گلیکوژن فسفریلازکیناز وقتی است که یون‌های Ca^{2+} به زیرواحد کالمودولین (δ) متصل و حداقل زیرواحد α توسط پروتئین کیناز A فسفریله می‌شود. در واقع، اتصال Ca^{2+} به زیرواحد کالمودولین ممکن است که برای فعالیت آنزیماتیک گلیکوژن فسفریلازکیناز الزامی باشد. فسفریلاسیون زیرواحدهای α و β تمایل زیرواحد کالمودولین را برای Ca^{2+} افزایش می‌دهند که این به یون‌های Ca^{2+} امکان اتصال به آنزیم را در غلظت کمتر از میکرومولار موجود در سلول‌های تحریک نشده با عصب را فراهم می‌کند. از این رو، افزایش غلظت سیتوزولیک Ca^{2+} یا cAMP و یا هر دو آنها، موجب افزایش رو به رشد فعالیت آنزیم گلیکوژن فسفوریلاز کیناز می‌شود. بعد از تحریک عصبی سلول‌های عضلانی در نتیجه افزایش میزان Ca^{2+} سیتوزولیک آنزیم گلیکوژن فسفریلاز کیناز حتی در صورتی که فسفریله نباشد، فعال خواهد شد. لذا گلیکوژن می‌تواند به منظور تأمین سوخت مداوم انقباض عضله در فقدان تحریک هورمون هیدرولیز شود.

انسولین و گلوکاگون با یکدیگر برای حفظ پایداری سطح گلوکز خون عمل می‌کنند

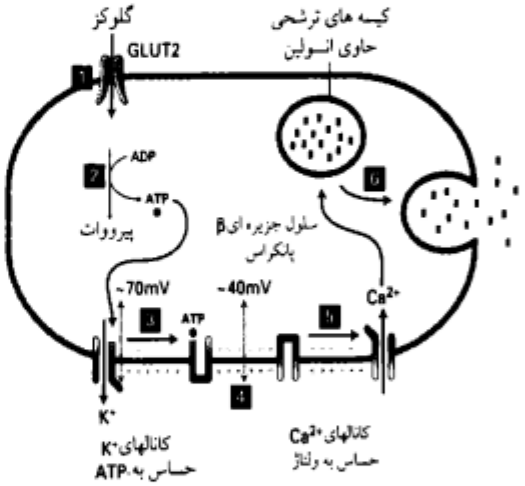
در طول زندگی طبیعی، گلوکز خون وابسته به تعادل بین دو هورمون پپتیدی انسولین و گلوکاگون است که این دو در سلول‌های متمایز جزایر کوچک پانکراس ساخته شده و پاسخ‌های سلولی متفاوتی را باعث می‌شوند. انسولین با دو زنجیره پلی پپتیدی متصل شده با اتصالات دی سولفیدی به وسیله سلول‌های β جزایر سنتز می‌شود در حالی که گلوکاگون (پپتید مونومریک) به وسیلهٔ سلول‌های α جزایر تولید می‌شوند. انسولین سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد، در حالی که گلوکاگون گلوکز خون را افزایش می‌دهد.

موجودی گلوکز خون در خلال دوره فراوانی (پس از میل غذا) یا کمبود (پس از روزه‌داری) با تغییر غلظت انسولین و گلوکاگون تنظیم می‌شود. به دنبال میل غذا، وقتی که گلوکز خون بالاتر از حد طبیعی خود (۵mM) می‌رسد، سلول‌های β پانکراس با رها کردن انسولین به داخل خون به افزایش گلوکز (و اسیدآمینه) پاسخ می‌دهند. انسولین رها شده، در خون گردش کرده و به گیرنده انسولین موجود در انواع مختلف سلول‌ها مانند عضله و بافت چربی متصل می‌شوند. گیرنده انسولین متعلق به دسته‌ای از گیرنده‌ها تحت عنوان **گیرنده‌های تیروزین کینازی** یا RTKs[1] است (فصل ۱۶). این گیرنده قادر به انتقال پیام‌ها از طریق یک مسیر داخل سلولی است که منجر به فعال شدن **پروتئین کیناز** B می‌شود. پروتئین کیناز B با مکانیسم ناشناخته‌ای موجب امتزاج وزیکول‌های داخل سلولی حاوی ناقل GLUT4 گلوکز با غشاء پلاسمایی می‌شود (شکل ۱۵.۳۴). افزایش ۱۰ برابری حاصله در تعداد مولکول‌های GLUT4 بر روی سطح سلول، جریان نسبی گلوکز را افزایش داده و از این رو گلوکز خون کاهش می‌یابد. هنگامی که سطح گلوکز خون پایین می‌آید، ترشح انسولین و سطح آن در خون کاهش یافته و علاوه بر این گیرنده‌های انسولین دیگر با شدت سابق فعال نمی‌شوند. در پاسخ، GLUT4 در سطح سلول با اندوسیتوز جذب سلول شده و این با کاهش سطح GLUT4 و لذا ورود گلوکز همراه است. تحریک سلول‌های عضلانی

1- Receptor Tyrosine Kinase



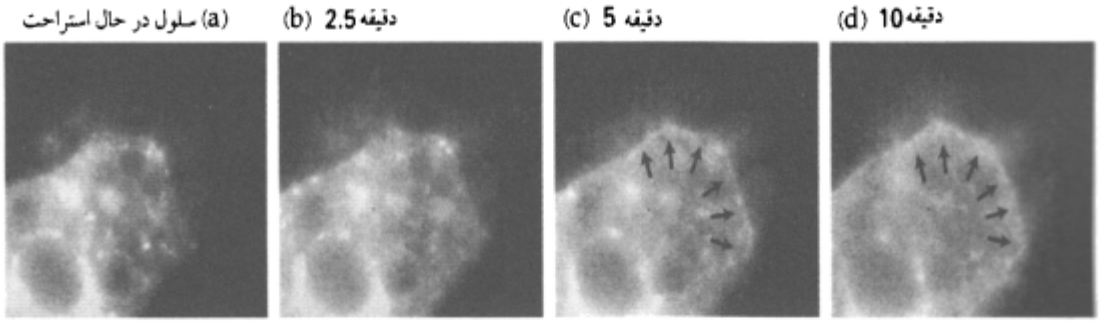
◀ **شکل ۱۵ـ۳۲ تنظیم هماهنگ شده گلیکوژنولیز** (a) تحریک عصبی عضله مخالط صاف و یا اتصال اپی‌نفرین به گیرنده‌های β- آدرنرژیک بر روی سطح آنها، به ترتیب منجر به افزایش غلظت سیتوزولیک پیامبران ثانویه Ca^{2+} یا cAMP می‌شود. آنزیم تنظیمی کلیدی گلیکوژن فسفریلاز کیناز (GPK) توسط یون‌های Ca^{2+} و فسفریلاسیون توسط پروتئین کیناز A وابسته به cAMP (PKA) فعال می‌شود. (b) در سلول‌های کبدی، تحریک هورمونی گیرنده‌های β- آدرنرژیک منجر به افزایش غلظت سیتوزولیک cAMP و دو پیامبر ثانویه دیگر دی آسیل گلیسرول (DAG) و اینورزیتول ۱ و ۴ و ۵ تری فسفات (IP_3)) می‌شود.



▲ **شکل ۱۵ـ۳۳ ترشح انسولین در پاسخ به افزایش گلوکز خون.** ورود گلوکز به داخل سلول‌های β پانکراس به وسیله ناقل گلوکز GLUT2 وساطت می‌شود ❶. به دلیل اینکه Km گلوکز مربوط به این ناقل ($GLUT_2$) تقریباً ۲۰mM است، لذا افزایش گلوکز خارج سلولی از ۵mM (از ویژگی‌های وضعیت گرسنگی) موجب افزایش نسبی سرعت ورود گلوکز می‌شود (شکل ۱۱ـ۴ را ملاحظه کنید). لذا تبدیل گلوکز به پیروات، تشدید می‌شود و باعث افزایش غلظت ATP در سیتوزول می‌گردد ❷. اتصال ATP به کانال‌های K^+ حساس به ATP موجبات بسته شدن این کانال‌ها را فراهم می‌آورد ❸، از این رو انتشار یون‌های K^+ از سلول به خارج کاهش می‌یابد. پلاریزاسیون کوچک حاصله غشاء پلاسمائی ❹ سبب باز کشدن کانال‌های Ca^{2+} حساس به ولتاژ می‌شود ❺. جریان یون‌های Ca^{2+}، غلظت این یون‌ها را در سیتوزول افزایش می‌دهد و موجب امتزاج وزیکول‌های ترشحی حاوی انسولین با غشاء پلاسمایی و ترشح انسولین می‌شود ❻.

با انسولین، همچنین در تبدیل گلوکز به گلیکوژن کمک می‌کند و مضاف بر این تجزیه گلوکز به پیروات را تشدید می‌نماید. انسولین همچنین در هپاتوسیت‌ها (سلول‌های کبدی) برای مهار سنتز گلوکز از مولکول‌های کوچکتر مانند لاکتات و استات و علاوه بر این تشدید سنتز گلیکوژن از گلوکز عمل می‌نماید. اثر نهایی تمامی این فعالیت‌ها به منظور بازگشت سطح گلوکز خون به غلظت ناشتا (در حدود ۵ میلی مول) و ذخیره گلوکز داخل سلولی مازاد به صورت گلیکوژن برای استفاده‌های بعدی است. در صورتی که سطح گلوکز خون به پایین‌تر از ۵ میلی‌مول کاهش یابد، برای مثال به علت فعالیت ناگهانی عضله، کاهش ترشح انسولین از سلول‌های β پانکراس، موجب القاء سلول‌های α برای افزایش ترشح گلوکاگون به داخل خون می‌شود. همانند گیرنده اپی نفرین، گیرنده گلوکاگون در ابتدا بر روی سلول‌های کبدی یافت شده و با پروتئین $G_{\alpha s}$ جفت شده و پروتئین اثرگر آن، آدنیلیل سیکلاز است. تحریک سلول‌های کبد با گلوکاگون، افزایش cAMP را القاء می‌کند که این امر منجر به فعال شدن پروتئین کیناز A می‌شود که پروتئین کیناز A نیز سنتز گلیکوژن را مهار و به گلیکوژنولیز کمک می‌کند (محصول آن گلوکز -۱ - فسفات). (شکل ۱۵ـ۲۵ قسمت a و ۱۵ـ۳۲ قسمت b را ملاحظه کنید). سلول‌های کبدی گلوکز -۱ - فسفات را به گلوکز تبدیل می‌کنند که به داخل خون رها شده و از این رو گلوکز خون در جهت بازگشت به سطح ناشتای طبیعی افزایش می‌یابد.

متأسفانه این سیستم‌های کنترل قدرتمند و ظریف گاهی اوقات از کار افتاده و سبب بیماری‌های وخیم و حتی مرگ‌آور می‌شوند.



▲ **شکل تجربی ۳۴-۱۵ (شکل رنگی) تحریک سلول‌های چربی با انسولین، نقل مکان GLUT4 از وزیکول‌های خارج سلولی به غشاء پلاسمایی را القاء می‌کند.** در این آزمایش، سلول‌های چربی با بیان پروتئین نوترکیب مهندسی شدند که انتهای N-ترمینال آن همان توالی GLUT4 است و ـ کی توالی GFP دنبال می‌شود. هنگامی که یک سلول در معرض نور در طول موج برانگیخته‌کننده قرار می‌گیرد (GTP با نور فلورسانس سبز- زرد)، موقعیت GLUT4 را در سلول نشان می‌دهد. در سلول‌های در حال استراحت (a)، اکثر GLUT4 در غشاهای داخلی هستند و با غشاء پلاسمایی تماسی ـ ـ. تصویرهای متوالی از یک سلول پس از تیمار با انسولین برای ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه، تعداد بیشتری از این غشاهای حاوی GLUT4 با غشاء پلاسمایی دغم می‌شوند و بدین وسیله حرکت GLUT4 را به سطح سلول و توانایی آن را برای انتقال گلوکز از خون به داخل سلول نشان می‌دهد. سلول‌های عضلانی همچنین حاوی ناقل‌های GLUT4 حساس به انسولین هستند.

دیابت ملیتوس[1]، نتیجه نقص در میزان انسولین رها شده از پانکراس در پاسخ به بالا رفتن گلوکز خون (نوع I) و یا در اثر کاهش توانایی سلول‌های عضله و سلول‌های چربی برای پاسخ به انسولین (نوع II) است. در هر دو نوع، تنظیم گلوکز خون ضعیف می‌شود که این امر منجر به افزایش مستمر غلظت گلوکز خون (هیپرگلیسمیا) می‌شود و در صورتی که درمان نشود، عوارض احتمالی دیگری ایجاد می‌کند. دیابت نوع I، به وسیله یک فرآیند اتوایمن ایجاد می‌شود که سلول‌های تولیدکننده انسولین در پانکراس را تخریب می‌کند. همچنین، دیابت‌های تحت نام وابسته به انسولین، این شکل از بیماری عموماً در پاسخ به درمان انسولینی ایجاد می‌شود. اکثر مردم آمریکا، دچار دیابت ملیتوس نوع II هستند (دیابت غیروابسته به انسولین)، اما عامل زمینه‌ساز این شکل از بیماری به خوبی درک نشده است. با شناسایی بیشتر مسیر پیام‌رسانی که متابولیسم انرژی را تحت کنترل دارد، انتظار می‌رود که درکی از پاتوفیزیولوژی بیماری فراهم شود و امیدوارانه منجر به ایجاد روش‌های جدید برای درمان این بیماری‌ها شود.

نکات کلیدی بخش ۸-۱۵

پاسخهای همانگ سلول‌ها به اثرات محیطی

- تجزیه و سنتز گلیکوژن توسط چندین پیامبر ثانویه القاشده توسط تحریک عصبی یا هورمونی تنظیم می‌شود.
- افزایش گلوکز خون رهایی انسولین را از سلول‌های β پانکراسی (شکل ۳۳-۱۵ را ملاحظه کنید) تحریک می‌کند. اتصال بعدی انسولین به گیرنده‌اش بر روی سلول‌های ماهیچه‌ای و آدیپوسیت‌ها (سلول‌های چربی) منجر به فعالسازی پروتئین کیناز B می‌شود که جذب گلوکز و سنتز گلیکوژن و در نتیجه کاهش گلوکز خون را باعث می‌شود.
- کاهش قند خون رهایی گلوکاگن را از سلول‌های α پانکراسی تحریک می‌کند و اتصال گلوکاگن به گیرنده جفت شده با G پروتئین بر روی سلول‌های کبدی گلیکوژنولیز را توسط آبشار کینازی ایجاد شده توسط cAMP (مشابه با تحریک اپی‌نفرینی تحت شرایط استرس) شروع می‌کند و افزایش گلوکز خون را باعث می‌شود.

چشم‌اندازی به آینده

در این فصل عمدتاً بر روی مسیرهای انتقال پیامی متمرکز شدیم که به واسطهٔ گیرنده‌های منفرد جفت‌شده با G - پروتئین‌ها فعال می‌شوند. با این وجود، حتی این مسیرهای نسبتاً ساده در سلول‌های زنده پیچیدگی بیشتری را نشان می‌دهند. بسیاری از گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها را گیرنده‌های جفت‌شونده با G - پروتئین‌های هومودایمر و هترودایمر تشکیل می‌دهند که به لیگاندهایی با ویژگی وتمایلات متفاوتی متصل می‌شوند. بسیاری از تحقیقات کنونی بر روی تعیین نقش این گیرنده‌های دایمر در بدن متمرکز می‌شوند. گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها با تقریب ۷۲۰ عضو، بزرگترین خانواده از پروتئین‌های رمزشونده در ژنوم

1- Diabetes mellitus

انسان را تشکیل می‌دهند تصور می‌شود که تقریباً نصف این ژن‌ها گیرنده‌های حس‌گر را رمزدهی می‌کنند (اکثریت اینها در سیستم بویائی و اتصال ترکیبات معطر قرار دارند.)

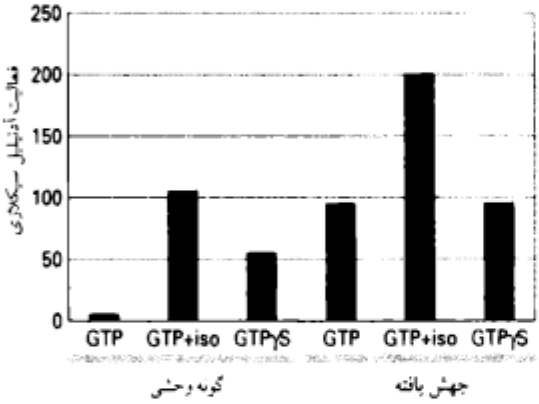
از ۳۶۰ گیرنده G - پروتئین باقیمانده، لیگاند طبیعی حدوداً ۲۱۰ گیرنده شناسائی شده است و ۱۲۰ تای بقیه orphan-GCPRs نامیده می‌شوند. به بیانی دیگر اینها گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین (GPCRs) بدون لیگاندهای هم‌خانواده شناخته شده هستند. احتمالاً بسیاری از گیرنده‌های یتیم به مولکول‌های پیام‌رسان ناشناخته سابق مانند هورمون‌های پپتیدی جدید، متصل می‌شوند. پیش از این گیرنده‌های جفت شده با G - پروتئین‌ها بزرگترین دسته از مولکول‌های هدف برای داروهای موجود در طب بالینی را نشان دادند، و لذا گیرنده‌های یتیم (orphan) ذخائر مفیدی برای کشف دارو در داروسازی صنعتی محسوب می‌شوند.

یکی از روشهایی مؤثر در شناسایی لیگاندهای متعلق به گیرنده‌های orphan مستلزم شناسائی مواد در عصارهٔ بافتی فعال‌کنندهٔ مسیرهای انتقال پیام در این سلول‌ها است. این روش هم‌اکنون به درک چشم‌گیر در مورد رفتار انسان شده است. یک مثال از این قبیل دو پروتئین جدید تحت عنوان‌های orexin-A و orexin-B هستند (منشأ آنها از کلمهٔ یونانی orexis به معنی اشتها است). هر دو این پروتئین‌ها به عنوان لیگاند برای گیرنده‌های orphan محسوب می‌شوند. تحقیقات بیشتر نشان داد که ژن orexin، فقط در هیپوتالاموس [1] (قسمتی از مغز که تغذیه را تنظیم می‌کند) بیان می‌شود. تزریق orexin به داخل بطن مغز موجب خوردن بیشتر حیوان می‌شود و علاوه بر این بیان ژن orexin به وضوح در طول گرسنگی افزایش یافت. هر دو این یافته‌ها با نقش orexin در افزایش اشتها سازگارند. جالب اینکه، موشهای ناقص از نظر orexin به خواب آلودگی [2] مبتلا می‌شوند که در انسان با خواب‌آلودگی روزانه مفرط و در موش با خواب‌آلودگی شبانه همراه است. از این گذشته گزارشات جدیدتر پیشنهاد می‌کند که سیستم orexin در اکثر بیماران با خواب‌آلودگی در انسان مختل می‌شود و پپتیدهای orexin در مایع مغزی نخاعی [3] قابل شناسائی نیستند (اگر چه هیچ مدرکی در مورد جهش در ژن‌های orexin وجود ندارد). این یافته‌ها قاطعانه نوروپپتیدهای orexin و گیرنده‌های مربوط به آنها را هم برای رفتار گرسنگی و هم برای خواب در مورد انسان و حیوان مرتبط می‌کند.

هر کسی می‌تواند از پپتیدهای دیگر و هورمون‌های کوچک که کشف نشده‌اند شگفت زده شود و دیدگاهایی که آنها را مطالعه می‌کند درک ما را از متابولیسم، رشد و رفتار انسان افزایش خواهد داد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهش در G پروتئین‌های سه‌تایی می‌تواند باعث بیماریهای زیادی در انسان شود. بیماران آکرومگالی اغلب اوقات تومورهای هیپوفیزی دارند که هورمون هیپوفیز به نام هورمون رشد را بیش از حد ترشح می‌کنند. تعدادی از تومورهای هیپوفیزی ترشح کننده هورمون رشد (GH) در نتیجه جهش در پروتئین‌های G هستند هورمون رهاساز GH(GHRH) رهایی GH را از هیپوفیز توسط اتصال به گیرنده‌های GHRH و تحریک آدنیلیل سیکلاز تحریک می‌کند. کلون‌سازی و تعیین توالی ژن $G\alpha s$ جهش‌یافته و نوع وحشی از افراد طبیعی و بیمار با تومور هیپوفیز جهش معنی‌دار را در توالی ژن $G\alpha s$ آشکار کرده است.



a) برای بررسی اثر این جهش بر روی فعالیت $G\alpha s$، cDNAهای $G\alpha s$ نوع وحشی و جهش‌یافته وارد سلول‌هایی که فاقد ژن $G\alpha s$ بودند شدند. این سلول‌ها یک گیرنده β_2- آدرنرژیک را بیان می‌کردند که می‌توانست توسط ایزوپروترنول فعال شود (یک آگونیست گیرنده β_2-آدرنرژیک). غشاءها از سلول‌های دریافت‌کننده آن ژن جداسازی شدند و برای فعالیت آدنیلیل سیکلازی در حضور GTP یا مشتق GTP مقاوم به هیدرولیز (GTPγs) ارزیابی شدند. با توجه به شکل بالا شما چه چیزی را درباره اثر جهش بر روی فعالیت $G\alpha s$ در حضور GTP تنها با GTPγs تنها و یا GTP همراه با ایزوپروترنول (iso) نتیجه‌گیری می‌کنید.

b) در سلول‌های دریافت‌کننده ژن که در قسمت a توضیح داده شده‌اند، چه چیزی را پیشگویی می‌کنید وقتی که سطوحی از cAMP در سلول‌های دریافت‌کننده ژن $G\alpha s$ نوع وحشی یا $G\alpha s$

1- Hypothalamus 2- Narcolepsy
3- Cerebrospinal

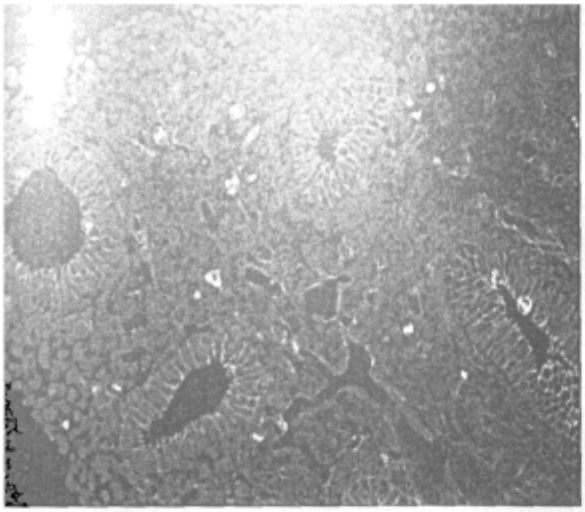
جهش‌یافته وجود داشته باشد؟ چه تأثیری ممکن است بر روی سلول‌ها داشته باشد؟

e) به منظور شناسایی بیشتر نقص مولکولی ایجادشده توسط این جهش، فعالیت GTPase ذاتی موجود در هر دو نوع وحشی و جهش یافته سنجش شد. سنجش‌های فعالیت GTPase نشان داد که جهش $K_{cat\text{-}GTP}$ (ثابت سرعت کاتالیز برای هیدرولیز GTP) را از مقدار $۴/۱min^{-۱}$ در نوع وحشی به مقدار $۰/۱min^{-۱}$ در نوع جهش‌یافته کاهش داد. شما چه چیزی را در مورد اثر این جهش بر روی فعالیت GTPase موجود در زیرواحد $G\alpha s$ جهش‌یافته نتیجه می‌گیرید؟ چگونه این نتایج GTPase نتایج آدنیلیل سیکلاز نشان داده شده در قسمت a را توجیه می‌کنند؟

۱۶

پیام رسانی سلولی II:

مسیرهای پیام‌رسانی که عملکرد ژن را کنترل می‌کنند



(شکل رنگی) پیام رسانی MAP کیناز در ریمه جنین موش ۱۳/۵ روزه. ERK فعال شده توسط آنتی‌بادی اولیه که ERK فسفریله را می‌شناسد، و به دنبال آن توسط اتصال آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITC با فلورسانس سبز رنگ شناسایی می‌شود.

رئوس مطالب

۱۶.۱ گیرنده‌های TGF_{β} و فعال‌سازی مستقیم Smads

۱۶.۲ گیرنده‌های سیتوکینها و مسیر JAK/STAT

۱۶.۳ گیرنده تیروزین کیناز

۱۶.۴ فعال‌سازی Ras و مسیرهای MAP کیناز

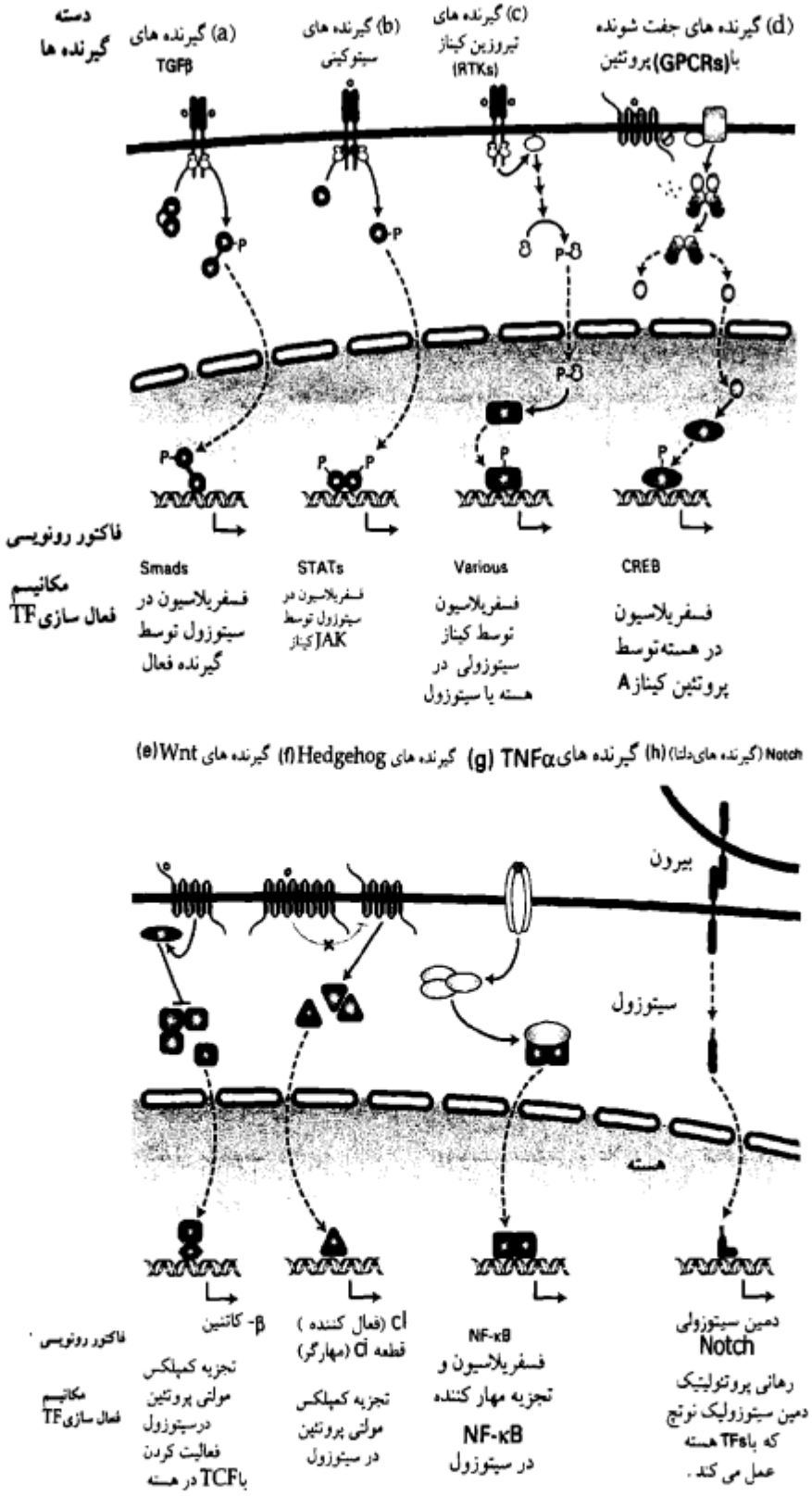
۱۶.۵ فسفواینوزیتید در نقش ناقلین پیام

۱۶.۶ فعال‌سازی بیان ژن توسط گیرنده‌های سطح سلول ۷ بار عبورکننده از غشاء

۱۶.۷ مسیرهایی که شامل شکست پروتئینی القاء شده توسط پیام هستند

توانایی سلول‌ها برای پاسخ به محیطشان برای بقاء آنها الزامی است. پاسخ‌های کوتاه مدت به محرک‌های محیطی که می‌توانند سریع و برگشت‌پذیر رخ بدهند، اکثراً در نتیجه تغییرات پروتئین‌ها می‌باشد (در فصل ۱۵ به طور مشروح بیان شده است). پاسخ‌های با مدت زمان طولانی‌تر که در این فصل بحث خواهند شد، معمولاً در نتیجه تغییر در رونویسی ژن‌ها رخ می‌دهد. رونویسی به وسیله ساختار کروماتین، کلیه فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های دیگر در سلول تحت تأثیر قرار می‌گیرند (فصل ۷). اینها تعیین می‌کنند که کدام ژن‌ها در سلول مذکور به طور بالقوه قادر به رونویسی در زمان معینی هستند. ما تصور می‌کنیم که این ویژگی‌ها در حکم حافظه سلولی می‌باشد و به وسیله سرگذشت پاسخ آنها به پیام‌های گذشته تعیین می‌شود. ولیکن بسیاری از فاکتورهای رونویسی و کلیدی در وضعیت غیرفعال در سیتوزول و هسته نگه داشته می‌شوند و در پاسخ به پیام‌های خارجی فعال می‌شوند. در این فصل، ما نحوه اتصال لیگاندها به گیرنده‌های سطح سلول را بررسی می‌کنیم. فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی و نهایتاً الگوی صحیح بیان سلولی ژن را بررسی می‌کنیم.

پیام‌های خارج سلولی که پاسخ‌های بلندمدت را القا می‌کنند، بسیاری از جنبه‌های فعالیت سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند: تقسیم، تمایز و علاوه بر این حتی ارتباط با سلول‌های دیگر. تغییر در مسیرهای پیام‌رسانی یاد شده، موجب بسیاری از بیماری‌های انسانی از جمله سرطان، دیابت و نقص ایمنی می‌شود. علاوه بر نقش‌های مهمی که پیام‌های خارجی در رشد و تکامل بازی می‌کنند، پیام‌ها باعث می‌شوند سلول‌ها تمایزیافته با تغییر شکل، متابولیسم یا تحرک به محیط خودشان پاسخ دهند. برای مثال یکی از فاکتورهای رونویسی (NF-κB) احتمالاً بیان بیش از ۱۵۰ ژن لازم در پاسخ ایمنی به عفونت تحت تأثیر قرار می‌دهد. NF-κB به وسیله هورمون‌ها و پروتئینی که بر روی سلول‌های سیستم ایمنی عمل می‌کنند، فعال می‌شود. خانواده دیگر مولکول‌های پیام‌رسانی خارج سلولی سیتوکین‌ها، در حفظ سطح مناسب سلول‌های خونی از قبیل اریتروسیت‌ها (سلول‌های قرمز خون) و لوکوسیت‌ها (سلول‌ها



▲ **شکل ۱-۱۶ نظری اجمالی به هشت گروه اصلی گیرنده‌های سطح سلول.** در بسیاری از مسیرهای پیام رسانی، اتصال لیگاند به گیرنده، منجر به فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی (TFs) در سیتوزول شده، و باعث انتقال آنها به هسته و تحریک (و به‌ندرت سرکوب) رونویسی ژن‌های هدفش می‌شود (b و a). به طور جایگزین تحریک گیرنده ممکن است که منجر به فعال شدن پروتئین کینازهای سیتوزولی شود که سپس به داخل هسته وارد شده و فعالیت TFs هسته‌ای را تنظیم می‌کنند (d و c). در مسیرهای دیگر، TFs فعال از کمپلکس‌های چند پروتئینی رها شده (f و e) و یا اینکه توسط لیز شدن رها می‌شوند (h و g). تعدادی از گروه‌های گیرنده‌ها قادر به آغاز بیش از یک مسیر داخل سلولی هستند همان طور که در شکل ۲-۱۶ نشان داده شده است.

سفید خون) و پلاکت‌ها نقش دارند.

به منظور بررسی تنوع مکانیسم‌های فعال‌سازی فاکتورهای کلیدی رونویسی، در این فصل بر روی هشت گروه از گیرنده‌های سطح سلول و علاوه بر این مسیرهای پیام‌داخل سلولی فعال شده توسط آنها تمرکز می‌کنیم. اتصال لیگاند به بسیاری از گیرنده‌ها سبب تشکیل کمپلکس دو (یا بیشتر) مولکول گیرنده در سطح سلول شده و به این ترتیب آنها فعال می‌شوند. در اکثر مسیرهای پیام‌رسانی یک یا چند پروتئین کیناز نقش دارد.

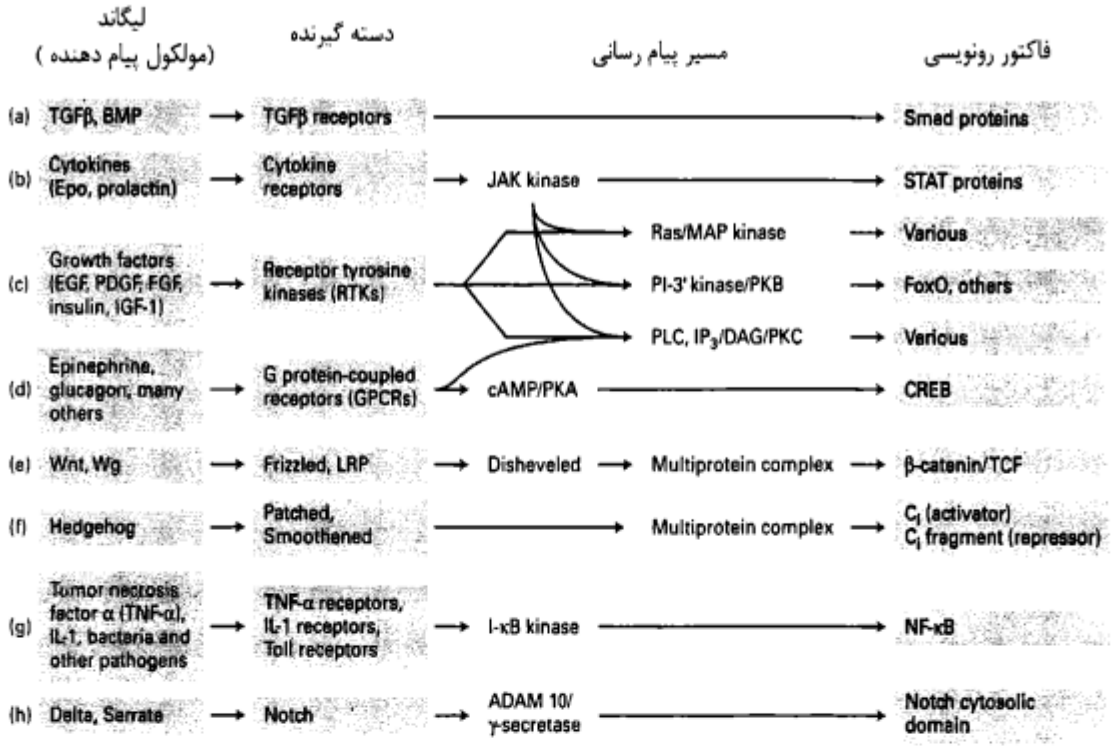
کینازها ممکن است قسمت داخلی پروتئین گیرنده باشند و یا اینکه به طور محکم به یک گیرنده متصل شده باشند. در هر دو مورد، عملکرد کیناز با اتصال لیگاند فعال می‌شود که این نیز باعث فعال‌سازی (مستقیم یا غیرمستقیم) فاکتورهای رونویسی ویژه موجود در سیتوزول می‌شود (شکل ۱ـ۱۶ a و b). در مسیرهای دیگر، تحریک گیرنده منجر به فعال شدن پروتئین کینازهای سیتوزولی و انتقال آنها به داخل هسته می‌شود که آنها به نوبه خود فاکتورهای رونویسی ویژه هسته‌ای را فسفریله می‌کنند (شکل ۱ـ۱۶، c و d). اتصال لیگاند به گیرنده در سایر پروتئین‌های پیام‌رسان موجب تجزیه کمپلکس‌های چند پروتئینی در سیتوزول و رها شدن فاکتورهای رونویسی می‌شود که سپس آنها به داخل هسته انتقال می‌یابند (شکل ۱ـ۱۶، f). در مسیرهای پیام‌رسانی دیگر، برش پروتئولیتیک مهارکننده یا خودگیرنده، باعث آزاد شدن یک فاکتور رونویسی فعال می‌گردد (شکل ۱ـ۱۶، g و h). اساساً به منظور کنترل سطح و مدت زمان اثرات پیام‌ها در بیان سلولی، ژن تمامی این مسیرها (اغلب به وسیله پس نورد منفی) به شدت کنترل می‌شوند.

یک سلول معمولی پستانداران، تقریباً ۱۰۰ نوع گیرنده مختلف سطح سلولی بیان می‌کند که بسیاری از اینها مسیرهای انتقال پیام یکسان و یا مشابهی را فعال می‌کنند. همانطور که در شکل ۲ـ۱۶ نشان داده شده است، گروه‌های مختلف گیرنده‌ها قادر به انتقال پیام در بیشتر از یک مسیر هستند و علاوه بر این برخی از مسیرها در سلول‌های خاصی در مقایسه با سلول‌های دیگر بیشتر فعال می‌شوند. از این گذشته، بسیاری از ژن‌ها به وسیله چندین فاکتور رونویسی تنظیم می‌شوند و هریک از این فاکتورهای رونویسی نیز می‌توانند با یک یا تعداد بیشتری از پیام‌های خارج سلولی فعال شوند. به ویژه در خلال مراحل اولیه رشد و تکوین، این تداخل[1] موجود بین مسیرهای پیام‌رسانی و تغییرات الگوی بیان ژنی ناشی از آن، سرانجام می‌تواند گستردگی بیشتری داشته باشد به طوری که سلول سرنوشت تکوینی متفاوتی را به خود بگیرد. سابقه و وضعیت تنظیمی سلول می‌تواند اثر پیام را تغییر دهد به طوری که وقتی پیام یکسانی به سلول‌های مختلف اعمال شود پاسخ‌های متفاوتی ایجاد خواهد شد.

مسیرهایی که در این فصل بحث می‌کنیم، در طی تکامل حفظ شده‌اند به طوری که در مگس، کرم و انسان یکسان عمل می‌کنند. هومولوژی ذاتی موجود در میان بسیاری از پروتئین‌های مسیرهای پیام‌رسانی محققان را قادر به استفاده از مجموعه متنوعی از روش‌های آزمایشگاهی و سیستم‌ها، برای شناسایی و مطالعه عملکرد مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی، گیرنده‌ها و پروتئین‌های ناقل پیام داخل سلولی ساخته است. برای مثال، پروتئین ترشحی پیام‌رسان (Hh)[2] و گیرنده‌اش در ابتدا در دروزوفیلای جهش یافته دارای نقص در تکوین شناسایی شد. به دنبال آن، هومولوگ‌های انسانی و موشی این پروتئین کلون شدند و نشان داده شدند که در تعدادی از وقایع پیام‌رسانی مهم تمایز شرکت می‌کنند. فعال‌سازی غیرطبیعی مسیر Hh در برخی از تومورهای انسانی رخ می‌دهد. مثال‌های بررسی شده در این فصل، اهمیت مطالعه مسیرهای پیام‌رسانی را هم از نظر ژنتیکی و هم از نظر بیوشیمیایی در مگس، موش، کرم، مخمر و موجودات دیگر و هم از نظر شیمیایی مشخص می‌کند.

اکثر مباحث این فصل درباره مسیرهای پیام‌رسانی واحد سازماندهی شده است. به عبارت دیگر ما مولکول‌های پیام‌رسان، گیرنده‌هایشان، مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی، فاکتورهای رونویسی تنظیمی و علاوه بر این تنظیم خود مسیر را برای هر یک از گروه‌های گیرنده‌ای نشان داده شده در شکل ۱ـ۱۶ بررسی می‌کنیم. در فصول ۲۱ و ۲۲ بررسی می‌کنیم که چگونه پیام‌های خارج سلولی، بیان ژن را در طی مراحل مهم تکوینی تغییر می‌دهند و به علاوه سلول‌ها چگونه پاسخ‌های مختلف را برای پیام‌های مختلف هماهنگ می‌کنند. در فصل ۲۵ شیوه‌ای که ناهنجاری‌های موجود در مسیرهای انتقال پیام مختلف که در این فصل شرح داده می‌شوند موجب ایجاد سرطان می‌شوند را توضیح می‌دهیم.

1- Cross-talk 2- Hedgehog



▲ **شکل ۲ـ۱۶. اجزاء و بخش‌های مسیرهای پیام‌رسانی اصلی.** مسیرهای پیام‌رسانی با اتصال مولکول پیام‌رسان (لیگاند) آغاز می‌شوند، که با فعال شدن گیرنده همراه است. سپس گیرنده‌های فعال شده، مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی متنوعی را آغاز می‌کنند که سبب ایجاد فاکتورهای رونویسی فعال موجود در سیتوزول و یا هسته می‌شود. فاکتورهای رونویسی که در سیتوزول فعال می‌شوند، به داخل هسته نقل مکان می‌کنند (شکل ۱ـ۱۶ را ملاحظه کنید). بسیاری از دسته گیرنده‌ها، شامل گیرنده سیتوکین‌ها، گیرنده تیروزین کینازی (RTK) و گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها می‌توانند پیام‌ها را از طریق یک یا تعداد بیشتری مسیر انتقال دهند. PKA= پروتئین کیناز A، PKB= پروتئین کیناز B، PKC= پروتئین کیناز C، PLC= فسفولیپاز C

۱ـ۱۶ گیرنده‌های TGFβ و فعال‌سازی مستقیم Smadها

ما بررسی سیستم‌های پیام‌رسانی که فعالیت ژن را کنترل می‌کنند با ساده‌ترین آنها شروع می‌کنیم. یکی از خانواده‌های مولکول‌های پیام‌رسان (ابر خانواده TFGβ) به گیرنده‌اش (گیرنده‌های TGFβ) متصل می‌شود و یک دسته از فاکتورهای رونویسی (Smad) را که در سیتوزول قرار دارند فعال می‌کند. سپس Smadهای فعال شده، برای تنظیم رونویسی به داخل هسته حرکت می‌کنند (شکل ۱ـ۱۶ قسمت a را ملاحظه کنید). بر خلاف بسیاری از سیستم‌های پیام‌رسانی موجود در این فصل، گیرنده TGFβ فقط یک نوع فاکتور رونویسی را فعال می‌کند و فاکتور رونویسی فقط توسط یک نوع گیرنده فعال می‌شود. ولیکن، برخلاف سادگی آن، مسیر TGFβ می‌تواند اثرات متنوع و وسیعی را در انواع مختلف سلول‌ها داشته باشد زیرا اعضاء مختلف ابر خانواده TGFβ، انواع اعضای خانواده گیرنده TGFβ را فعال کرده که آن هم اعضاء مختلفی از فاکتورهای رونویسی دسته Smad را فعال می‌کنند. علاوه بر این، پروتئین‌های Smad فعال شده با فاکتورهای رونویسی مختلفی در انواع مختلف سلول‌ها همکاری می‌کنند و از این رو مجموعه مختلفی از ژن‌ها در این سلول‌ها فعال می‌شوند.

ابرخانواده‌ی **فاکتور تغییر دهنده رشد β**[1] یا TGFβ شامل تعدادی از مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی خویشاوند هستند که نقش‌های وسیعی را در تنظیم رشد و تکامل هم مهره‌داران و هم بی‌مهرگان بازی می‌کنند. یک عضو از این ابرخانواده پروتئین BMP[2] در آغاز به وسیله توانایی آن در القاء تشکیل استخوان

1- Transforming growth factor β

2- Bone morphogenetic protein

در سلول‌های محیط کشت، شناسایی شد. اکنون این فاکتور BMP7 نامیده می‌شود و به طور کلینیکی به منظور تقویت شکستگی‌های شدید استفاده می‌شود. از پروتئین‌های متعدد BMPکه بعداً شناسایی شدند، بسیاری از آنها به القاء مراحل کلیدی تکوین نظیر تشکیل مزودرم و سلول‌های تشکیل دهنده اولیه خون کمک می‌کنند و اکثراً نقشی در استخوان ندارند.

عضو دیگر ابرخانواده TGFβ، با نام کنونی TGFβ-1، بر پایه توانایی آن در القاء فنوتیپ بدخیمی در سلول‌های کشت شده پستانداران شناسایی شد (فاکتور تغییر دهنده رشد). با این وجود، ۳ ایزوفرم انسانی TGFβ شناسایی شده است که شدیداً با القاء سنتز پروتئین‌های مهارکننده سیکل سلولی مهارکننده تکثیر اکثر سلول‌های پستانداران هستند. TGFβ توسط بسیاری از سلول‌های موجود در بدن تولید می‌شود و رشد را هم در سلول ترشحی (پیام‌رسانی اتوکرین) و هم در سلول‌های مجاور (پیام‌رسانی پاراکرین) مهار می‌کنند. فقدان گیرنده‌های TGFβ یا هر کدام از چند پروتئین درگیر در انتقال پیام داخل سلولی مسیر TGFβ باعث رهایی سلول‌ها از اثر مهار رشدی می‌شود. این تغییرات غالباً در تومورهای انسانی رخ می‌دهد. پروتئین‌های TGFβ، همچنین به بیان مولکول‌های چسبنده سلولی و مولکول ماتریکس خارج سلولی کمک می‌کنند که این امر نقش مهمی را در سازماندهی بافت ایفاء می‌کند (فصل ۱۹). هومولوگ TGFβ در درزوفیلا تحت نام پروتئین Dpp در طرح‌بندی پشتی - شکمی جنین مگس شرکت می‌کند. اعضاء دیگر ابرخانواده TGFβ در پستانداران به نام اکتیوین[۱] و اینهیبین[۲] مراحل اولیه تکوین مجرای تناسلی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ما این پروتئین TGFβ مهم از نظر تکاملی را در فصل ۲۲ مورد مطالعه و بررسی قرار می‌دهیم.

برخلاف پیچیدگی تغییرات سلولی القاء شده به وسیله اعضاء متنوع ابرخانواده TGFβ، مسیر پیام‌رسانی آن در اصول ساده است. (شکل ۲ـ۱۶ قسمت a را ملاحظه کنید). با فعال شدن گیرنده این لیگاندها، آن به طور مستقیم نوع ویژه‌ای از فاکتور رونویسی را فسفریله و فعال می‌کند. پاسخ سلول به این فاکتور رونویسی فعال شده بستگی به مجموعه فاکتورهای رونویسی سلول دارد. در این بخش به طور متوالی در سراسر مسیر TGFβ پیش خواهیم رفت ابتدایی خانواده مولکول‌های پیام و سپس گیرنده‌ی TGFB و کشف آنها را بررسی می‌کنیم. در نهایت اطلاعاتی را درباره‌ی نحوه فعال شدن فاکتورهای رونویسی Smadها توسط این گیرنده‌ها و حلقه‌ی پس نوردی که پیام رسانی این مسیر را تنظیم می‌کند، ارائه می‌دهیم. در نهایت نقشی که TGFβ در سرطان ایفاء می‌کند، بررسی نهایی ما از مسیر پیام‌رسانی TGFβ-Smad خواهد بود.

مولکول پیام‌رسان TGFβ با برش یک پیش ساز غیرفعال ایجاد می‌شود

اکثر انواع سلول‌های موجودات، اعضاء ابرخانوادهٔ TGFβ را به شکل غیرفعال تولید و ترشح می‌کنند که در نزدیکی ماتریکس خارج سلولی ذخیره می‌شوند. رها شدن شکل فعال آنها از ماتریکس با هضم پروتئازی یا غیرفعال شدن مهارکننده منجر به حرکت سریع پیام‌هایی که تا پیش از این در آن مکان وجود داشته‌اند، می‌شود (نقش مهم بسیاری از مسیرهای پیام رسانی).

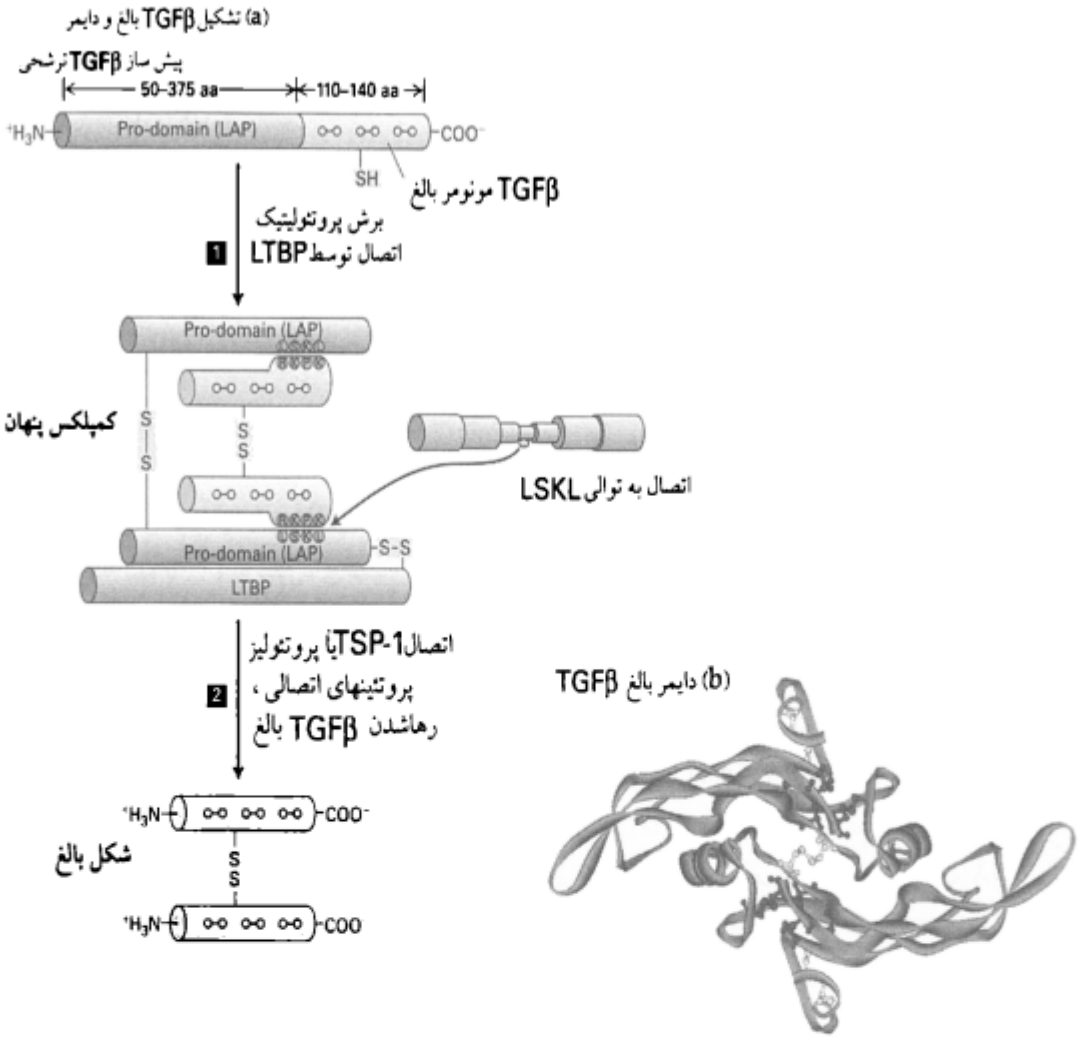
TGFβ انسانی از سه ایزوفرم تشکیل شده است (TGFβ-3 ، TGFB-β2 و TGFβ-1)، که هر یک توسط ژنی منحصر به فرد رمز می‌شود و هم به صورت مختص به بافت و هم به صورت تنظیم شده از نظر تکوینی بیان می‌شود. ایزوفرم TGFβ به صورت قسمتی از یک پیش ساز بزرگ دیمری سنتز می‌شود که با پیوندی دی سولفیدی به هم متصل بوده و دارای پرودمین هستند (اغلب LAP نامیده می‌شود). بعد از اینکه پیش ساز ترشح شد LAP بریده شده و با اتصال غیرکوالان به TGFβ ی بالغ به واسطه‌ی میانکنش اختصاصی یک توالی چهار اسیدآمینه‌ای در هر پلی پپتید متصل باقی می‌ماند. اکثر TGFβ ترشح شده در ماتریکس خارج سلولی به صورت غیر فعال ذخیره می‌شود کمپلکس غیرفعال حاوی TGFβ پیش ساز برش خورده و علاوه بر این پروتئین اتصال یافته با پیوند دی‌سولفیدی به نام LTBP[۳] است. اتصال LAP به وسیله پروتئین ماتریکسی ترومبوسپوندین[۴] باعث رهایی TGFβ فعال و بالغ می‌شود. هضم پروتئین‌های اتصالی توسط پروتئازهای سرمی و متالوپروتئازهای مجود در ماتریکس می‌تواند باعث فعال شدن TGFβ شود (شکل ۳ـ۱۶ قسمت a).

شکل مونومری فاکتور رشد TGFβ دارای سه اتصال دی سولفیدی حفاظت شده داخل مولکولی است. سیستئین دیگری در

1- Activin 2- Inhibin

3- Latent Taf B - binding protein

4- Thrombospondin



▲شکل ۱۶-۳ (شکل رنگی) تشکیل و ساختار مولکول‌های پیام‌رسان مربوط به ابرخانوادهٔ TGFβ. (a) مرحله ❶ تشکیل پیش ساز دیمر TGFβ داخل سلول تشکیل می‌شود (گرچه فقط شکل مونومری آن در بالای شکل نشان داده شده است). بلافاصله بعد از ترشح، مولکول پیش ساز بریده می‌شود، ولیکن پروذُمین که LAP نامیده می‌شود و TGFβی بالغ به صورت غیرکوالان با میانکنش‌های ویژه به ترتیب بین توالی‌های اسدآمینه‌ای LSKL (مربوط به LAP) و RKPK (TGFβ بالغ) در کمپلکس که همچنین حاوی (پروتئین اتصالی TGFβ و (LTB)، نارنجی است، متصل باقی می‌مانند. TGFβ مونومری (آبی و سبز) بالغ دارای شش باقیمانده سیستئین حفاظت شده است که اینها سه پیوند دی سولفیدی داخل زنجیره‌ای تشکیل می‌دهند. یک پیوند دی سولفیدی دو مونومر را به هم متصل می‌کند (در شکل دوم نشان داده شده است). کمپلکس کامل حاصل از برش در ماتریکس داخل سلولی ذخیره می‌شوند. مرحله ❷ TGFβ هومو و هترودیمر بالغ می‌توانند از این کمپلکس با اتصال پروتئین ماتریکس خارج سلولی ترومبوسپوندین ـ۱ (TSP-۱) به توالی LSKL در پروتئین LAP رها شوند و یا اینکه، پروتئازهای سرم قادر به هضم پروتئین‌های اتصالی (پروتئین‌های رهاکننده TGFβ فعال) هستند. (b) در این شکل شماتیک نواری از دیمر بالغ TGFβ، دو زیرواحد مشخص شده‌اند. (ریشه‌های سیستئینی متصل شده با پیوند دی سولفید به صورت توپ و میله نشان داده شده است). سه پیوند دی سولفیدی داخل زنجیره‌ای در هر مونومر دومین برآمده سیستئین را تشکیل می‌دهند که به تجزیه مقاوم هستند.

مرکز هر مونومر، TGFβ مونومری را به هومودیمرها و هترودیمرهای عملکردی متصل می‌کند (شکل ۱۶-۳ قسمت b).بیشتر تنوعات توالی بین پروتئین‌های TGFβی مختلف، در نواحی N-ترمینال آن‌ها مشاهده می‌شود (لوپ‌های متصل‌کننده رشته‌های β و همچنین مارپیچ آلفا). ترکیب هترودیمرهای مختلف ممکن است که تنوع عملکردی این پروتئین‌ها را فراتر از آنچه که به وسیله تفاوت‌های توالی اولیه مونومرها ایجاد می‌شود، افزایش دهند.

برای شناسایی گیرنده TGFβ از برچسب رادیواکتیو استفاده شد

در ابتدا محققان مولکول پیام‌رسان TGFβ را در نقش فاکتور مهارکننده‌ی رشد شناسایی کردند، ولیکن برای درک مسیر عملکرد این فاکتور، بایستی محققان گیرنده‌هایی را برای اتصال آنها پیدا می‌کردند. منطق شیوه‌ای که آنها را به سمت مطالعاتشان سوق داد، نمونه‌ای از روش‌های بیوشیمیایی معمولی برای شناسایی گیرنده‌ها است. در آغاز محققان فاکتور رشد خالص شده را تحت تاثیر رادیوایزوتوپ I^{125} قرار دادند که در این شرایط ید به طور کوالان با باقیمانده‌های تیروزین بی‌حفاظ اتصال برقرار می‌کند (نشان‌دار کردن مؤثر آنها با برچسب رادیواکتیو). پروتئین TGFβ نشان‌دار شده با I^{125} به سلول‌های محیط کشت انکوبه شدند و سپس مخلوط انکوباسیون با یک عامل شیمیایی تیمار شد که این عامل به طور کوالان با TGFβ نشاندار متصل به گیرنده‌اش بر روی سطح سلول، اتصال برقرار می‌کند. خالص‌سازی کمپلکس گیرنده - TGFβی نشاندار با I125، سه پلی‌پپتیدی متفاوت با وزن‌های مولکولی ۵۵، ۸۵ و ۲۸۵ کیلو دالتون آشکار کرد که به صورت انواع گیرنده‌های TGFβ نسبت داده شدند (RI، RII، RIII به ترتیب وزن مولکولی)

شکل ۴-۱۶ (مراحل ❶ و ❷)، ارتباط عملکرد سه پروتئین گیرنده‌ی TGFβ را نشان می‌دهد. فراوان‌ترین آنها (RIII)، یک پروتئوگلیکان سطح سلولی است و بتا - گلیکان نامیده می‌شود. RIII یک پروتئین گذرنده از غشاء مونومری است که مولکول‌های TGFβ را در نزدیکی سطح سلول متمرکز و متصل می‌کند (اتصالشان را به گیرنده‌های RII تسهیل می‌کند). گیرنده‌های نوع I و II پروتئین‌های گذرنده از غشاء دیمر با فعالیت سرین/ ترئونین کینازی به صورت بخشی از دُمین سیتوزولی آنها هستند. RII فعالیت کینازی دائمی را از خود نشان می‌دهد، به عبارت دیگر، حتی هنگام عدم اتصال با TGFβ فعال است. اتصال TGFβ، تشکیل کمپلکس‌های دارای دو نسخه از هر یک از RI و RII را القاء می‌کند. سپس زیرواحد RII، باقیمانده‌های سرین و ترئونین در یک توالی اسیدآمینه‌ای به شدت محافظت شده از زیرواحد RI مجاور با بخش سیتوزولی غشاء پلاسمایی را فسفریله کرده و بدین وسیله فعالیت کینازی RI را فعال می‌کند.

گیرنده TGFβ فعال، فاکتور رونویسی Smad را فسفریله می‌کند

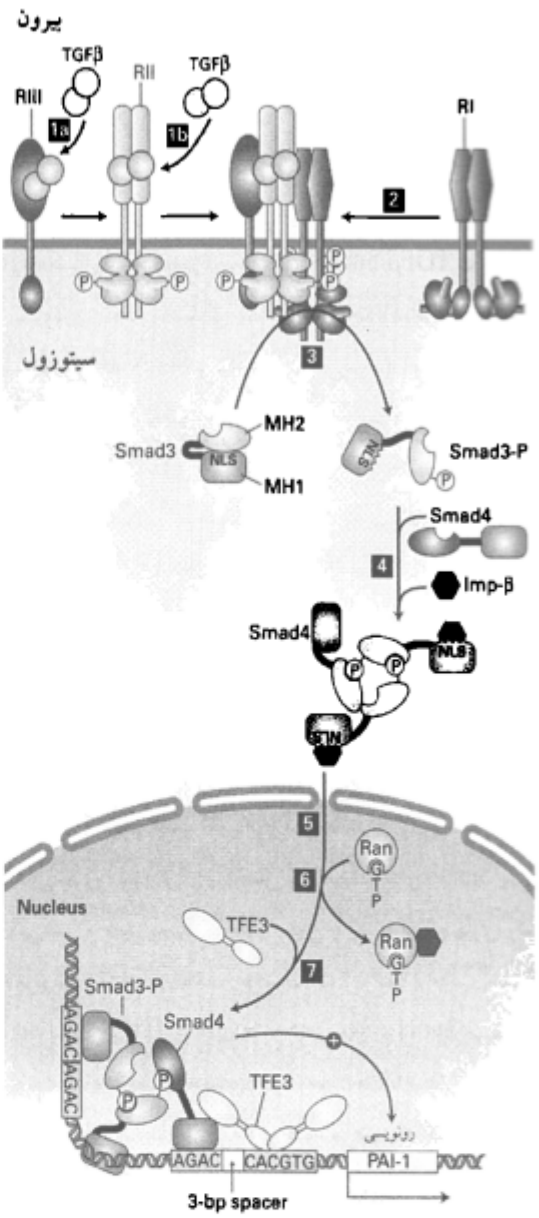
محققان فاکتور رونویسی پایین دست گیرنده TGFβ را در دروزوفیلا در مطالعات ژنتیکی با کاربرد مگس میوه جهت یافته شناسایی کردند. فاکتور رونویسی مذکور در دروزوفیلا و پروتئین‌های منسوب آن در مهره‌داران، اکنون، Smads نامیده می‌شوند. سه نوع از پروتئین‌های Smad در مسیر پیام‌رسانی TGFβ فعالیت دارند:

همانطور که در شکل ۴-۱۶ نشان داده شده است، R-Smad (Smad2 یا Smad3) دارای دو (انتهای آمینی) دُمین MH_1 و MH_2 است که توسط یک ناحیه رابط انعطاف‌پذیر از هم جدا شده‌اند. ناحیه N-ترمینال دومین MH_1 دارای قطعه ویژه اتصال به DNA و همچنین توالی تحت عنوان NLS است. توالی NLS[1]، در همه فاکتورهای رونویسی موجود در سیتوزول وجود دارد و برای انتقال آنها به داخل هسته مورد نیاز می‌باشد (فصل ۱۳). وقتی که R-Smad در شکل غیرفعالش است (وضعیت غیرفسفریله) ولیکن NLS آن پوشیده می‌شود و دُمینهای MH_1 و MH_2 به طریقی به هم متصل می‌شوند که به DNA و یا به Co-Smad نمی‌توانند متصل شوند. فسفریلاسیون سه ریشه سرین نزدیک ناحیه C- ترمینال R-Smad به وسیله گیرنده TGFβ نوع I فعال (RI فعال)، دومین‌ها را جدا می‌کند و این امر باعث اتصال ایمپورتین β به NLS می‌شود (شکل ۱۳-۳۵ را ملاحظه کنید) و امکان ورود Smad را به هسته فراهم می‌کند.

به طور همزمان کمپلکس حاوی دو مولکول Smad3 (یا Smad2) و یک مولکول Co-Smad (Smad4) در سیتوزول تشکیل می‌شوند. این کمپلکس با اتصال دو سرین فسفریله شده در هر Smad3 به جایگاه‌های اتصال فسفوسرین دُمین‌های MH_2 هم در Smad3 و هم در Smad4 تثبیت می‌شود. پس از آن، اتصال ایمپورتین β جابه جایی کمپلکس‌های هترودیمر R-Smad/co-Smad را به داخل هسته وساطت می‌کند. بعد از اینکه ایمپورتین β در داخل هسته جدا شد، کمپلکس‌های Smad2/Smad4 یا Smad3/Smad4 به فاکتور رونویسی دیگری به منظور فعال کردن رونویسی ژن‌های ویژه هدف متصل می‌شوند.

داخل هسته، R-Smadها، دائماً دِفسفریله می‌شوند که این موجب تفکیک کمپلکس Smad/Co-Smad و علاوه بر این

1- Nuclear Localization signal

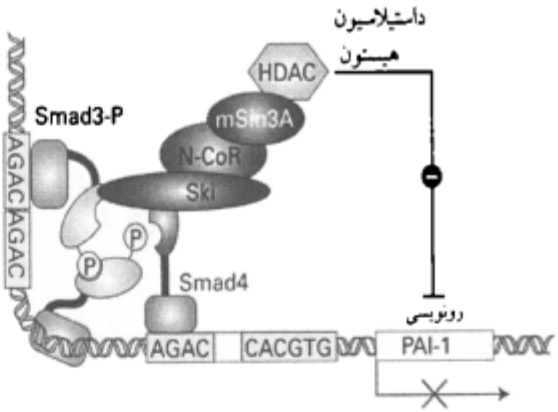


◀ **شکل ۴-۱۶ مسیر پیام‌رسانی TGFB/Smad.** مرحله 1a درتعدادی از سلول‌ها، TGFβ به گیرنده TGFβی نوع III (RIII) متصل می‌شود، که این امر غلظت TGFβ را در نزدیکی سطح غشاء افزایش می‌دهد و علاوه بر این TGFβ را به گیرنده نوع II(RII) ارائه می‌دهد. مرحله 1b در سلول‌های دیگر، TGFβ به طور مستقیم به RII متصل می‌شود (به طور دائم فسفریله شده و کیناز را فعال می‌کند). مرحله ❷: RII متصل به لیگاند، قطعه مجاور غشایی گیرنده نوع I(RI) را جذب و فسفریله می‌کند که این به طور مستقیم به TGFβ متصل نمی‌شود. این عمل مهار فعالیت کینازی RI را از بین می‌برد که در غیر این صورت توسط قطعه‌ای از RI بین غشاء و دُمین کینازی آن تحمیل شده بود. مرحله ❸: سپس RI فعال، Smad3 و یا R-Smad دیگر را فسفریله می‌کند، که سبب تغییر ساختمان فضایی NLS بدون پوشش آن می‌شود. مرحله ❹: دو مولکول Smads3 فسفریله شده با یک Co-Smad (Smad) که فسفریله نشده است میانکنش می‌کند و ایمپورتین (Imp-β) β کمپلکس بزرگ سیتوزولی را تشکیل می‌دهد. مراحل ❺ و ❻: بعد از نقل مکان کامل کمپلس به هسته، Ran-GTP سبب تفکیک Imp-β می‌شود (در فصل ۱۳ بحث شده است). مرحله ❼: سپس فاکتور رونویسی هسته‌ای (مانند TFE3) به کمپلکس Smad3/Smad4 اتصال می‌یابد، و کمپلکس فعال‌سازی را تشکیل می‌دهد که به صورت تعاونی به توالی‌های تنظیمی (با شکل مناسب و صحیح) ژن هدف متصل می‌شوند. در پایین شکل کمپلکس فعال سازی برای ژن رمز کننده مهارگر فعال ساز پلاسمیتوژن (PAL-1) نشان داده شده است.

خروج این Smadها از هسته می‌شود. به دلیل این نقل و انتقالات دائمی هسته و سیتوزول مربوط به Smadها، غلظت Smadهای فعال در داخل هسته به طور دقیق میزان گیرنده TGFβی فعال را بر روی سطح سلول منعکس می‌کند.

تقریباً تمامی سلول‌های پستانداران حداقل یک ایزوفرم TGFβ را ترشح می‌کنند و اکثراً گیرنده‌های TGFβ را به سطح شان دارند. با این وجود، به دلیل این که انواع مختلف سلول‌ها دارای مجموعه‌های متفاوتی از فاکتورهای رونویسی هستند که Smadهای فعال می‌توانند به آنها متصل شوند، پاسخ‌های القاء شده سلولی به وسیله TGFβ در میان انواع سلول‌ها اختلاف دارد. برای مثال، در سلول‌های اپیتلیال و فیبروبلاست، TGFβ علاوه بر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (نظیر کلاژن) سبب بیان پروتئین‌های مهارکننده‌ی پروتئازهای سرم نیز می‌شود، که درغیراینصورت این پروتئاز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را تجزیه خواهند کرد. این مهار، ماتریکس را تثبیت کرده و اجازه تشکیل بافت پایدار را به سلول‌ها می‌دهد. پروتئین‌های مهاری یاد شده شامل (مهارگر فعال کننده پلاسمینوژن) PAI-1[1] هستند. رونویسی PAI-1 نیازمند تشکیل کمپلکس فاکتور رونویسی TFE3 با کمپلکس Smad3/Smad4 و علاوه بر این اتصال تمامی این پروتئین‌ها به توالی‌های ویژه‌ای در ناحیه تنظیمی ژن PAI-1 است. (شکل ۴-۱۶ ملاحظه کنید) به وسیله مشارکت با فاکتورهای رونویسی دیگر، کمپلکس‌های Smad2/Smad4 و Samd3/Smad4 به بیان پروتئین‌هایی

1- Plasminogen activator inhibitor-1



▲ **شکل ۵-۱۶ مدل تنظیم کاهشی با وساطت Ski مربوط به عملکرد فعال‌کننده رونویسی Smad.** Ski عملکرد Smad را با اتصال مستقیم به Smad سرکوب می‌کند. به دلیل اینکه دُمین اتصالی Ski بر روی Smad به طور قابل ملاحظه‌ای با دُمین لازم برای اتصال دُم فسفریله شده Smad3 هم پوشانی دارد، اتصال Ski، میانکنش طبیعی بین Smad3 و Smad4 را از بین می‌برد. علاوه بر این، Ski پروتئین N-CoR را فرا می‌خواند. پروتئین N-CoR به طور مستقیم با mSin3A اتصال بر قرار کرده و mSin3A نیز به نوبه خود با هیستون داستیلاز (HDAC) میانکنش می‌دهد. (هیستون داستیلاز، باعث داستیلاسیون هیستون می‌شود) (فصل ۷). از این رو، فعال‌سازی رونویسی، که توسط TGFβ القا شده با کمپلکس‌های Smad5 واسطه گری می‌شود، خاموش گردد.

مانند p15 کمک می‌کنند که چرخه سلولی را در مرحله G_1 مهار کرده و از این رو تکثیر سلول را بلوکه می‌کند (فصل ۲۰).

همانگونه که شرح داده شد، اتصال هر یک از ایزو فرم‌های TGFβ به گیرنده مختص آن منجر به فسفریلاسیون Smad2 و یا Smad3 می‌شود و این عمل با تشکیل کمپلکس Smad2/Smad1 (یا Smad4/Smad3) و سرانجام با فعال سازی رونویسی از ژن‌های خاص دنبال می‌شود (مانند ژن PAI-1)، از طرفی دیگر پروتئین‌های BMP که به ابرخانواده TGFβ تعلق دارند به مجموعه متفاوتی از گیرنده‌ها متصل و آنها را فعال می‌کنند. این گیرنده‌ها مشابه پروتئین‌های گیرنده RI و RII هستند، ولیکن Smad1 را فسفریله می‌کنند (به جای Smad3 یا Smad4). بعد از آن، Smad1 با Smad4 دیمر تشکیل می‌دهد. کمپلکس Smad1/Smad4 در مقایسه با کمپلکس Smad2/Smad4 و یا Smad3/Smad4 پاسخ‌های رونویسی مختلفی را فعال می‌کند.

حلقه‌های فیدبک منفی، مسیر پیام‌رسانی TGFβ/Smad را تنظیم می‌کند

اکثر مسیرهای پیام‌رسانی بدین صورت تنظیم می‌شوند که پاسخ به فاکتور رشد یا مولکول پیام دیگر با گذشت زمان کاهش می‌یابد (یا گاهی افزایش می‌یابد) و این امر کنترل دقیق پاسخ‌های سلولی را امکان‌پذیر می‌سازد. مسیرهای TGFβ/Smad با چندین پروتئین داخل سلولی تنظیم می‌شوند (شامل دو پروتئین سیتوزولی که SnoN و Ski نامیده می‌شوند). این پروتئین‌ها در ابتدا به عنوان انکوپروتئین‌های[1] مسبب سرطان شناسایی شدند، زیرا بیان بالای آنها در سلول‌های فیبروبلاست اولیه کشت شده موجب تکثیر غیرطبیعی این سلول‌ها می‌شود. شیوه‌ای که آنها این فعالیت را انجام دادند تا سال‌ها بعد ازاینکه مشخص شد پس از تحریک TGFβ، SnoN و Ski به Smad4 و Smad3 فسفریله شده متصل می‌شود درک نشده بود. SnoN و Ski تشکیل کمپلکس‌های Smad3/Smad4 را مهار نمی‌کنند و یا اینکه توانایی کمپلکس‌های Smad را برای اتصال به نواحی کنترلی DNA تحت تأثیر قرار نمی‌دهند. به بیانی دقیق‌تر، آنها فعال‌سازی رونویسی را با اتصال به کمپلکس‌های Smad بلوکه می‌کنند و بدین وسیله مقاومت سلول را به اثرات مهاری رشد مربوط به TGFβ موجب می‌شوند (شکل ۵-۱۶). جالب است که تحریک با TGFβ موجب تجزیه فوری Ski و SnoN می‌شود اما بعد از چند ساعت، بیان هر دو Ski و SnoN با مکانیسم ناشناخته‌ای شدیداً القا می‌شود. تصور می‌شود که افزایش میزان این پروتئین‌ها برای کاستن از اثرات پیام‌رسانی طولانی مدت به علت در معرض دائم بودن با TGFβ باشد.

از جمله پروتئین‌های القاء شده بعد از تحریک TGFβ، Smad مهاری (I-Smad) می‌باشد (به ویژه Smad7 Smad7. توانایی RI فعال را برای فسفریله کردن پروتئین‌های R-Smad بلوکه می‌کند و علاوه بر این ممکن است که گیرنده‌های TGFβ را برای تجزیه کردن مورد هدف قرار دهد. در این مسیر Smad7 (مانند SnoN و Ski) در حلقه‌های فیدبک منفی شرکت می‌کند (القای Smad7 پیام‌رسانی داخل سلولی را به وسیله در معرض قرار دادن طولانی مدت با هورمون تحریکی مهار می‌کند). در بخش‌های بعدی ما شیوه‌ای را که پیام‌رسانی توسط سایر گیرنده‌های سطح سلول با حلقه‌های فیدبک منفی ممانعت

1- Oncoproteins

می‌شود را مشاهده خواهیم کرد.

فقدان پیام‌رسانی TGFβ نقشی کلیدی را در سرطان بازی می‌کند

بسیاری از تومورهای انسانی دارای جهش‌های غیرفعال‌کننده گیرنده‌های TGFβ یا پروتئین‌های Smad می‌باشد و بنابراین به مهار رشد توسط TGFβ مقاوم هستند (شکل ۲۴-۲۵ را ملاحظه کنید). برای مثال اکثر سرطان‌های مربوط به پانکراس انسان دارای حذف در ژن رمز کننده Smad4 هستند و لذا نمی‌توانند p15 و مهارکننده‌های دیگر چرخه سلولی را در پاسخ به TGFβتولید کنند. در واقع، Smad4، DPC[1](حذف شده در سرطان پانکراس) نامیده می‌شود. رتینوبلاستوما و سرطان کولون و معده، هپاتوما و تعدادی از بدخیمی‌های سلول‌های T و B، همچنین فاقد حساسیت مهار رشد توسط TGFβ هستند. عدم حساسیت مذکور با فقدان گیرنده‌های TGFβ نوع I و II (RII و RI)) ارتباط دارد. حساسیت به TGFβ می‌تواند با بیان نوترکیب پروتئین مفقود بازگردانده شود. عموماً جهش هایی در Smad2 در تعدادی از انواع تومورهای انسانی رخ می‌دهد. نه تنها پیام‌رسانی TGFβ برای کنترل تکثیر سلولی ضروری است بلکه موجب می‌شود تعدادی از سلول‌ها در خلال مسیرهای اختصاصی متمایز شوند. (فصل ۲۲)

نکات کلیدی بخش ۱-۱۶

گیرنده‌های TGFβ و هدایت فعالیت Smadها

- TGFβ بصورت یک پیش‌ساز غیرفعال تولید می‌شود که در ماتریکس خارج سلولی ذخیره می‌شود. چندین مکانیسم می‌توانند فاکتور رشد دیمری فعال و بالغ را آزاد کنند (شکل ۳-۱۶ را ملاحظه کنید).
- تحریک توسط TGFβ منجر به فعال‌سازی فعالیت سرین / ترئونین کیناز درونی در دُمین سیتوزولی گیرنده نوع I (RI) می‌شود که سپس یک R-Smad را فسفریله می‌کند که در معرض به یک پیام قرار گرفته در هسته قرار می‌گیرد.
- بعد از اینکه R-Smad فسفریله به یک Co-Smad متصل می‌شود، کمپلکس حاصل به هسته جابجا می‌شود و در آنجا با چندین فاکتور رونویسی به منظور القاء بیان ژن‌های هدف میانکنش می‌دهد.
- آنکوپروتئین‌ها (مانند Ski و SnoN) و I-Smadها (مانند Smad) بصورت تنظیم‌کننده‌های منفی پیام رسانی TGFβ عمل می‌کنند.
- پیام‌رسانی TGFβ عموماً تکثیر سلولی را مهار می‌کند. فقدان چندین جزء این پیام‌رسانی در تکثیر سلولی غیرطبیعی و بدخیمی نقش دارند.

۱۶-۲ گیرنده‌های سیتوکین‌ها و مسیر JAK/STAT

اکنون به نوع دیگر مسیر پیام‌رسانی برمی‌گردیم که با فعال سازی فاکتورهای رونویسی منجر به اثرات ژنتیکی طولانی‌مدت می‌شود. مولکول‌های پیام‌رسان در این مسیر (سیتوکین‌ها) نقش بسیار مهمی را در رشد و تمایز سلول‌ها ایفاء می‌کنند (به ویژه در سلول‌های خونی و سیستم ایمنی). همانند مسیر TGFβ که پیش از این شرح داده شد، مسیر سیتوکین‌ها نیز فقط چند مرحله را درگیر می‌کند. دمین سیتوزولی تمامی گیرنده‌های سیتوکین‌ها[2] به طور محکم به عضوی از خانواده پروتئین تیروزین کیناز سیتوزولیک متصل می‌شود (JAK کینازها). JAK کینازهای فعال، به نوبه خود، به طور مستقیم فاکتورهای رونویسی را که عضو خانواده STAT هستند فسفریله و فعال می‌کند. گیرنده‌های سیتوکینی فعال، مسیرهای دیگری را فعال می‌کنند که توسط دسته‌های دیگر گیرنده‌ها نیز فعال می‌شود (شکل ۲-۱۶ قسمت b را ملاحظه کنید). با این وجود، مسیر JAK/STAT که در این بخش شرح داده شده است، عمدتاً توسط فعال‌سازی گیرنده‌های سیتوکینی آغاز می‌شود (به رغم آنکه می‌توانند توسط گیرنده‌های دیگر فعال شوند). ما بحث مان را با مولکول‌های پیام‌رسان خانواده سیتوکین و گیرنده‌های سیتوکین‌ها آغاز می‌کنیم. سپس از روش آزمایشگاهی برای بررسی شیوه‌ای که مسیر JAK/STAT کشف شد استفاده می‌کنیم آنگاه جزئیات شیوه‌ای را که پروتئین JAK، فاکتور رونویسی STAT را فعال می‌کند مطالعه می‌کنیم که با بحث چگونگی تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی ستیوکین دنبال می‌شود. این بخش با بررسی کاربرد بیولوژیکی تنظیم سلول‌های قرمز خون در بدن انسان خاتمه می‌یابد.

سیتوکین‌ها، ایجاد بسیاری از انواع سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند

سیتوکین‌ها خانواده‌ای از مولکول‌های ترشحی و نسبتاً کوچک (عموماً شامل حدود ۱۶۰ اسیدآمینه) را تشکیل می‌دهند که بسیاری از ابعاد رشد و تمایز انواع ویژه‌ای از سلول‌ها را کنترل

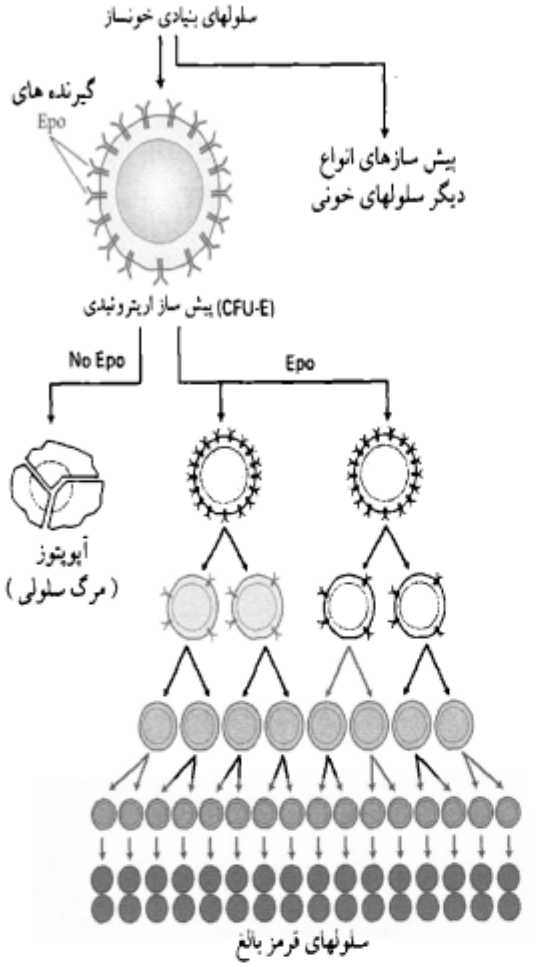
1- Depleted in pancreatic cancer (DPC)

2- Cytokine receptos

می‌کنند. برای مثال، در خلال بارداری، سیتوکین پرولاکتین، رده سلول‌های اپی‌تلیال نابالغ غده پستانی را به سمت تمایز به سلول‌های آسینی القاء می‌کند که این سلول‌ها پروتئین‌های شیر را تولید و به داخل کانال‌ها ترشح می‌کنند. سیتوکین‌هایی (مثل اینترلوکین‌ها[1]) برای تکثیر و فعال کردن سلول‌های T و همچنین سلول‌های B تولیدکننده آنتی بادی سیستم ایمنی ضروری هستند. خانواده دیگر سیتوکین‌ها (اینترفرون‌ها[2]) توسط سلول‌های معینی پس از عفونت ویروسی تولید و ترشح می‌شوند. اینترفرون‌های ترشح شده بر روی سلول‌های مجاور برای تولید آنزیم‌هایی که سبب مقاومت بیشتر این سلول‌ها به عفونت ویروسی می‌شوند عمل می‌کنند. نقش اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها در پاسخ‌های ایمنی در فصل ۲۴ آورده شده است.

بسیاری از سیتوکین‌ها، تشکیل انواع مهمی از سلول‌های خونی را القاء می‌کنند. برای مثال، فاکتور تحریک‌کننده کلونی گرانولوسیت‌ها (G-CSF)، نوع ویژه‌ای از سلول‌های پیش ساز را در مغز استخوان برای چندین تقسیم القاء می‌کند و سپس به سلول‌های گرانولوسیت تمایز می‌یابند (نوعی از سلول‌های سفید خونی که باکتری‌ها و پاتوژن‌های دیگر را غیرفعال می‌کنند) به دلیل اینکه بسیاری از درمان‌های مربوط به سرطان، تشکیل گرانولوسیت‌ها را توسط بدن کاهش می‌دهند، اغلب G-CSF برای بیماران به منظور تحریک تکثیر و تمایز سلول‌های پیش ساز گرانولوسیت‌ها تجویز می‌شوند، لذا میزان طبیعی گرانولوسیت‌ها را در خون باز می‌گرداند. ترومبوپوئیتین (هم خانوادهٔ G-CSF) بر روی پیش سازهای مگاکاریوسیت‌ها عمل می‌کنند تا این که آنها تقسیم شده و به مگاکاریوسیت‌ها تمایز یابند). سپس این سلول‌ها، به دو قطعه سلولی تحت عنوان پلاکت‌ها تقسیم می‌شوند که برای انعقاد خون حیاتی می‌باشند.

سیتوکین دیگر، اریتروپوئیتین[3] (Epo)، موجب تولید اریتروسیت‌ها (سلول‌های قرمز خون) با القاء تکثیر و تمایز سلول‌های پیش ساز اریتروئید در مغز استخوان می‌شود (شکل ۱۶-۶). اریتروپوئیتین توسط سلول‌های کلیه سنتز می‌شود که غلظت اکسیژن را در خون کنترل می‌کنند. کاهش در اکسیژن خون بر کاهش اریتروسیت نسبت به میزان طبیعی دلالت دارد. وظیفه اصلی اریتروسیت انتقال اکسیژن کمپلکس با هموگلوبین است. به وسیله فاکتور رونویسی حساس به اکسیژن با نام HIF-1α سلول‌های کلیه با سنتز بیشتر اریتروپوئیتین و ترشح آن به خون به



▲ **شکل ۱۶-۶ اریتروپوئیتین و تشکیل سلول‌های قرمز خون (اریتروسیت).** سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی که واحدهای اریتروئیدی تشکیل دهنده کلونی[4] (CFU-E) نامیده می‌شوند، از سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک مشتق می‌شوند، که این سلول‌ها پیش ساز انواع دیگر سلول‌های خونی نیز هستند. در عدم وجود اریتروپوئیتین (Epo) سلول‌های CFU-E دچار آپوپتوز می‌شوند. اتصال Epo به گیرنده‌اش بر روی سلول‌های CFU-E موجب رونویسی از چندین ژن می‌شود که پروتئین‌های رمز کننده آنها مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) را مهار می‌کند و به سلول اجازه بقاء می‌دهد. پروتئین‌های دیگری که با Epo القاء می‌شوند، موجب برنامه‌ریزی تکوینی برای سه تا پنج تقسیم نهایی سلول می‌شوند. این سلول‌ها همانطور که تمایز می‌یابند گیرنده Epo پروتئین‌های دیگر غشایی خود را از دست می‌دهند. در صورتی که سلول‌های CFU-E با Epo در محیط کشت نیمه جامد (مثلاً حاوی متیل سلولز) کشت داده شوند که سلول‌های دختری تحرک زیادی ندارند، لذا هر یک از سلول‌های CFU-E کلونی متشکل از ۱۰۰-۳۰ سلول اریتروئیدی تولید می‌کنند (علت نامگذاری آنها).

1- Interleukins 2- Interfrons

3- Erythropoietin (Epo)

4- Colony - forming units erythroid (CFU-E)

▲ **شکل ۱۶ـ۷ ساختار اریتروپوئیتین متصل شده به گیرنده اریتروپوئیتین.** اریتروپوئیتین دارای چهار مارپیچ آلفای محافظت شده طویل است که در یک ترکیب ویژه تا شده‌اند. گیرنده اریتروپوئیتین فعال (EpoR) دیمری از دو زیرواحد همسان است. دُمین خارج سلولی هر مونومر از ۲ زیردُمین تشکیل شده است. هر زیردُمین دارای ۷ رشته β محافظت شده است که با شیوه خاص تا می‌شوند. زنجیره جانبی ریشه‌های اسیدآمینه بر روی دو مارپیچ در Epo حلقه‌ها را در روی یک مونومر گیرنده متصل می‌شود. بدین وسیله گیرنده دیمر با ساختمان فضایی ویژه ایجاد می‌شود. ساختار سیتوکین‌های دیگر و گیرنده آنها مشابه به Epo و EpoR است.

کمبود اکسیژن پاسخ می‌دهند. زمانی که میزان اریتروپوئیتین بالا می‌رود، پیش ساز اریتروئید هر چه بیشتر از مرگ نجات پیدا می‌کند (به هر یک اجازه تولید تقریباً ۵۰ یا تعداد بیشتری اریتروسیت در مدت زمان فقط چند روز داده می‌شود). در این مسیر، بدن می‌تواند به فقدان خون با افزایش تولید اریتروسیت پاسخ دهد.

گیرنده‌های سیتوکینی ساختارهای مشابهی دارند و مسیرهای پیام‌رسانی مشابهی را فعال می‌سازند

به طور شگفت‌انگیزی تمامی سیتوکین‌ها ساختار سوم مشابه دارند که تشکیل شده است از چهار مارپیچ آلفای محافظت شده طویل که در یک جهت‌گیری خاص با یکدیگر تامی‌خورند. شباهت ساختاری در میان سیتوکین‌ها، گواهی است بر اینکه تمامی آنها از یک پروتئین اجدادی مشترک تکامل یافته‌اند. علاوه بر این، گیرنده‌های سیتوکین‌های مختلف بدون شک از یک بُعد مشترک تشکیل شده است و هر یک از آنها حاوی ۷ رشته β محافظت شده هستند که با شیوه‌ای ویژه با هم تا شده‌اند.

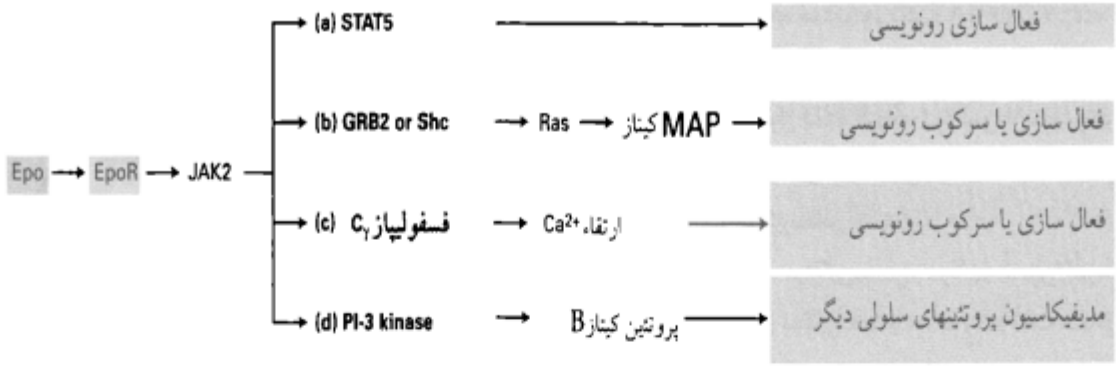
میانکنش یک مولکول با دو گیرنده پروتئینی اریتروپروتئین همسان (EpoR) در شکل ۱۶ـ۷ نشان داده شده است که مثالی از اتصال سیتوکین به گیرنده‌اش است.

آیا پاسخ سلول به سیتوکین خاص، صرفاً به میزان گیرنده همتای (خویشاوند) آن بستگی دارد یا نه: به رغم آنکه تمامی گیرنده‌های سیتوکینی با مسیرهای انتقال پیام مشابهی فعال می‌شوند، پاسخ هر سلول خاص به پیام سیتوکینی به مجموعه فاکتورهای رونویسی سلول، ساختار کروماتین و پروتئین‌های دیگر مرتبط با سابقه تکاملی سلول مذکور بستگی دارد. برای مثال در صورتی که گیرنده‌های مربوط به پرولاکتین یا ترومبوپوئیتین به طور آزمایشگاهی در سلول پیش ساز اریتروئیدی بیان بشوند، آن سلول‌ها به این سیتوکین‌ها با تقسیم و تمایز به اریتروسیت (نه با تمایز به سلول‌های پستان و یا مگاکاریوسیت) پاسخ خواهند داد.

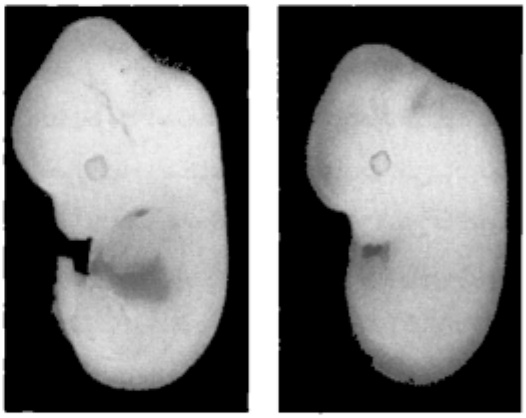
شکل ۱۶ـ۸ مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی فعال شده در هنگام اتصال EpoR به اریتروپوئیتین را به صورت خلاصه نشان می‌دهد. تحریک گیرنده‌های دیگر سیتوکین‌ها به وسیله لیگاند اختصاصی آنها با مسیرهای مشابهی انجام می‌شود. تمامی مسیرهای یاد شده سرانجام منجر به فعال شدن فاکتورهای رونویسی می‌شوند و سبب افزایش یا کاهش در بیان ژن‌های هدف ویژه می‌شوند. در اینجا ما بر روی مسیر JAK/STAT متمرکز می‌شویم و مسیرهای دیگر در بخش‌های بعدی بحث می‌شوند.

JAK کینازها، فاکتورهای رونویسی STAT را فعال می‌کنند

برای درک شیوه عملکرد پروتئین‌های STAT و JAK مسیر پایین دست گیرنده اریتروپوئیتین را مورد بررسی قرار می‌دهیم (یکی از درک شده‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی سیتوکین.) JAK2 کیناز به طور محکم به دُمین سیتوزولی تمامی گیرنده‌های سیتوکین‌ها متصل می‌شود (شکل ۱ـ۱۶ قسمت b را ملاحظه کنید). همانند سه عضو دیگر خانواده‌ی JAK کینازها، JAK2 دارای دومین اتصال به گیرنده در ناحیه N- ترمینال دُمین با فعالیت کینازی در ناحیه C-ترمینال (که به طور طبیعی دارای فعالیت کاتالیتیکی ضعیفی است) و دُمین میانی که با مکانیسم ناشناخته‌ای فعالیت کینازی را تنظیم می‌کند. JAK2، ارتیروپوئیتین و EpoR برای تشکیل اریتروسیت بالغ کاملاً لازم هستند که در روز



▲ **شکل ۸ـ۱۶ طرح کلی مسیرهای انتقال پیام آغاز شده با گیرنده اریتروپوئیتین.** اریتروپروتئین (Epo) به گیرنده‌اش EpoR متصل می‌شود و JAKکیناز مربوط به آن را فعال می‌کند. چهار مسیر اصلی قادر به انتقال پیام از کمپلکس EpoR-JAK فسفریله و فعال شده هستند. هر یک از این مسیرها حتماً رونویسی از مجموعه متفاوتی از ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. (a) در مستقیم‌ترین مسیر (بحث شده در این بخش) فاکتور رونویسی STAT به طور مستقیم در سیتوزول فسفریله و فعال می‌شود. (b) اتصال پروتئین‌های آداپتور (Shc یا GRB_2) به EpoR فعال، منجر به فعال‌سازی مسیر Ras/MAPkinase می‌شود (بخش ۱۶.۴). EpoR (**d** و **c**) دو مسیر فسفواینوزیتول با فراخوانی فسفولیپاز $C\gamma$ و PI-3 کیناز به غشاء به دنبال فعال شدن EpoR آغاز می‌شود. (بخش ۱۶.۵). بالا رفتن میزان Ca^{2+} و پروتئین کیناز B فعال نیز فعالیت پروتئین‌های سیتوزولی را تنظیم می‌کند که در کنترل رونویسی درگیر نمی‌شوند.

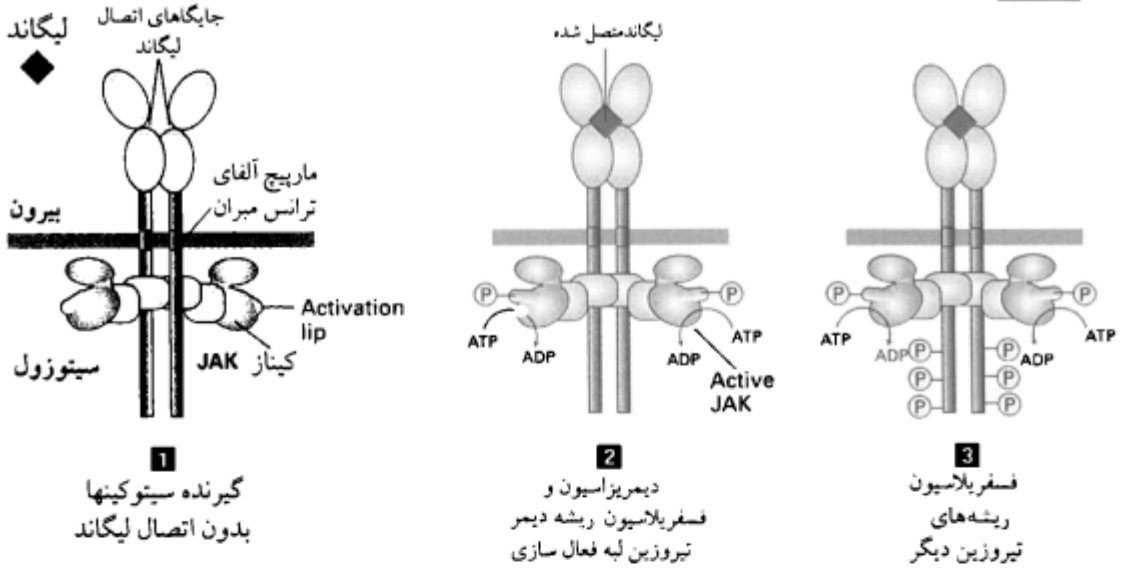


▲ **شکل تجربی ۹ـ۱۶ (شکل رنگی) . مطالعات بر روی موش‌های جهش یافته نشان می‌دهد که گیرنده اریتروپوئیتین (EpoR) برای رشد و تکامل جنین الزامی است.** موش‌هایی که هر دو الل مربوط به ژن رمزکننده EpoR تخریب می‌شوند، تا روز ۱۳ جنینی رشد می‌کنند و از کم خونی به علت عدم انتقال اکسیژن با واسطه‌ی اریتروسیت به اندام‌های جنینی می‌میرند. اندام قرمز در جنین‌های نوع وحشی (+/+) کبد جنین جایگاه اصلی تولید اریتروسیت در این مرحله تکوینی) است. نبود رنگ در جنین‌های جهش یافته (-/-) حاکی از نبود اریتروسیت‌های دارای هموگلوبین است. به عبارتی جنین‌های جهش یافته، طبیعی به نظر می‌رسند، که نشان می‌دهد، عملکرد اصلی EpoR در تکوین موش حمایت از تولید اریتروسیت است.

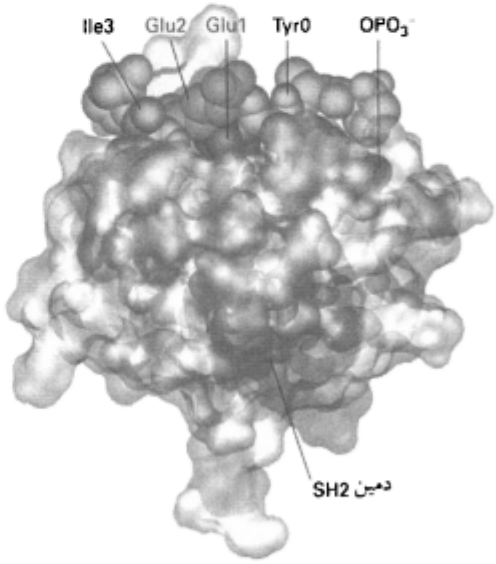
دوازدهم از تکامل جنینی در موش آغاز می‌شود. همانگونه که شکل ۹ـ۱۶ نشان می‌دهد، جنین‌های موشی فاقد ژن های عملکردی رمز کننده EpoR هستند که قادر به تشکیل اریتروسیت بالغ نیستند و نهایتاً به علت عدم توانایی برای انتقال اکسیژن به اندام‌های جنینی می‌میرند. موش‌های فاقد ژن‌های عملکردی رمز کننده Epo یا JAK2 بلوکه شدن مشابهی را در تکوین جنینی نشان می‌دهند.

همانطور که قبلاً اشاره شد، اریتروپوئیتین به طور همزمان با دومین‌های خارج سلولی دو مونومر EpoR بر روی سطح سلول متصل می‌شود (شکل ۷ـ۶ را ملاحظه کنید). از این رو، JAKهای متصل شده به اندازه کافی به یکدیگر نزدیک می‌شوند تا اینکه یکی از آنها بتواند دیگری را روی تیروزین اصلی در ناحیه‌ای از پروتئین تحت عنوان لبه فعال‌سازی[1] فسفریله کند (شکل ۱۰ـ۱۶). همانند کینازهای دیگر، فسفریلاسیون لبه فعال‌سازی منجر به تغییر ساختمان فضایی شده که K_m آن را برای ATP و یا سوبسترایی که فسفریله می‌شود، کاهش می‌دهد و لذا موجب افزایش فعالیت کینازی آن می‌شود. بخشی از این مدارک برای مکانیسم فعال‌سازی، از مطالعه JAK2 جهش یافته که در آن تیروزین اصلی به فنیل آلانین جهش یافته است، به دست آمده است. JAK2 جهش یافته به طور طبیعی به EpoR متصل می‌شود ولیکن نمی‌تواند فسفریله شود. در

1- Activation Lip



▲ **شکل ۱۰-۱۶. ساختار کلی و فعال‌سازی گیرنده‌ی سیتوکینی،** دُمین سیتوزولی گیرنده سیتوکین به طور محکم و برگشت‌ناپذیر به JAK کینازی جداگانه متصل می‌شود. در فقدان لیگاند (❶)، گیرنده‌ها هومودیمر تشکیل می‌دهند اما JAK کینازها به طور ضعیفی فعال‌اند. اتصال لیگاند موجب تغییر ساختمان فضایی گیرنده می‌شود که دُمین‌های اتصالی JAK کینازها با یکدیگر تجمع پیدا کرده و سپس یکدیگر را در ریشه تیروزین در لبه فعال‌سازی فسفریله می‌کنند(❷). فسفریلاسیون موجب می‌شود که لبه یاد شده به سمت خارج از جایگاه کاتالیتیکی کیناز حرکت کند، لذا افزایش توانایی اتصال برای ATP و پروتئین سوبسترا را فراهم می‌کند. سپس کیناز فعال شده تعدادی از ریشه‌های تیروزین را در دُمین سیتوزولی گیرنده فسفریله می‌کند (❸). فسفوتیروزین‌های حاصله در نقش جایگاه‌های لنگری روی فاکتور رونویسی EpoR غیرفعال و پروتئین‌های انتقال پیام دیگر دارای دومین‌های SH_2 و PTB عمل می‌نمایند.



▶ **شکل ۱۱-۱۶. مدل سطحی دُمین SH_2 متصل شده به پپتیدهای فسفوتیروزین.** دُمین SH_2 به طور محکم به پروتئین‌های هدف کوچک دارای توالی هسته‌ای چهار ریشه‌ی ضروری (فسفوتیروزین Tyro و OPO_3^-) - گلوتامیک اسید (Glu1)، گلوتامیک اسید (Glu2)، ایزولوسین (Ile3) متصل می‌شود. اتصال مشابه به دخول دو شاخه (زنجیره‌ای جانبی فسفوتیروزین و ایزولوسین متعلق به پپتید) به دو حفره در دُمین SH_2 می‌باشد. دو ریشه گلوتامات به جایگاه‌هایی بر روی سطح دُمین SH_2 بین دو سوراخ متصل می‌شوند.

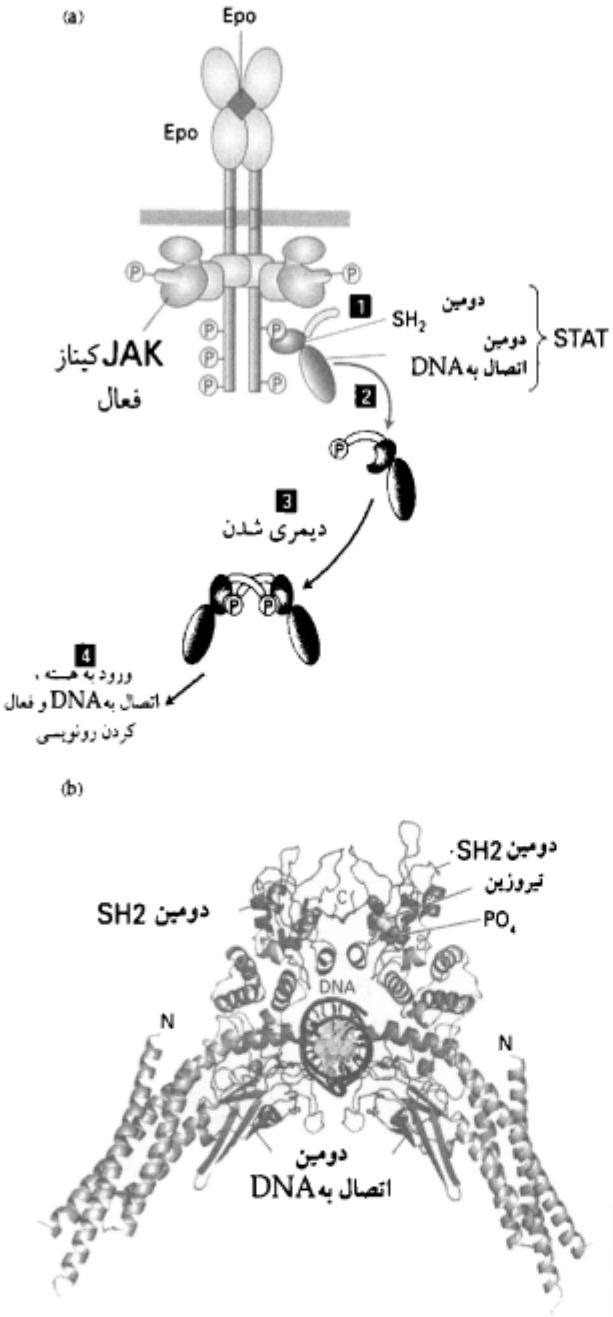
ژنتیک تکمیلی نشان می‌دهد که پروتئین‌های JAK و STAT پیام‌های سیتوکینی را انتقال می‌دهند

محققان دانسته‌های زیادی را در مورد مولکول‌های پیام‌رسان سیتوکینی دارند و علاوه بر این وقتی که برچسب رادیواکتیو (کلونینگ بیانی) برای سلول‌های پاسخ دهنده به سیتوکین مورد استفاده قرار گرفت، مدت زمان زیادی برای کشف سلول‌های اریتروئیدی بیان JAK2 جهش یافته در مقداری بالاتر از مقدار طبیعی به کلی پیام‌رسانی EpoR را بلوکه می‌کند، زیرا JAk2 جهش یافته به اکثر گیرنده‌های سیتوکینی متصل شده و اتصال و عملکرد پروتئین JAK2 نوع وحشی را مهار می‌کند. این نوع از جهش تحت عنوان **غالبیت منفی**[1] موجب از دست دادن عملکرد حتی در سلول‌هایی دارای نسخه‌های ژن نوع وحشی می‌شود.

وقتی که JAK کینازها فعال می‌شوند، چندین ریشه تیروزین را بر روی دُمین سیتوزولی گیرنده مذکور فسفریله می‌کنند (شکل ۱۰-۱۶، مرحله ❸ را ملاحظه کنید). تعدادی از این ریشه‌های

1- Dominant negative

◀ **شکل تجربی ۱۲ـ۱۶ (شکل رنگی) فعال‌سازی و ساختار پروتئین STAT.** ❶: به دنبال فعال‌سازی یک گیرنده سیتوکینی (شکل ۱۰ـ۱۶ را ملاحظه کنید) یک فاکتور رونویسی STAT مونومری غیرفعال به فسفوتیروزین درگیرنده متصل می‌شود و STAT را به نزدیکی JAK فعال مرتبط با گیرنده می‌آورد. سپس JAK تیروزین انتهای C (C ـ ترمینال) را در STAT فسفریله می‌کند. مراحل ❷ و ❸: STATهای فسفریله شده به طور خودبخود از گیرنده جدا شده و دیمر می‌شوند. به دلیل اینکه هومودیمر STAT دو میانکنش دُمین SH2 با فسفوتیروزین را دارد در حالیکه کمپلکس STAT و گیرنده توسط تنها یک چنین میانکنشی پایدار می‌شود، STATهای فسفریله شده تمایل به اتصال به گیرنده را ندارند. مرحله ❹: دیمر STAT به طرف هسته حرکت می‌کند و درآنجا به توالی‌های پروموتری متصل می‌شود و رونویسی از ژن‌های هدف را فعال می‌کند. (b) دیاگرام رویانی از دیمر STAT1 متصل شده به DNA (سیاه). دیمر STAT1 یک توده به شکل C را در اطراف DNA تشکیل می‌دهد که توسط میانکش‌های بسیار اختصاصی و برگشت‌پذیر بین دُمین SH2 (ارغوانی) از یک مونومر و ریشه فسفوتیروزین (زرد) بر روی قطعه انتهای، از مونومر دیگر پایدار می‌شود. مکان اتصالی فسفوتیروزین از دُمین SH2 در هر مونومر از لحاظ ساختاری به دُمین اتصال یابنده DNA (Magenta) متصل می‌شود که یک نقش بالقوه برای میانکش SH2 با فسفوتیروزین در پایدارسازی عناصر میانکش‌دهنده DNA، پیشنهاد می‌کند.



فسفوتیروزین در نقش جایگاه‌های اتصالی برای دُمین‌های SH_2 عمل می‌نمایند که این دمین‌ها قسمتی از بسیاری از پروتئین‌های انتقال پیام هستند (نظیر گروه STAT از فاکتورهای رونویسی). دُمین SH_2 از نام کاملش مشتق شده است[1] به جهت شباهت آن با ناحیه‌ای در تیروزین کیناز سیتوزولی معمول Src که به وسیله ژن Src رمز می‌شود. (Src سرواژه‌ای برای سارکوما است و علاوه بر این شکل جهش از ژن سلولی Src است که در جوجه‌های دارای سارکوما یافت می‌شود) (فصل ۲۵). ساختار سه بعدی دُمین SH_2 در

1- Src homology 2 domain

پروتئین‌های مختلف بسیار مشابه است، اما هر یک به توالی‌های متفاوتی از اسیدهای‌آمینه اطراف ریشه فسفوتیروزین متصل می‌شوند. توالی اسیدآمینه‌ای منحصر به فردی از هر دُمین SH_2 تعیین‌کننده ریشه‌های فسفوتیروزین ویژه برای اتصال آن است. (شکل ۱۱ـ۱۶). تغییرات حفره هیدروفوبیک در دُمین SH_2ی موجود در STATهای مختلف و پروتئین‌های انتقال پیام دیگر به آنها اجازه اتصال به فسفوتیروزین‌های مجاور با توالی‌های مختلف را می‌دهد (دلیل قانع‌کننده‌ای برای تفاوت در شرکای اتصالی آن‌ها).

تمامی پروتئین‌های STAT دارای دُمین اتصال به DNA در ناحیه N-ترمینال، دُمین SH_2 که به فسفوتیروزین ویژه در دومین سیتوزولی گیرنده‌های سیتوکین متصل می‌شود و دُمین C-ترمینال با ریشه تیروزین اصلی هستند.

وقتی که STAT به گیرنده متصل می‌شود، تیروزین C-ترمینال توسط یک JAK کیناز وابسته فسفریله می‌شود. (شکل ۱۲ـ۱۶ قسمت a). این آرایش تضمین می‌کند که در سلولی خاص فقط این پروتئین‌های STAT با دُمین SH_2 که قادر به اتصال به گیرنده پروتئینی خاص است فعال شود. برای مثال گیرنده اریتروپوئیتین، STAT5 را فعال می‌کند اما STATهای ۱، ۲، ۳ یا ۴ را فعال نمی‌کند. STAT فسفریله شده خود به خود از گیرنده جدا می‌شود و مضاف بر اینکه دو پروتئین STAT فسفریله شده، دیمری را تشکیل می‌دهند که دُمین SH_2 بر روی هریک به فسفوتیروزین در دیگری متصل می‌شود. به دلیل اینکه دیمریزاسیون NLS را نیز در معرض قرار می‌دهد، دیمرهای STAT به سمت هسته حرکت می‌کنند (جایی که آنها به توالی‌های **افزاینده**[1] (توالی‌های تنظیمی DNA) کنترلی ژن‌های هدف متصل می‌شوند (شکل ۱۲ـ۱۶ قسمت b)

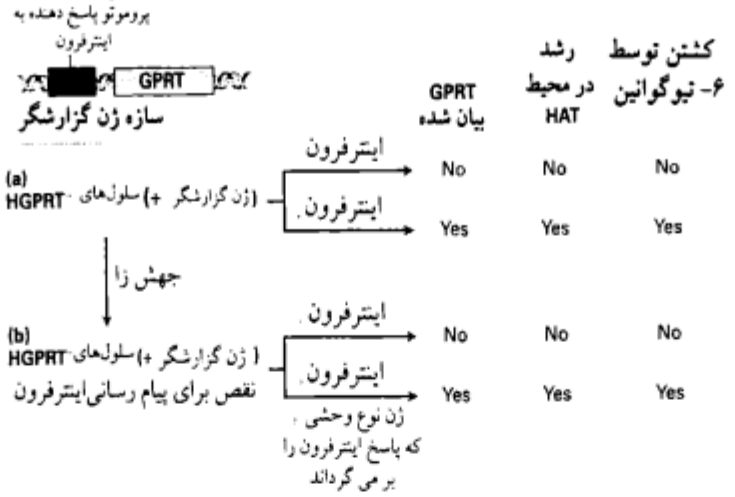
STATهای مختلف ژن‌های مختلفی را در سلول‌های گوناگون فعال می‌کنند. همانطور که متذکر شدیم، تحریک سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی با اریتروپوئیتین (Epo) منجر به فعال شدن STAT می‌شود. مهمترین پروتئین القاء شده توسط STAT5 فعال، $Bcl\text{-}x_L$ است که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (**آپوپتوز**) را در این سلول‌های پیش ساز مهار می‌کند و به آنها اجازه تکثیر و تمایز به سلول‌های اریتروئیدی را می‌دهد. (شکل ۶ـ۱۶ را ملاحظه کنید). در وضعیت نرمال (وقتی که میزان Epo پایین است) سلول‌های بنیادی مغز استخوان، دائماً سلول‌های اریتروئیدی پیش ساز را به وجود می‌آورند که به سرعت تخریب می‌شوند. این فرایند از نظر انرژی مقرون به صرفه می‌باشد و به بدن اجازه می‌دهد که به نیاز بیشتر اریتروسیت، در پاسخ به بالا رفتن میزان Epo خیلی سریع، پاسخ دهد. در واقع موش‌های فاقد STAT5 به شدت کم خون می‌شوند، چون بسیاری از پیش سازهای اریتروئیدی حتی در حضور میزان بالای اریتروپوئیتین دچار آپوپتوز می‌شوند. این موش‌های جهش یافته مقدار کمی اریتروسیت تولید می‌کنند و لذا زنده می‌مانند، چون گیرنده اریتروپوئیتین به مسیرهای آنتی آپوپتوزی دیگری متصل می‌شود که پروتئین‌های STAT را درگیر نمی‌کنند (شکل ۸ـ۱۶ را ملاحظه کنید).

گیرنده‌های سیتوکینی صرف نشد (همانطور که در بخش قبلی برای گیرنده TGFβ شرح داده شد). به هر حال، بدون تکنیک‌های جدید، محققان راهی برای بررسی مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی نداشتند که پیام‌های سیتوکینی را برای سال‌ها منتقل می‌کنند. نوعی جدید از غربالگری کاربردی ژنتیک (تکمیل عملکردی)، محققان را به پروتئین‌های JAK کیناز و فاکتور رونوسی STAT هدایت کرد.

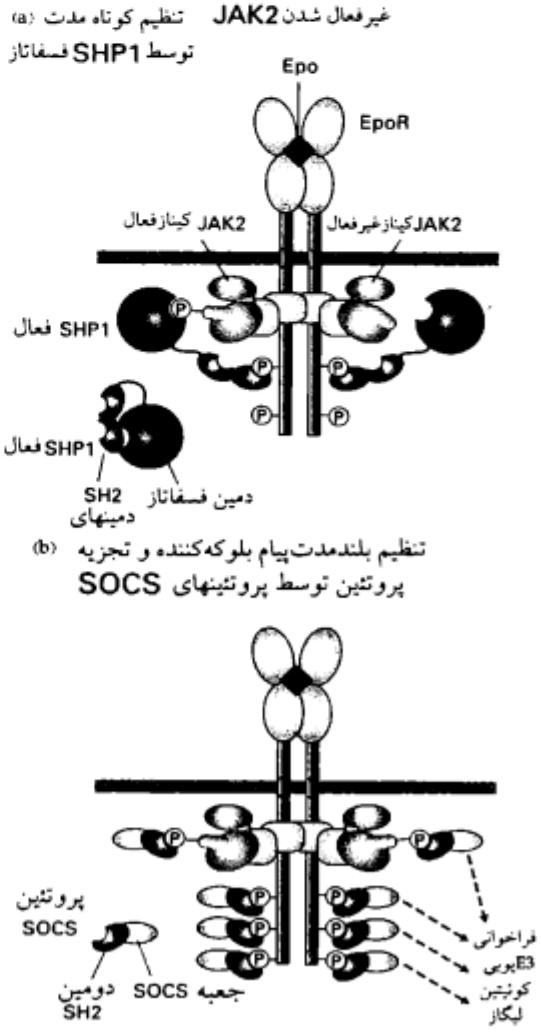
در قسمت ابتدایی این مطالعات، ژن گزارشگر[2] باکتریایی رمز کننده گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (GPRT) به پروموتر بالادست فعال شونده به وسیله اینترفرون ضدویروس سیتوکینی متصل می‌شود. سازه حاصله را بداخل کشت سلولی پستانداران نقص ژنتیکی در HGPRT هومولوگ انسانی وارد می‌کنند. یا GPRT و یا HGPRT باید در سلول بیان شوند تا اینکه پورین‌های موجود در محیط کشت به داخل ریبونوکلئوتیدها و سپس DNA یا RNA داخل شوند. همانطور که در شکل ۱۳ـ۱۶ قسمت a نشان داده شده است، سلول‌های فاقد HGPRT حامل ژن گزارشگر به تیمار اینترفرون با بیان GPRT پاسخ دادند، لذا توانایی رشد در محیط کشت HAT را بدست آوردند. سلول‌های فاقد GPRT یا HGPRT قادر به رشد در محیط کشت HAT نیستند، به دلیل اینکه سنتز پورین‌ها به وسیله سلول‌های نامبرده توسط آمینوپترین (A در HAT) بلوکه می‌شود، لذا سنتز DNA به وسیله این سلول‌ها به ورود پورین‌های موجود در محیط کشت بستگی دارد (شکل ۳۶ـ۹ راملاحظه کنید). همزمان با افزایش مشتق غیرطبیعی پورین با نام 6ـ تیوگوانین که توسط GPRT به ریبونوکلئوتید نظیرش تبدیل می‌شود، سلول‌ها حساس به مرگ می‌شوند. ورود این پورین به داخل DNA در مکان گوانین، نهایتاً سبب مرگ سلول می‌شود.

سپس سلول‌های گزارشگر، به شدت با جهش زاها تیمار می‌شوند. به این خاطر که هر دو آلل ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های

1- Enhancer 2- Reporter gene



▲ **شکل تجربی ۱۳-۱۶. سلول‌های جهش یافته حامل ژن گزارشگر برای شناسایی JAKها و STATها به عنوان پروتئین‌های انتقال پیام الزامی استفاده شدند.** ژن گزارشگر حاوی پروموتر پاسخ دهنده به اینترفرون بالادست ژن رمزکننده باکتریایی GPRT (آنزیمی کلیدی در مسیر بازیافت پورین) است (شکل ۳۶-۹ را ملاحظه کنید). (a) ورود این سازه به داخل سلول‌های پستانداران فاقد HGPRT همولوگ انسانی، سلول‌های گزارشگری را ایجاد می‌کند که در محیط کشت HAT رشد کرده و علاوه بر این توسط ۶- تیوگوانین ولیکن فقط در حضور اینترفرون می‌میرند. (b) به دنبال تیمار سلول‌های گزارشگر با جهش‌زا، سلول‌های دارای نقص در مسیر پیام‌رسانی آغاز شونده با اینترفرون، HGPRT را در پاسخ به اینترفرون ایجاد نکرده و لذا نمی‌توانند پورین سمی ۶- تیوگوانین را وارد کند. بازیابی پاسخ اینتروفرونی توسط تکمیل عملکردی با مولکول‌های DNAی وحشی، ژن‌های رمزکننده JAKها و STATها را شناسایی کرد.



▶ **شکل ۱۴-۱۶. دو مکانیسم برای خاتمه انتقال پیام از گیرنده اریتروپوئیتین (EpoR).** (a) تنظیم کوتاه مدت: SHP1 (فسفوتیروزین فسفاتاز) در شکل غیرفعال در سلول‌های تحریک نشده وجود دارد. اتصال دُمین SH_2 مربوط به SHP1 به فسفوتیروزین ویژه در گیرنده فعال، جایگاه کاتالیتیک فسفاتاز آن را نمایان کرده و آن را نزدیک تیروزین فسفریله شده در ناحیه لپه JAK2 قرار می‌دهد. حذف فسفات از این تیروزین، JAK کیناز را غیرفعال می‌کند. (b) تنظیم بلندمدت: پروتئین‌های SOCS که بیانشان توسط پروتئین‌های STAT در سلول‌های اریتروئیدی تحریک شده با اریتروپوئیتین القاء می‌شود، پیام‌ها با مدت زمان‌های طولانی‌تر را مهار و یا اینکه برای همیشه خاتمه می‌دهد. اتصال SOCS به ریشه‌های فسفوتیروزین بر روی EpoR و یا JAK2، اتصال پروتئین‌های پیام‌رسان دیگر را بلوکه می‌کند (سمت چپ). جعبه SOCS، همچنین می‌تواند پروتئین‌هایی از قبیل JAK2 را برای تجزیه توسط مسیر یوبی‌کوئیتین- پروتئازوم مورد هدف قرار دهد. (سمت راست) مکانیسم‌های مشابهی، پیام‌رسانی را از گیرنده‌های سیتوکینی دیگر تنظیم می‌کنند.

انتقال پیام حیاتی در مسیر پیام‌رسانی اینترفرون غیرفعال شوند، محققان سلول‌های جهش یافته‌ای را جستجو کردند که گیرنده اینترفرون را بیان کند (همانطور که توسط توانایی سلول‌ها برای اتصال به اینترفرون رادیواکتیو نشان داده شد) ولیکن GPRT را در پاسخ به اینترفرون بیان نکند و لذا با وجود ۶- گوانین وقتی که سلول‌ها

در حضور اینترفرون کشت داده شوند، زنده می‌ماندند (شکل ۱۳ـ۱۶ قسمت b). بعد از اینکه بسیاری از این رده‌های سلولی جهش یافته بدون پاسخ به اینترفرون به دست آمد، آنها برای غربالگری کتابخانه ژنومی و یا cDNAی مربوط به ژن‌های نوع وحشی استفاده شده‌اند که ژن‌های جهش یافته را در سلول‌های همتا تکمیل می‌کنند (تکنیک تکمیل عملکردی[1]) (شکل ۱۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید). در این حالت، سلول‌های جهش یافته بیان‌کننده ژن وحشی و نوترکیب مرتبط به هم، بر روی محیط کشت HAT رشد می‌نمایند و به ۶ـ تیوگوانین در حضور اینترفرون حساس هستند. به عبارت دیگر، آنها همانند سلول‌های وحشی عمل می‌نمایند.

کلونینگ ژن‌های شناسایی شده توسط این روش، منجر به شناخت دو پروتئین کلیدی انتقال پیام شد که به وسیله سیتوکین اینترفرون فعال می‌شوند: تیروزین کیناز JAK و فاکتور رونویسی STAT. نتایج بعدی نشان داد که یکی از (برخی اوقات دو) چهار پروتئین JAK انسانی و حداقل یکی از چندین پروتئین STAT در پیام‌رسانی پایین دست تمامی گیرنده‌های سیتوکینی درگیر می‌شوند.

پیام‌رسانی از گیرنده سیتوکینی توسط پیام‌های منفی تنظیم می‌شود

رونویسی از ژن‌های هدف با القاء پیام، برای دوره‌های طولانی مدت می‌تواند همانند عدم القاء برای سلول خطرناک باشد. بنابراین سلول‌ها باید قادر به خاموش کردن سریع مسیر پیام‌رسانی باشند مگر اینکه پیام خارج سلولی دائماً حضور داشته باشد. در سلول‌های پیش ساز متنوع، دو دسته از پروتئین‌ها برای تضعیف پیام‌رسانی از گیرنده سیتوکین‌ها عمل می‌کنند. یکی بیشتر برای زمان‌های کوتاه مدت (چند دقیقه) و دیگری بیشتر برای مدت زمان طولانی‌تر (چند ساعت تا چند روز).

تنظیم کوتاه مدت توسط SHP1(فسفوتیروزین فسفاتاز)

موش‌های فاقد پروتئین SHP1 به دلیل تولید بیش از حد اریتروسیت و انواع مختلف دیگر از سلول‌های خونی می‌میرند. آنالیز این موش‌های جهش یافته نخستین پیشنهاد در مورد SHP1 (یک فسفوتیروزین فسفاتاز) را مطرح کرد که این فاکتور به طور منفی پیام‌رسانی را از طریق تعدادی از انواع گیرنده سیتوکین‌ها در انواع مختلفی از سلول‌های پیش ساز تنظیم می‌کند.

SHP1 پیام‌رسانی سیتوکین را با اتصال به گیرنده آن و غیرفعال کردن پروتئین JAK وابسته به آن کاهش می‌دهد (در شکل ۱۴ـ۱۶ قسمت a نشان داده شده است). علاوه بر دُمین کاتالیتیک فسفاتاز، SHP1 دارای ۲ دُمین SHP1 است. هنگامی که سلول‌ها در وضعیت استراحت هستند (با سیتوکین تحریک نشده‌اند) یکی از دمین‌های SH_2 در SHP_1 به طور فیزیکی به جایگاه کاتالیتیک در دُمین فسفاتاز متصل و آن را غیرفعال می‌سازد. ولیکن در وضعیت تحریک شده، این دُمین SH_2 بلوکه‌کننده به ریشه فسفوتیروزین ویژه‌ای در گیرنده‌ی فعال متصل می‌شود. تغییر کونفورماسیونی که با این اتصال همراه است، جایگاه کاتالیتیک SHP1 را نمایان کرده و همچنین آن را به مجاورت با ریشه فسفوتیروزین در لبه فعال‌سازی پروتئین JAK متصل به گیرنده می‌برد. با برداشت این فسفات، SHP1، JAK را غیرفعال می‌کند، به گونه‌ای که دیگر قادر به فسفریله‌کردن گیرنده یا سوبسترای دیگری نیست (مانند STATها) مگر اینکه مولکول‌های دیگر سیتوکینی به گیرنده‌های سطح سلول متصل شوند و یک چرخه جدید از پیام‌رسانی را آغاز نمایند.

تنظیم درازمدت به وسیله پروتئین‌های SOCS

به عنوان مثالی کلاسیک از فیدبک منفی، در میان ژن‌هایی که رونویسی آنها به وسیله پروتئین‌های STAT القاء می‌شود، می‌توان به ژن‌های رمز کننده دسته‌ای از پروتئین‌های کوچک تحت نام پروتئین‌های SOCS اشاره کرد. این پروتئین‌ها پیام‌رسانی از گیرنده‌های سیتوکینی را خاتمه می‌دهند. این تنظیم‌کننده‌های منفی از دو مسیر عمل می‌کنند (شکل ۱۴ـ۱۶ قسمت b). اول اینکه، دُمین SH_2 بر روی پروتئین‌های بر روی SOCS به فسفوتیروزین‌های گیرنده فعال شده متصل می‌شود و مانع از اتصال پروتئین‌های پیام رسان دیگر دارای دومین SH_2 به آن می‌شوند (مانند STATها) و لذا پیام‌رسانی از گیرنده را مهار می‌کند. یک پروتئین SOCS (SOCS-1)، همچنین به فسفوتیروزین اصلی در لبه‌ی فعال‌سازی کیناز JAK2 فعال متصل می‌شود و بدین وسیله عملکرد کاتالیتیک آن را مهار می‌کند. دوم اینکه، تمامی پروتئین‌های SOCS حاوی دُمینی تحت نام جعبه SOCS هستند که اجزاء لیگاز یوبی‌کوئیتین E_3 را فرا می‌خواند (شکل ۲۹ـ۳ را ملاحظه کنید). برای مثال، بر اثر اتصال SOCS-1، JAK2 پلی یوبی‌کوئیتینه شده و سپس در پروتئازوم[2] تجزیه می‌شود، بنابراین به طور ثابت تمامی مسیرهای

1- Functional comlementation

2- Proteasome

پیام‌رسانی با واسطه‌ی JAK2 خاموش می‌ماند. این مشاهده که مهارکننده‌های پروتئازوم انتقال پیام مربوط به JAK2 را طولانی‌تر می‌کند، حمایت‌کننده این مکانیسم است.

مطالعات با سلول‌های کشت شده پستانداران نشان داده است که گیرنده مربوط به هورمون رشد (که متعلق به ابرخانواده گیرنده سیتوکین است) توسط پروتئین دیگر SOCS (SOCS-2) تنظیم کاهشی می‌شود. به طور چشم‌گیری، موش‌های با نقص در SOCS-2 به طور معنی‌داری در مقایسه با همتای وحشی آن بیشتر رشد کرده و دارای استخوان‌هایی با طول بیشتر و گسترش متناسب اکثر اندام‌ها هستند. لذا پروتئین‌های SOCS نقش منفی الزامی را در تنظیم پیام‌رسانی داخل سلولی از گیرنده‌های متعلق به اریتروپوئیتین، هورمون رشد و سیتوکین‌های دیگر ایفاء می‌کند.

گیرنده اریتروپوئیتین جهش یافته که قادر به خاموش شدن نیست، منجر به افزایش تعداد اریتروسیت‌ها می‌شود

در مردان و زنان بالغ و طبیعی، اریتروسیت‌ها در خون (هماتوکریت) بسیار نزدیک به ۴۶ـ۴۵ درصد حفظ می‌شود. کاهش در هماتوکریت باعث افزایش تولید اریتروپوئیتین به وسیله کلیه می‌شود و افزایش میزان اریتروپوئیتین موجب می‌شود پیش سازهای اریتروئیدی بیشتری دچار خاتمه تکثیر و تمایز به اریتروسیت‌های بالغ شوند، لذا بلافاصله هماتوکریت به سطح طبیعی‌اش برگردانیده می‌شود. در تمرینات استقامتی، از قبیل اسکی صحرائی، انتقال اکسیژن به ماهیچه‌ها، ممکن است محدودیت داشته باشد. افزایش بیش از حد اریتروسیت‌ها مزیت رقابتی ایجاد می‌کند. به این دلیل از استفاده اریتروپوئیتین کمکی برای افزایش هماتوکریت بالاتر از سطح طبیعی در تمامی رقابت‌های ورزشی بین‌المللی جلوگیری می‌شود و ورزشکاران به طور مرتب برای افزایش هماتوکریت و برای حضور اریتروپوئیتین تجاری نوترکیب در ادرارشان آزمایش می‌شوند.

اریتروپوئیتین کمکی نه تنها مزیت رقابتی احتمالی را ایجاد می‌کند بلکه همچنین می‌تواند خطرناک باشد. تعداد بسیار زیاد اریتروسیت‌ها قادر به ایجاد کند شدن جریان خون و لخته در رگ‌های خونی به ویژه در مغز هستند. تعدادی از ورزشکاران که با اریتروپوئیتین دوپینگ می‌کنند، در حال ورزش کردن در اثر سکته مغزی جان می‌دهند. کشف گیرنده جهش یافته و غیرقابل تنظیم اریتروپوئیتین (EpoR) وضعیت مشکوک برنده سه مدال طلای اسکی صحرایی المپیک را که درصد هماتوکریت بالای ۶۰ داشت، را توجیه کرد. ولیکن آزمایش خون و ادرار این فرد برای اریتروپوئیتین میزان کمتر از نرمال را نشان داد. آنالیز DNA بعد از آن نشان داد که ورزشکار برای جهش در ژن رمز کننده گیرنده اریتروپوئیتین هتروزیگوت بود. آلل جهش یافته گیرنده کوتاه شده را رمز می‌کرد و تعدادی از تیروزین‌هایی که به طور نرمال بعد از تحریک اریتروپوئینین فسفریله می‌شوند را از دست داده بود، بنابراین، گیرنده جهش یافته قادر به فعال کردن STAT5 و پروتئین‌های پیام‌رسان دیگر به طور نرمال بود اما به فسفاتاز SHP1 که معمولاً پیام‌رسانی را خاتمه می‌دهد نمی‌توانست متصل شود (شکل ۱۴ـ۱۶ قسمت a را ملاحظه کنید). از این رو، میزان بسیار پایین اریتروپوئیتین ایجاد شده توسط این ورزشکار موجب القاء طولانی مدت پیام‌رسانی داخل سلولی در سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی او شده و مسبب تولید تعداد بیشتر از طبیعی اریتروسیت است. این مثال به وضوح کنترل دقیق پیام‌رسانی بعد از گیرنده اریتروپوئیتین در بدن انسان را نشان می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۶

گیرنده‌های سیتوکینی و مسیر JAK/STAT

- همه سیتوکین‌ها از چهار مارپیچ آلفا تشکیل شده است که در یک آرایش مشخصی تا می‌خورند.
- اریتروپوئیتین (سیتوکین ترشح شده توسط سلول‌های کلیه) مانع از آپوپتوز می‌شود و تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز اریتروئید را در مغز استخوان شروع می‌کند که مانع از تنظیم کاهشی شده و در نتیجه تعداد زیادی از اریتروسیت‌هارا تولید می‌کند.
- همه گیرنده‌های سیتوکین به طور تنگاتنگی مرتبط با JAK پروتئین تیروزین کیناز هستند، که می‌تواند چندین‌مسیر پیام‌رسانی پائین دستی را فعال کند و منجر به تغییراتی در رونویسی ژن‌های هدف یا در فعالیت پروتئین‌هایی شود که رونویسی تنظیم می‌کنند (شکل ۸-۱۶ را ملاحظه کنید).
- مسیر JAK/STAT در پائین دست همه گیرنده‌های سیتوکینی عمل می‌کند. مونومرهای STAT متصل به گیرنده‌ها توسط JAKهای متصل با گیرنده فسفریله می‌شوند و سپس دیمری شده و به طرف هسته حرکت می‌کنند و در آنجا رونویسی را فعال می‌کنند (شکل ۱۲-۱۶ را ملاحظه کنید). پیام‌رسانی از گیرنده‌های سیتوکینی توسط فسفوپروتئین فسفاتاز SHP1 و چندین پروتئین SOCS خاتمه می‌یابد (شکل ۱۴-۱۶ را ملاحظه کنید).

۲-۱۶ گیرنده‌های تیروزین کینازی

اکنون به دسته بزرگ و مهم دیگری از گیرنده‌های سطح سلول متمرکز می‌شویم (RTK)[1] که بسیاری از جنبه‌های تکثیر سلول و تمایز، بقاء سلول و متابولیسم سلولی را تنظیم می‌کنند. مولکول‌های پیام‌رسان که RTK را فعال می‌کنند، محلول یا پپتید متصل به غشاء یا هورمون‌های غشایی شامل بسیاری از آنهایی هستند که در ابتدا به عنوان فاکتور رشد برای انواع خاصی از سلول‌ها شناسایی شدند. لیگاندهای RTK شامل فاکتور رشد عصبی[2] (NGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت[3] (PDGF)، فاکتور رشد فیبروپلاستی[4] (FGF) و فاکتور رشد اپی درمی[5] (EGF) هستند. RTKهای دیگر ولیگاند آنها در هنگام مطالعه بر روی سرطان انسانی مرتبط با اشکال جهش یافته گیرنده‌های فاکتور رشد شناسایی شدند که تکثیر را حتی در غیاب فاکتور رشد تحریک می‌کنند. RTKهای دیگر در خلال آنالیز جهش‌های تکوینی نمایان شدند که منجر به بلوکه شدن تمایز انواع معینی از سلول‌ها در کرم حلقوی الگانس، دروزوفیلا و موش می‌شوند.

همانند گیرنده سیتوکین‌ها، RTKها از طریق پروتئین‌های تیروزین کیناز پیام‌رسانی می‌کنند. ولیکن، متفاوت با گیرنده‌های سیتوکینی که به پروتئین کیناز سیتوزولی جداگانه (JAK) متصل می‌شوند RTKها دارای کیناز ذاتی به عنوان بخشی از دُمین سیتوزولی‌شان هستند. دیمری شدن القاء شده با لیگاند و فعال شدن کمک RTK، فعالیت تیروزین کینازی آن را تحریک می‌کند و این عمل چندین مسیر انتقال پیام داخل سلولی را آغاز می‌کند (شکل ۲-۱۶ را ملاحظه کنید). در این بخش ما شیوه‌ای را که اتصال لیگاند منجر به فعال شدن RTKها می‌شود را بحث می‌کنیم، سپس شیوه‌ی کنترل تعداد RTKهای سطح سلول را بررسی می‌کنیم. در ادامه بخش مسیری را که تقریباً توسط هر RTK آغاز می‌شود مطالعه می‌کنیم (مسیر Ras/MAPkinase)

اتصال لیگاند منجر به فسفریلاسیون و فعال‌سازی کیناز ذاتی در RTKها می‌شود

تمامی RTKها دارای سه جزء الزامی هستند: دُمین خارج سلولی حاوی جایگاه اتصال لیگاند، یک مارپیچ آلفای گذرنده از غشای آبگریز و دُمین سیتوزولی که شامل ناحیه‌ای با فعالیت پروتئین تیروزین کینازی است. اکثر RTKها مونومر هستند و اتصال لیگاند به دُمین خارج سلولی، تشکیل گیرنده دیمر را القاء می‌کند. برخی از لیگاندهای مونومری مربوط به RTKها مانند FGF، به طور محکم به هپاران سولفات (عامل پلی ساکاریدی با بار منفی در ماتریکس خارج سلولی (فصل ۱۹)) متصل می‌شوند. این اتصال، متصل شدن لیگاند را به گیرنده‌ی مونومری و همچنین تشکیل کمپلکس دیمری لیگاند - گیرنده را تشدید می‌کند (شکل ۱۵-۱۶). لیگاندها برای برخی از RTKها دیمری هستند. اتصال آنها، گیرنده‌های مونومریک را کنار هم قرار می‌دهد. با این وجود RTKهای دیگر، از قبیل گیرنده انسولین، حتی در غیاب هورمون با پیوند دی سولفیدی دایمر تشکیل می‌دهند. اتصال لیگاند به این RTK کونفورماسیونشان را در جهت فعال شدن گیرنده تغییر می‌دهند.

بدون توجه به مکانیسمی که توسط آن لیگاند به RTK متصل شده و آن را در وضعیت عملکردی دیمر قفل می‌کند، مرحله بعدی آن عمومی است. در وضعیت استراحت (وضعیت تحریک نشده) فعالیت کینازی ذاتی مربوط به RTK بسیار پایین است. (شکل ۱۶-۱۶ مرحله ❶). ولیکن گیرنده دیمر متصل به لیگاند کیناز در یک زیرواحد یک ریشه تیروزین را در لبه فعال‌سازی جایگاه کاتالیتیک در زیرواحد دیگر فسفریله می‌کند (مرحله ❷). این امر منجر به تغییر ساختمان فضایی می‌شود که اتصال ATP را به برخی از گیرنده‌ها (مانند گیرندهٔ انسولین) و اتصال سوبسترهای پروتئینی به گیرنده‌های دیگر (مانند گیرنده FGF) را تسهیل می‌کند. سپس فعالیت کینازی تشدید شده ریشه‌های تیروزین دیگر را در دومین سیتوزولی گیرنده مذکور فسفریله می‌کند (مرحله ❸). این فعال‌سازی القاء شده با لیگاند مربوط به فعالیت کینازی RTK با فعال‌سازی JAK کینازهای همراه با گیرنده سیتوکین‌ها شباهت دارد. (شکل ۱۰-۱۶ را ملاحظه کنید). ریشه‌های متفاوت در جایگاه کاتالیتیک کینازی (در دُمین سیتوزولی RTKها) ولیکن به صورت جداگانه با هم مرتبط هستند (JAK کیناز سیتوزولی در مورد گیرنده‌های سیتوکینی)

بیان زیاد HER2 (گیرنده تیروزین کیناز) در برخی از انواع سرطان‌های سینه رخ می‌دهد

چهار گیرنده تیروزین کینازی (RTK) در پیام‌رسانی به وسیله بسیاری از مولکول‌های پیام‌رسان مربوط به اعضاء خانواده EGF

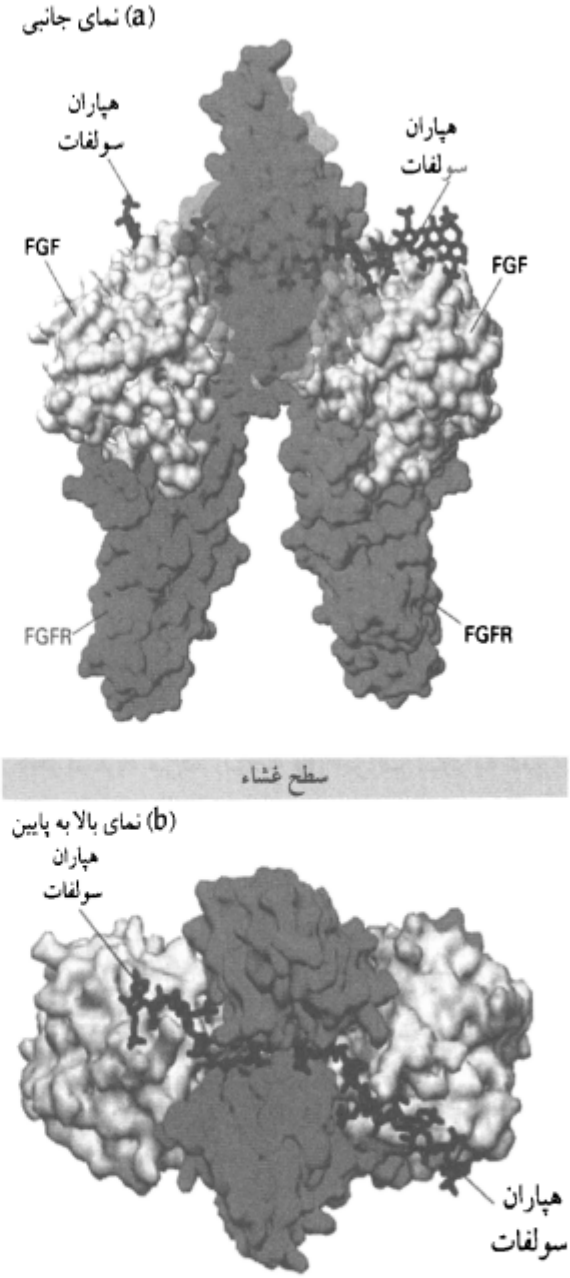
1- Receptor Tyrosine Kinase

2- Nerve growht factor

3- Platelet - derived growth factor

4- Fibroblast growth factor

5- Epidermal growth factor

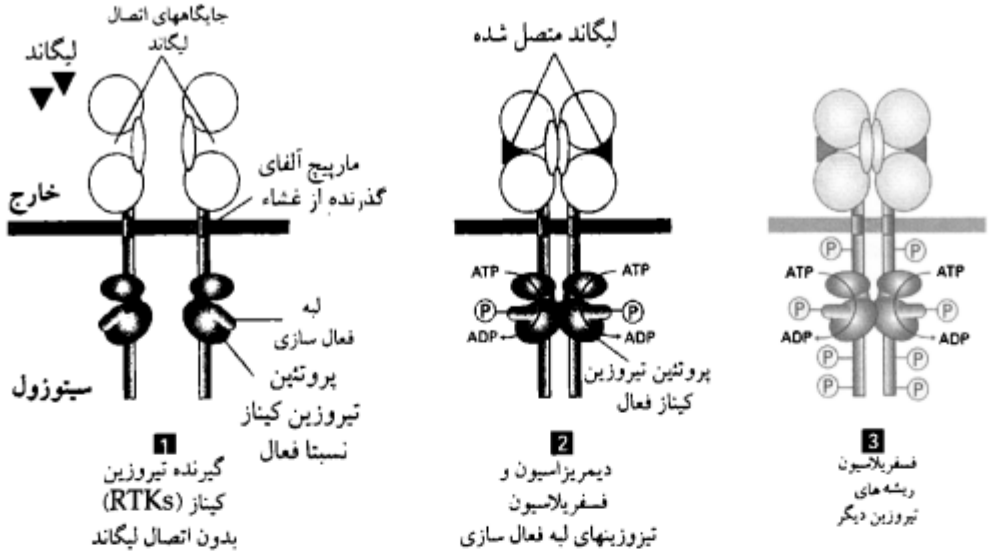


◀ شکل ۱۵-۱۶ ساختار تثبیت شده گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) توسط هپاران سولفات. اینجا نماهای جانبی و بالا به پایین کمپلکس مربوط به دُمین‌های خارج سلولی دو گیرنده FGF مونومر (FGFR)، دو مولکول FGF متصل شده و دو زنجیره کوتاه هپاران سولفات که به طور محکم به FGF متصل می‌شوند. (a) در نمای جانبی، دُمین بالایی یک گیرنده مونومر در پشت دیگری مشاهده می‌شود. غشاء پلاسمایی در زیر است. قطعه کوچکی از دُمین خارج سلولی با ساختار ناشناخته با قطعه مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء مربوط به هر یک از دو گیرنده مونومر تماس برقرار می‌کنند که به صورت وارونه وارد غشاء می‌شوند. (b) در نمای بالا، زنجیره‌های هپاران سولفات به صورت رشته‌های بینابینی مشاهده می‌شود و علاوه بر این تماس‌های زیادی را با دُمین‌های بالای هر دو گیرنده مونومر ایجاد می‌کند. این میانکنش‌ها به اتصال لیگاند به گیرنده و دیمری شدن گیرنده کمک می‌کنند.

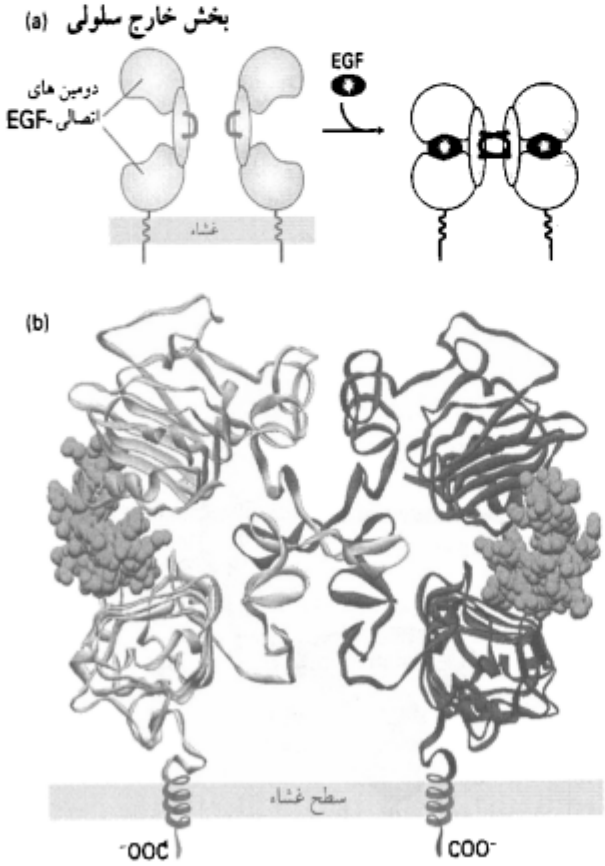
شرکت می‌کنند. در انسان چهار عضو از خانواده HER[1] به صورت HER1,2,3,4 نشان داده می‌شوند. HER1 به طور مستقیم به سه عضو از خانواده EGF متصل می‌شود: EGF، HB-EGF[2] و TGF-α[3]. اتصال هر یک از این لیگاندها به دُمین خارج سلولی HER1 مونومر منجر به هومودیمریزسیون دُمین خارج سلولی HER1 می‌شود (شکل ۱۷-۱۶). اتصال EGF سبب تغییر ساختمان فضایی دُمین خارج سلولی گیرنده فوق‌الذکر می‌شود به گونه‌ای که، از خارج به حلقه قرار گرفته بین دو دُمین اتصال EGF فشار وارد می‌کند و علاوه بر این، میانکنش بین دو قطعه حلقه‌ای گسترده شده (فعال شده) اجازه تشکیل گیرنده دیمر را می‌دهد. دیمریزاسیون HER1 منجر به فعال شدن فعالیت کینازی گیرنده به واسطه‌ی فسفریلاسیون لبه فعال‌سازی در دُمین سیتوزولی کیناز می‌شود. (شکل ۱۶-۱۶ را ملاحظه کنید).

دو عضو دیگر از خانواده EGF یعنی نورگیولین[4] ۱ و ۲ (NRG1 و NRG2) به هر دو HER3 و HER4 متصل می‌شوند. HB-EGF نیز به HER4 متصل می‌شود. هم اینکه HER2 به طور مستقیم به لیگاند متصل نمی‌شود ولیکن بر روی غشاء در ساختمان فضایی پیش فعال با قطعه حلقه‌ای برجسته به طرف بیرون و دُمین‌های اتصال به لیگاند کاملاً نزدیک وجود دارد. (شکل ۱۸-۱۶ قسمت a). HER2 با تشکیل هتروکمپلکس با HER2,3,4 متصل به لیگاند پیام می‌دهد و پیام‌رسانی به وسیله تمامی اعضاء خانواده EGF را تسهیل می‌کنند (شکل ۱۸-۱۶ قسمت b). HER3 فاقد دُمین کینازی عملکردی است و بعد از اتصال لیگاند به آن با HER2 دیمر تشکیل داده و توسط فعالیت کینازی HER2 فسفریله می‌شود. این عمل مسیرهای انتقال پیام پایین دست را فعال می‌کند.

1- Human epidermal growth factor receptor
2- Heparin - binding EGF
3- Tumor - derived growth factor alpha
4- Neuregulin

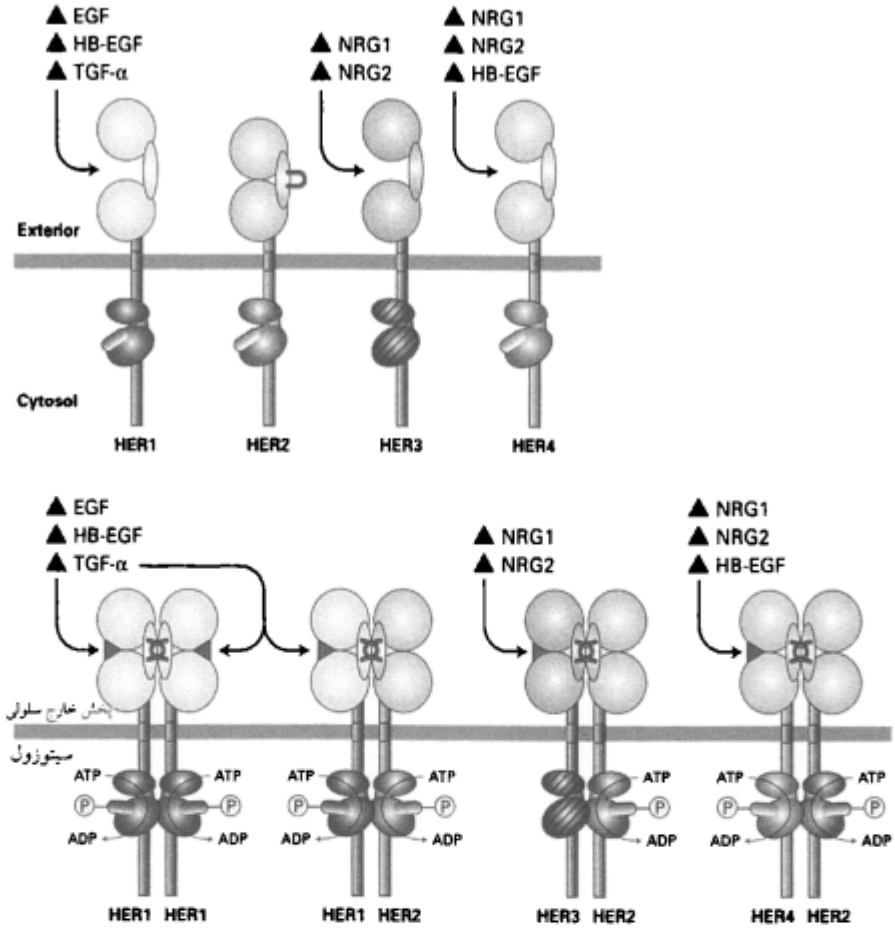


▲ **شکل ۱۶-۱۶- ساختار کلی و فعال‌سازی گیرنده تیروزین کینازها.** دُمین سیتوزولی RTKها حاوی جایگاه کاتالیتیک پروتئین تیروزین کیناز است. در غیاب لیگاند (مرحله ❶)، RTKها به صورت مونومر با فعالیت کینازی ضعیف وجود دارند. اتصال لیگاند موجب تغییر کونفورماسیونی شده که به تشکیل گیرنده عملکردی دیمرو کنار هم قرار گرفتن دو کیناز با فعالیت ضعیف کمک می‌کند که سپس این دو یکدیگر را بر روی ریشه تیروزین در لبه فعال‌سازی فسفریله می‌کنند (مرحله ❷). فسفریلاسیون باعث حرکت لبه مذکور به سمت خارج جایگاه کاتالیتیک کینازی می‌شود و لذا اجازه اتصال به ATP و یا پروتئین سوبسترا را به آن می‌دهد. سپس کیناز فعال ریشه‌های تیروزین دیگری را در دُمین سیتوزولی گیرنده فسفریله می‌کنند (مرحله ❸). فسفوتیروزین‌های حاصله به عنوان جایگاه‌های لنگراندازی برای پروتئین‌های متنوع انتقال پیام عمل می‌نمایند.

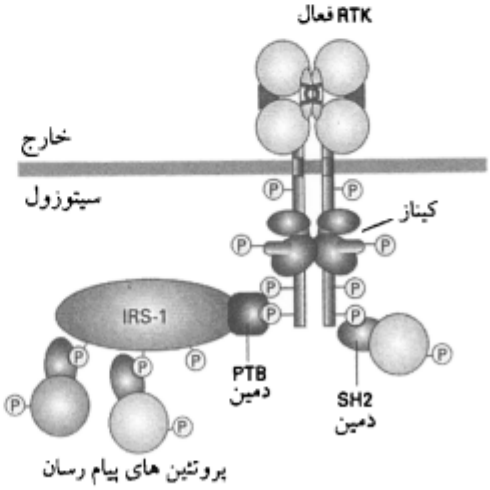


◀ **شکل ۱۷-۱۶(شکل رنگی). دیمریزاسیون HER1 (یک گیرنده انسانی برای EGF) القاء شده با لیگاند** (a) تصویر شماتیک از دُمین‌های ترانس ممبران (گذرنده از غشاء) و خارج سلولی HER1 که گیرنده تیروزین کیناز هستند. اتصال یک مولکول EGF به گیرنده مونومری موجب تغییر در ساختار حلقه قرار گرفته بین دو دُمین اتصالی به EGF می‌شود. دیمریزاسیون دو گیرنده مونومری متصل به لیگاند همسان در سطح غشاء در آغاز از طریق میانکنش بین دو قطعه حلقه‌ای فعال رخ می‌دهد. (b) ساختار پروتئین دیمر HER1 متصل به TGF-α (عضوی از خانواده EGF). دُمین‌های خارج سلولی گیرنده بارنگ سفید (سمت چپ) و آبی (سمت راست) نشان داده شده‌اند؛دُمین گذرنده از غشاء با رنگ قرمز نشان داده شده است که یک مارپیچ آلفا می‌باشد امّا ساختارش تا حد زیادی شناخته نشده است. دو مولکول TGFα کوچکتر به رنگ سبز هستند. به میانکنش بین قطعات لوپ «فعال شده» در دو مونومر گیرنده توجه کنید.

سلول‌های اپیتلیال طبیعی، میزان کمی از پروتئین HER2 را بر روی غشاء پلاسمائی‌شان به صورت الگوی اختصاصی بافتی بیان می‌کنند. در سلول‌های توموری، اشتباه در همانندسازی DNA، اغلب باعث ایجاد نسخه‌های چندگانه ژن بر روی یک



▲ **شکل ۱۶ـ۱۸(شکل‌رنگی) گیرنده‌های خانواده HER و لیگاندهای آنها.** انسان‌ها چهار گیرنده‌ی تیروزین به نامهای HER1,2,3,4 رابیان می‌کنند که به فاکتور رشد اپیدرمی و اعضاء دیگر خانواده‌ی EGF متصل می‌شوند. (a) همانطور که نشان داده شده است، پروتئین‌های HER به گونه‌ای متفاوت به EGF، HB EGF، TGF-α و NRG1,2 متصل می‌شوند. نکته اینکه HER2 به طور مستقیم به لیگاند متصل نمی‌شود و بر روی سطح غشاء پلاسمایی در وضعیت پیش فعال وجود دارد. (b) HER1 متصل به لیگاند قادر به تشکیل هومودیمر متصل به هم به وسیله قطعات لوپی است (قلاب‌های قرمز). (به طور مشروح در شکل ۱۶ـ۱۷ آمده است). HER2 با HER1,2,3 متصل به لیگاند هترودیمر تشکیل می‌دهد و پیام‌رسانی را با تمامی اعضاء خانواده‌ی EGF تسهیل می‌کند. HER3 فاقد دُمین کیناز فعال است و فقط قادر به پیام‌رسانی به صورت کمپلکس با HER2 است.



▶ **شکل ۱۶ـ۱۹ فراخوانی پروتئین‌های انتقال پیام داخل سلولی به غشاء سلول توسط اتصال به ریشه‌های فسفوتیروزین در گیرنده‌ها و یا پروتئین‌های متصل به گیرنده‌ها.** پروتئین‌های سیتوزولی با دُمین‌های SH2 یا PTB قادر به اتصال ریشه‌های فسفوتیروزین ویژه در RTKهای فعال یا گیرنده‌های سیتوکینی هستند. در برخی موارد، پروتئین‌های انتقال پیام، توسط فعالیت تیروزین کینازی ذاتی گیرنده‌ها و یا به وسیله پروتئین تیروزین کینازی متصل به آنها فسفریله می‌شوند و فعالیت‌شان تشدید می‌شود. RTKها و گیرنده‌های سیتوکین‌ها از پروتئین‌های چند لنگری مانند IRS-1 برای افزایش تعداد پروتئین‌های پیام‌رسان استفاده می‌کنند که جذب و فعال می‌شوند. فسفریلاسیون متعاقب IRS-1 متصل به گیرنده توسط فعالیت کینازی گیرنده، جایگاه‌های لنگراندازی اضافی برای پروتئین‌های پیام‌رسان دارای SH2 ایجاد می‌کند.

کروموزوم منفرد می‌شود (تغییری که با عنوان تشدید ژنی نامیده می‌شود) (فصل ۲۵). تشدید ژن HER2 تقریباً در ۲۵ درصد بیماران با سرطان سینه رخ می‌دهد و این موجب افزایش بیان پروتئین HER2 در سلول‌های توموری می‌شود. بیماران با سرطان سینه با بیان بیش از حد HER2 دارای پیش آگهی حادتر (مانند بقاء کوتاهتر) در مقایسه با بیماران بدون این ناهنجاری هستند. همانطور که در شکل ۱۸ـ۱۶ تأکید شده، بیان بیش از حدHER2 سلول‌های توموری را ایجاد می‌کند که به تحریک رشد توسط سطح پایین هر عضوی از فاکتورهای رشد خانواده EGF حساس هستند، سطوحی که تکثیر سلول‌ها را با سطح طبیعی HER2 تحریک نخواهد کرد. کشف نقش بیان افزایشی HER2 در سرطان سینه محققان را به ایجاد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی برای پروتئین HER2 رهنمون کرد. اثرات درمانی آن برای بیماران سرطان سینه با بیان افزایشی HER2 اثبات شده است (کاهش عود بیماری تا حدود ۵۰ درصد در این بیماران).

دُمین‌های محافظت شده برای اتصال پروتئین‌های انتقال پیام به‌گیرنده‌های فعال، مهم هستند

همانند پیام‌رسانی توسط گیرنده‌های سیتوکینی، ریشه‌های ویژه فسفوتیروزین در گیرنده‌های تیروزین کیناز فعال، به عنوان جایگاه‌های لنگراندازی برای پروتئین‌های لازم در پایین دست انتقال پیام عمل می‌کنند. این ریشه‌های فسفوتیروزین به دُمین‌های PTB علاوه بر دُمین‌های SH2 متصل می‌شوند که در بحث مربوط به مسیر JAK/STAT با آنها روبه رو شدیم (شکل ۱۲ـ۱۶ را ملاحظه کنید). هر دو این دمین‌ها در گروه بزرگی از پروتئین‌های انتقال پیام حضور دارند که با RTKهای فعال و گیرنده‌های سیتوکینی به سمت عوامل پایین دست مسیرهای انتقال پیام جفت می‌شوند. برخی از پروتئین‌های انتقال پیام وقتی که به یک گیرنده فعال شده اتصال می‌یابند، توسط کینازهای متصل به گیرنده‌ها به منظور کسب شکل فعال‌شان فسفریله می‌شوند. بسیاری از آنزیم‌هایی که در مسیرهای انتقال پیام فعالیت دارند، در سیتوزول سلول‌های تحریک نشده قرار دارند. اتصال به گیرنده فعال شده موجب استمرار این آنزیم‌ها در نزدیکی سوبسترایشان می‌شود که در غشاء پلاسمایی قرار گرفته‌اند. سپس سوبسترای تغییر کرده، مسیر انتقال پیام پایین دست را آغاز می‌کند. تعدادی از گیرنده‌های سیتوکینی (از قبیل گیرنده IL-4) و RTKها (از قبیل گیرنده انسولین) به پروتئین‌های چندلنگری[1] مانند IRS-1، از طریق دُمین PTB در پروتئین لنگری متصل می‌شوند (شکل ۱۹ـ۱۶). سپس گیرنده فعال شده، پروتئین لنگری متصل شده را فسفریله می‌کند و این عمل بسیاری از فسفوتیروزین‌ها را تشکیل می‌دهد که به نوبه‌خود به‌عنوان جایگاه‌های لنگراندازی برای پروتئین‌های پیام‌رسان حاوی SH2 عمل می‌نمایند. برخی از این پروتئین‌ها به نوبه خود ممکن است که همچنین به وسیله گیرنده‌های فعال شده فسفریله شوند.

همانطور که پیش از این اشاره شد، هر دُمین SH2 به توالی جداگانه‌ای از اسیدهای‌آمینه اطراف ریشه فسفوتیروزین متصل می‌شوند. توالی اسیدآمینه‌ای منحصر به فرد هر یک از دُمین‌های SH2 تعیین می‌کند که کدام توالی اسیدآمینه‌ای حاوی فسفوتیروزین به آن متصل خواهد شد. این ویژگی نقش مهمی را در تعیین اینکه کدام پروتئین انتقال پیام به کدام گیرنده‌ها متصل می‌شود باز می‌کند. برای مثال دُمین SH2 تیروزین کیناز Src به شدت هر پپتید حاوی توالی هسته‌ای چهار اسیدآمینه، به این چهار اسیدآمینه ضروری متصل می‌شود (فسفوتیروزین - گلوتامیک اسید - گلوتامیک اسید - ایزولوسین) (شکل ۱۱-۱۶ را ملاحظه کنید) و تماس عمیقی را با جایگاه اتصال پپتید در دُمین SH2 مربوط به src برقرار می‌کنند. اتصال با دخول دو شاخه (فسفوتیروزین و زنجیره‌های جانبی ایزولوسین زنجیره پپتیدی) به دو حفره در دُمین SH_2 شباهت دارد. دو گلوتامیک اسید با سطح دُمین SH2 بین پیوند فسفوتیروزین و پیوند هیدروفوبیک که ریشه ایزولوسین را می‌پذیرند، تناسب دارد. اتصال اختصاصی دُمین‌های SH2 عمدتاً توسط ریشه‌های C-ترمینال به سمت فسفوتیروزین در پپتید هدف تعیین می‌شود. در مقابل، اتصال اختصاصی دُمین‌های PTB توسط ریشه‌های ویژه در سمت N-ترمینال ریشه فسفوتیروزین تعیین می‌شود. گاهی اوقات دُمین PTB به پپتید هدف حتی در صورتی که تیروزین فسفریله نباشد، متصل می‌شود.

تنظیم کاهشی پیام‌رسانی RTK توسط آندوسیتوز و تجزیه لیزوزومی رخ می‌دهد

پیش از این تعدادی از شیوه‌های کنترل مسیرهای انتقال پیام را مشاهده کردیم. پروتئین‌های داخل سلولی از قبیل Ski و SOSC به طور منفی مسیر انتقال پیام مربوط به آنها را بعد از القاء بیانشان به وسیله TGFβ یا سیتوکین‌ها، تنظیم می‌کنند. فسفریلاسیون

1- Multidocking proteins

گیرنده‌ها و پروتئین‌های پیام‌رسان پایین دست با کنترل دقیق عملکرد فسفاتازها وارونه می‌شود. در اینجا دو مکانیسم مرتبط را بحث می‌کنیم که به وسیله آنها پیام‌رسانی RTK مهار می‌شود. آندوسیتوز القاء شده با لیگاند در کمپلکس‌های گیرنده - لیگاند سطحی و به علاوه هدایت گیرنده یا لیگاند جذب شده به طرف لیزوزوم برای تجزیه. بنابراین تیمار سلول‌ها با لیگاند برای چند ساعت، تعداد گیرنده‌های قابل دسترس سطح سلول را کاهش می‌دهد چنانکه به آن غلظت هورمون پاسخ بیشتری داده نخواهد شد. این امر فعالیت نامناسب و طولانی گیرنده را مهار می‌کند، اما تحت این شرایط سلول‌ها معمولاً در صورتی که سطح هورمون بیش از این افزایش یابد، پاسخ خواهند داد.

برای مثال در فقدان فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) گیرنده‌های سطح سلول HER1 برای این لیگاند طول عمر نسبتاً طولانی دارند (با نیمه عمر ۱۰ تا ۱۵ ساعت). در مقیاس بزرگ این امر وجود دارد چون که گیرنده‌های اتصال نیافته به لیگاند، توسط حفره‌هایی با پوشش کلاترین به داخل آندوزوم با سرعت نسبتاً کم جذب می‌شوند (با میانگین یک گیرنده در هر ۳۰ دقیقه) و مجدداً فوراً به غشاء پلاسمایی برمی‌گردند. پس از اتصال یک لیگاند EGF، سرعت آندوسیتوز HER1 تقریباً ۱۰ برابر افزایش می‌یابد و فقط در حدود نیمی از گیرنده‌های جذب شده بسته به نوع سلول به غشاء پلاسمایی باز می‌گردند. (باقی گیرنده‌ها در لیزوزوم تجزیه می‌شوند). از این رو، هر بار که کمپلکس HER1-EGF جذب می‌شود (از طریق فرایندی تحت عنوان آندوسیتوز با وابسته گیرنده[1])، این گیرنده حدودا ۵۰ درصد شانس تجزیه شدن دارد (شکل ۲۹-۱۴ را ملاحظه کنید). در معرض قرار دادن چند ساعتی سلول فیبروبلاست با EGF چندین دور آندوسیتوز را القاء می‌کند و این امر باعث تجزیه اکثر مولکول‌های گیرنده سطح سلول او لذا کاهش حساسیت سلول به EGF می‌شود. در این روش، تیمار مداوم با EGF، سلول را به آن سطح از هورمون غیرحساس می‌کند، با وجود این در صورتی که سطح EGF بیش از پیش افزایش یابد، سلول ممکن است پاسخ دهد.

اشکال جهش یافته HER1 که فاقد فعالیت کینازی هستند، متحمل افزایش آندوسیتوز در حضور لیگاند نمی‌شوند. که احتمالاً بدین دلیل است که فعال‌سازی القاء شده با لیگاند فعالیت کینازی در HER1 طبیعی، تغییر ساختمان فضایی در دُم سیتوزولی آن را القاء می‌کند که موتیف تفکیک‌کننده‌ای را ظاهر می‌کند که جذب گیرنده را به داخل حفره‌های با پوشش کلاترینی و دخول متعاقب کمپلکس گیرنده - لیگاند را تسهیل می‌کند. علی رغم مطالعه گسترده بر روی دُمین‌های سیتوزولی شکل جهش یافته HER1، هویت این موتیف‌های تفکیک‌کننده مورد بحث و تفاوت نظر است و به احتمال زیاد چندین موتیف برای تشدید آندوسیتوز فعالیت می‌کنند. جالب است که گیرنده‌های جذب شده قادر به ادامه پیام‌رسانی از آندوزوم‌ها یا بخش‌های داخل سلولی دیگر قبل از تجزیه شدنشان هستند. این امر با اتصال گیرنده‌ها به پروتئین‌های پیام‌رسان از قبیل Grb-2 و Sos به اثبات رسیده است (در بخش بعدی بحث شده است). بعد از ورود برخی از گیرنده‌های سطح سلولی (مانند گیرنده کلسترول LDL) به طور مؤثری به سطح برگشت می‌کنند (شکل ۲۹-۱۴ را ملاحظه کنید). در مقابل، بخشی از گیرنده‌های HER1 فعال که در داخل لیزوزوم جدا می‌شوند، می‌توانند از ۲۰ تا ۸۰ درصد در انواع سلول‌های مختلف، اختلاف داشته باشند. ارتباط قوی بین مونویوبیکوئیتینه شدن دُمین سیتوزولی HER_1 به وسیله c-Cbl (یک یوبیکوئیتین لیگاز E3) و تجزیه HER1 وجود دارد. (شکل ۲۸-۳ را ملاحظه کنید). c-Cbl حاوی دُمین اتصال به EGFR (که به طور مستقیم به گیرنده EGF فسفریله شده متصل می‌شود) و دُمین انگشت RING است (که آنزیم‌های یوبیکوئیتینه کننده را جذب و انتقال یوبیکوئیتین را به گیرنده وساطت می‌کند). یوبیکوئیتین به صورت برچسب بر روی گیرنده فعالیت می‌کند که الحاق آن را از آندوزوم به داخل اجسام چند وزیکولی تحریک می‌کند (شکل ۳۳-۱۴ را ملاحظه کنید) و سرانجام در داخل لیزوزوم‌ها تجزیه می‌شوند. نقش c-Cbl در عبور و مرور گیرنده EGF از مطالعات ژنتیکی در نماتود الگانس حاصل شد که مشخص کرد که c-Cbl به طور منفی گیرنده EGF را در این نماتود تنظیم می‌کند (احتمالاً با القاء تجزیه آن). به همین ترتیب از کار انداختن c-Cbl در موش‌ها، تکثیر بالای سلول‌های اپی‌تلیال غدد پستانی را نشان می‌دهد که این با نقش c-Cbl به عنوان تنظیم‌گر منفی مربوط به پیام رسانی EGF سازگار است.

آزمایشات با رده‌های سلولی جهش یافته نشان می‌دهد که جذب RTKها، نقش مهمی را در تنظیم پاسخ سلولی به EGF و فاکتورهای رشد دیگر ایفاء می‌کند. برای مثال، جهش در گیرنده EGF (HER1) که از الحاق آن به داخل حفره‌های پوشش‌دار جلوگیری می‌کند، آن را به آندوسیتوز با واسطه‌ی گیرنده (القاء شده با لیگاند) مقاوم می‌کند. بنابراین، این جهش اساساً منجر به افزایش

1- Receptor - mediated endocytosis

تعداد بیش از حد طبیعی گیرنده EGF بر روی سلول‌ها می‌شود و لذا حساسیت سلول‌ها را به EGF به عنوان پیام میتوژنی افزایش می‌دهد. این سلول‌های جهش یافته مستعد به تغییر[1] القاء شده با EGF به سلول‌های توموری هستند. جالب است که خانواده‌های دیگر گیرنده EGF (HER2، HER3 و HER4) متحمل جذب القاء شده با لیگاند نمی‌شوند. (مشاهده‌ای که تأئید می‌کند که چگونه هر گیرنده تکامل یافته در روش مخصوص به خودش تنظیم می‌شود).

نکات کلیدی بخش ۳-۱۶

گیرنده‌های تیروزین کینازی

■ گیرنده‌های تیروزین کینازی (RTKها) که به هورمون‌های پپتیدی و پروتئینی متصل می‌شوند، ممکن است بصورت دیمر موجود باشند یا در طی اتصال به لیگاند دیمر شوند. اتصال لیگاند تشکیل گیرنده‌های دیمری عملکردی و فسفریلاسیون لبه فعال‌سازی را در پروتئین تیروزین کینازهای ذاتی شروع می‌کند و فعالیت کاتالیتیکی آنها را افزایش دهد (شکل ۱۶-۱۶ را ملاحظه کنید). گیرنده فعال شده ریشه‌های تیروزینی را در دُمین سیتوپلاسمی گیرنده و همچنین در سوبستراهای پروتئینی دیگر فسفریله می‌کند.

■ انسان‌ها چهار RTK را بیان می‌کنند که به اعضای مختلفی از خانواده فاکتور رشد اپیدرمی از مولکولهای پیام‌رسان متصل می‌شوند (شکل ۱۸-۱۶ را ملاحظه کنید). یکی از این گیرنده‌ها، HER2 به لیگاند متصل نمی‌شود؛ آن تشکیل یک هترودیمر فعال با مونومرهای متصل به لیگاند سه پروتئین HER می‌دهند. بیان زیاد HER2 در حدود ۲۵ درصد از سرطان‌های سینه نقش دارد.

■ توالی‌های پپتیدی کوتاه دارای ریشه‌های فسفوتیروزین که به دُمین‌های SH2 و PTB متصل می‌شوند در بسیاری از پروتئین‌های انتقال دهنده پیام یافت می‌شوند. چنین میانکنش‌های پروتئین - پروتئین در بسیاری از مسیرهای پیام رسانی مهم هستند.

■ آندوسیتوز کمپلکس‌های گیرنده هورمون و تجزیه آنها در لیزوزومها روش اساسی کاهش تعداد گیرنده‌های تیروزین کینازی و گیرنده‌های سیتوکینی از سطح سلول لذا کاهش حساسیت سلول‌ها به بسیاری از هورمون‌های پپتیدی است.

۱۶-۴ فعال‌سازی مسیرهای Ras و MAP کیناز

تقریباً همه گیرنده‌های تیروزین کیناز قادر به فعال کردن مسیر MAP کیناز/ Ras هستند (شکل ۲-۱۶، قسمت c را ملاحظه کنید). پروتیئن Ras[2] یک G-پروتئین مونومر و کوچک متعلق به ابرخانواده GTPase[3] از پروتئین‌های سویچ داخل سلولی است (شکل ۸-۱۵ را ملاحظه کنید). Ras فعال با تشکیل کمپلکس‌های انتقال پیام دارای سه پروتئین کیناز با فعالیت ترتیبی در غشاء شروع می‌کند. این آبشار کینازی[4] به فعال‌سازی اعضاء بخصوصی از خانواده MAP کیناز[5] منتهی می‌شود که اینها قادر به نقل مکان به داخل هسته و فسفریله کردن بسیاری از پروتئین‌های مختلف هستند. در میان پروتئین‌های هدف مربوط به MAP کینازها، فاکتورهای رونویسی قرار دارند که بیان پروتئین‌های مؤثر در چرخه سلولی و تمایز را تنظیم می‌کنند. بسیاری از گیرنده‌های سیتوکینی نیز می‌توانند مسیر Ras/MAP کیناز را فعال کنند. (شکل ۲-۱۶ قسمت b را ملاحظه کنید). علاوه بر این، انواع مختلف پیام‌های خارج سلولی مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی را فعال می‌کنند که سبب فعال‌سازی اعضاء مختلف خانواده MAP کیناز می‌شود. به دلیل اینکه جهش‌های فعال‌کننده RTK، RAS یا پروتئین‌های موجود در آبشار MAP کیناز تقریباً در تمامی انواع تومورهای انسانی یافت می‌شوند، مسیر MAP کیناز/RTK/Ras مورد مطالعه زیاد قرار دارد و اطلاعات زیادی در مورد عوامل این مسیر به دست آمده است. ما بحث خودمان را با مرور بر شیوه گردش Ras بین دو وضعیت فعال و غیرفعال آغاز می‌کنیم. سپس شیوه فعال شدن Ras و عبور پیام به مسیر MAP کیناز را شرح می‌دهیم. سرانجام مطالعات اخیر را که نشان می‌دهد هم مخمر و هم سلول‌های یوکاریوت‌های عالی‌تر دارای مسیرهای MAP کیناز متعدد هستند را بررسی می‌کنیم و علاوه بر این شیوه‌هایی را که سلول‌ها مسیر MAP کیناز را جدا از یکدیگر با واسطه‌ی استفاده از پروتئین‌های اسکافولد مورد بررسی قرار می‌دهیم.

Ras (یک پروتئین سویچ GTPase) بین حالات فعال و غیرفعال گردش می‌کند

همانند زیرواحدهای G_α در G-پروتئین‌های سه زیرواحدی، Ras به طور متناوب بین وضعیت فعال (متصل به GTP) و وضعیت

1- Transformation
2- Ras protein
3- GTPase superfamily
4- Kinase Cascade
5- Map Kinase

غیرفعال (متصل به GDP) تغییر می‌کند. همانطور که در فصل ۱۵ بحث شد، G-پروتئین‌های سه زیرواحدی به طور مستقیم با گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها (GPCRs) در سطح سلول متصل می‌شوند و پیام‌ها را معمولاً از طریق زیرواحد G_α به اثرگرهای گوناگون از قبیل آدنیلیل سیکلاز متصل می‌کنند. در مقابل، Ras به طور مستقیم با گیرنده‌های سطح سلول ارتباط برقرار نمی‌کند. فعالیت پروتئین Ras توسط چندین فاکتور تنظیم می‌شود. فعال‌سازی Ras توسط فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین (GEF) تشدید می‌شود که به کمپلکس Ras.GDP متصل شده و موجب تفکیک GDP می‌شود. (شکل ۳۲ـ۳ را ملاحظه کنید).

به دلیل وجود غلظت بالاتر GTP نسبت به GDP، به طور خود به خود GTP به مولکول‌های خالی Ras متصل می‌شود (با صرف نظر از GEF و تشکیل کمپلکس فعال Ras.GTP). هیدرولیز متعاقب GTP متصل شده به GDP موجب غیرفعال شدن Ras می‌شود. متفاوت با غیرفعال شدن Ras.GTP، غیرفعال شدن Ras.GTP نیازمند کمک پروتئین دیگری با نام GAP[1] است. اتصال GAP به Ras.GTP فعالیت ذاتی GTPase مربوط به Ras را بیش از ۱۰۰ بر افزایش می‌دهد.

لذا طول مدت اتصال GTP به Ras تقریباً یک دقیقه است، که این بسیار بلندتر از میانگین طول عمر کمپلکس G_α.GTP است. در سلول‌ها، GAP به فسفوتیروزین‌های ویژه‌ای در RTKهای فعال شده متصل شده و این امر آن را به اندازه کافی نزدیک Ras.GTP متصل به غشاء قرار می‌دهد، تا اثر تشدیدکننده آن را بر روی هیدرولیز GTP به کار اندازد. هیدرولیز واقعی GTP به وسیله اسیدهای‌آمینه هم Ras و هم GAP کاتالیز می‌شود. به ویژه اینکه، الحاق زنجیره جانبی آرژینین بر روی GAP به داخل جایگاه فعال Ras، یک حد واسط را در واکنش هیدرولیز تثبیت می‌کند. Ras (تقریباً ۱۷۰ اسیدآمینه) کوچکتر از پروتئین G_α (تقریباً ۳۰۰ اسیدآمینه) است، اما دمین‌های اتصال به GTP مربوط به این پروتئین دارای ساختار مشابهی است. (شکل ۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید). مطالعات بیوشیمیایی و ساختاری نشان می‌دهد که G_α نیز حاوی دمین GAP است که سرعت هیدرولیز GTP را به وسیله G_α افزایش می‌دهد. به دلیل اینکه این دمین در Ras حضور ندارد، به طور ذاتی سرعت هیدرولیز GTP آن کندتر است.

پروتئین Ras در پستانداران به طور کامل مطالعه شده است، به دلیل اینکه پروتئین‌های Ras جهش یافته با بسیاری از سرطان‌های انسانی همراه هستند. این پروتئین‌های جهش یافته (که متصل می‌شوند ولیکن قادر به هیدرولیز GTP نیستند) دائماً در وضعیت روشن (on) بوده و در تغییر انکوژنیک شرکت می‌کنند (فصل ۲۵). تعیین ساختار سه بعدی کمپلکس Ras-GAP بررسی اشکال جهش یافته Ras، مشاهدات گیج‌کننده‌ای را در مورد اکثر انکوژنیک‌ها توضیح داد. (پروتیئن دائماً فعال Ras) (Ras D دارای جهش در موقعیت ۱۲ است). جایگزینی گلیسین - ۱۲ طبیعی با هر اسیدآمینه (به استثنای پرولین) اتصال عملکردی GAP را از کار انداخته و Ras را در وضعیت فعال متصل به GTP قفل می‌کند.

گیرنده‌های تیروزین کیناز توسط پروتئین‌های آداپتور با Ras ارتباط برقرار می‌کند

نخستین نشانه عملکرد مشترک Ras و گیرنده‌های تیروزین کینازی در یک مسیر پیام‌رسانی از آزمایشاتی به دست آمد که سلول‌های فیبروبلاست کشت شده توسط تیمار با مخلوطی از دو هورمون پروتئینی PDGF[2] و EGF[3] تحریک به تکثیر می‌شوند. میکروانجکشن (ریزتزریقی) آنتی‌بادی ضد Ras به داخل این سلول‌ها تکثیر سلولی را بلوکه کرد. برعکس، تزریق RasD (پروتئین جهش یافته دائماً فعال که در هیدرولیز GTP بسیار ناتوان است و لذا در وضعیت فعال باقی می‌ماند) موجب تکثیر این سلول‌ها در نبود فاکتورهای رشد شد. این یافته‌ها سازگار هستند با مطالعاتی که نشان می‌دهند، اضافه کردن FGF به سلول‌های فیبروبلاستی منجر به افزایش فوری در نسبت Ras موجود در شکل فعال متصل به GTP می‌شود.

ولیکن، RTK فعال شده (مانند گیرنده EGF متصل به لیگاند) نمی‌تواند به طور مستقیم Ras را فعال کند. به بیانی دیگر، دو پروتئین سیتوزولیک (GRB2 و Sos) باید ابتدا فراخوانده شوند تا ارتباط بین گیرنده و Ras مهیا شود (شکل ۲۰ـ۱۶). دُمین SH2 در GRB2 به ریشه فسفوتیروزین ویژه‌ای در گیرنده فعال نامبرده متصل می‌شود. GRB2 همچنین دارای دو دُمین SH3 است که به پروتیئن Sos متصل و آن را فعال می‌کند. بنابراین GRB2 در نقش GEF (پروتئین تبادل نوکلئوتید گوانین) عمل می‌کند و تبدیل Ras غیرفعال متصل به GDP را به شکل فعال متصل به GTP کاتالیز می‌کند.

1- GTPase activating protein

2- Platelet - derived growth factor

3- Epidermal growth factor

مطالعات ژنتیکی در دروزوفیلا، پروتئین‌های کلیدی انتقال پیام را در مسیر MAP کیناز /Ras شناسایی کرد

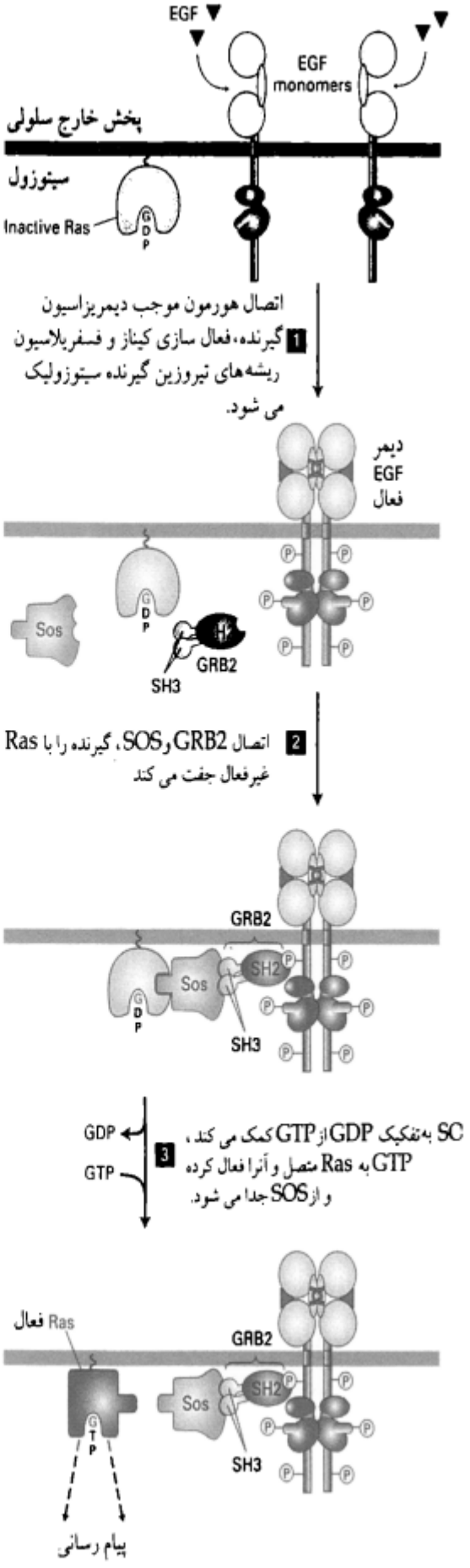
دانش ما از پروتئین‌های درگیر در مسیر MAP کیناز /Ras در اصل از آنالیزهای ژنتیکی مگس سترن (دروزوفیلا) جهش و کرم‌ها (C.elegans) به دست آمده است که در مرحله ویژه‌ای از تمایز بلوکه می‌شوند. به منظور نشان دادن توانایی این روشهای آزمایشگاهی، تکوین نوع بخصوصی از سلول را در چشم مرکب دروزوفیلا بررسی می‌کنیم. چشم مرکب مگس مذکور تشکیل شده از تقریباً ۸۰۰ چشم منفرد که اُوماتیریا[1] نامیده می‌شوند (شکل ۲۱ـ۱۶ قسمت a). هر اُوماتیریا از ۲۲ سلول تشکیل می‌شود (۸ تا از آنها نورون‌های حساس به نور با نام رِتینولا[2] (سولهای R) و R_1-R_8 نامگذاری می‌شوند (شکل ۲۱ـ۱۶ قسمت b). یک RTK تحت عنوان (Sev)[3] به طور اختصاصی تکوین سلول R7 را تنظیم می‌کند، مضاف بر اینکه برای هیچ فعالیت شناخته شده دیگری الزامی نیست. در مگس‌های همراه با ژن sev جهش یافته، سلول R_7 در هر یک از اُماتیدیوم[4] شکل نمی‌گیرد. به دلیل این که گیرنده‌های نوری در مگس‌ها برای دید در نور UV لازم است، جهش یافته‌هایی که فاقد سلول‌های R7 عملکردی بوده ولیکن از جهات دیگر طبیعی هستند به راحتی جدا می‌شوند. از این رو سلول‌های R7 مگس سیستم مطلوب ژنتیکی برای مطالعه تکوین سلول محسوب می‌شوند. در خلال تکوین هر اُماتیدیوم، پروتئینی تحت نام Boss[5] بر روی سطح سلول‌های RB بیان می‌شود. این پروتئین متصل به غشاء، لیگاندی برای sev-RTK بر روی سطح پیش ساز R7 مجاور آن است و بدین ترتیب پیام‌رسان تکوین برای نورون‌های حساس به نور است (شکل ۲۲ـ۱۶ قسمت a). در مگس‌های جهش یافته‌ی که پروتئین Boss عملکردی یا Sev-RTK را بیان نمی‌کنند. برهمکنش بین پروتئین‌های Boss و Sev نمی‌تواند رخ دهد و علاوه بر این هیچ سلول R7 ایجاد نمی‌شود (شکل ۲۲ـ۱۶ قسمت b). این منشا نامگذاری sevenless برای RTK در R7 است.

به منظور شناسایی کردن پروتئین‌های انتقال دهنده پیام‌های داخل سلولی در مسیر Sev-RTK محققان، مگس‌های جهش یافته بیان‌کننده پروتئین Sev حساس به دما تولید کردند. وقتی که این مگس‌ها در دمای مجاز نگهداری می‌شدند، تمامی اُماتیدیای آنها حاوی سلول‌های R7 شدند، اما وقتی که در دمای غیر مجاز نگهداری شدند، هیچ یک R7 را ایجاد نکردند. با این حال، در دمای حد واسط ویژه‌ای، فقط تعداد کافی Rev-RTK برای وساطت ایجاد R7 طبیعی، واجد عملکرد شدند.

محققان دلیل آوردند که در این دمای بینابینی، مسیر پیام‌رسانی، غیرمؤثر خواهد شد (و لذا هیچ سلول R7 ایجاد نخواهد شد) در صورتی که سطح پروتئین‌های لازم دیگر در مسیر کاهش یابد و فعالیت کلی مسیر پایین‌تر از سطح موردنیاز برای تشکیل سلول R7 خواهد رفت. جهش مغلوب مؤثر بر این پروتئین همین اثر را خواهد داشت (در موجودات دیپلوئید مانند دروزوفیلا)، چون هتروزیگوت حاوی یک آلل وحشی و یک الل موتان از یک ژن می‌باشد، نصف میزان طبیعی محصول ژن را ایجاد می‌کند، از این رو، حتی در صورتی که این جهش مغلوب در یک ژن ضروری اتفاق بیافتد، موجود معمولاً زنده باقی خواهد ماند. با این حال، مگس حامل جهش حساس به دما در ژن sev و جهش دوم تأثیرگذار بر پروتئین دیگر در مسیر پیام‌رسانی انتظار به نبود سلول R7 در این دمای حد واسط خواهد رفت. با کاربرد این غربالگری، محققان ۳ ژن رمزکننده پروتئین‌های مهم را در مسیر sev شناسایی کردند: پروتئین دارای دمین SH2 با ۶۴ درصد همسانی از نظر توالی اسیدآمینه‌ای با GRB2 انسانی، فاکتور تبادل نوکلوئید گوانین با نام Sos[6] با ۵۴ درصد همسانی توالی با همتای موش آن، و پروتئین Ras با ۸۰ درصد همسانی با همتای پستانداری آن (شکل ۲۰ـ۱۶ را ملاحظه کنید). بعدها مشخص شد که این سه پروتئین در مسیرهای پیام‌رسانی دیگر آغاز شده با اتصال لیگاند به RTKهای مختلف فعالیت می‌کنند و در زمان و مکان‌های متفاوت در مگس در حال تکوین عمل می‌کنند.

در مطالعات بعدی، محققان ژن جهش یافته ras^D را به جنین مگس حامل sevenless جهش یافته وارد کردند. همان طور که قبلاً اشاره شد، ژن ras^D پروتئین Ras ساختاری را رمزگذاری می‌کند که حتی در نبود پیام هورمونی در شکل فعال متصل به GTP وجود دارد. به رغم آنکه هیچ Sev-RTK عملکردی در این جهش یافته‌های دوجانبه ($Sev;ras^D$) بیان نشد، اما سلول‌های R_7 به طور طبیعی تشکیل شدند، که این امر نشان دهنده حضور پروتئین Ras فعال و کافی برای القاء ایجاد سلول R7 است (شکل ۲۲ـ۱۶ قسمت c). این یافته، با نتایج مربوط به فیبروبلاست‌های کشت شده که قبلاً شرح داده شد سازگار است این نتایج را که فعال‌سازی Ras، مرحله اصلی در پیام‌رسانی داخل سلولی به وسیله اکثر (اگرنه همه) RTKها است را تأیید می‌کند.

1- Ommatidia
2- Retinula
3- Sevenless
4- Ommatidium
5- Birde of sevenless
6- Son of sevenless



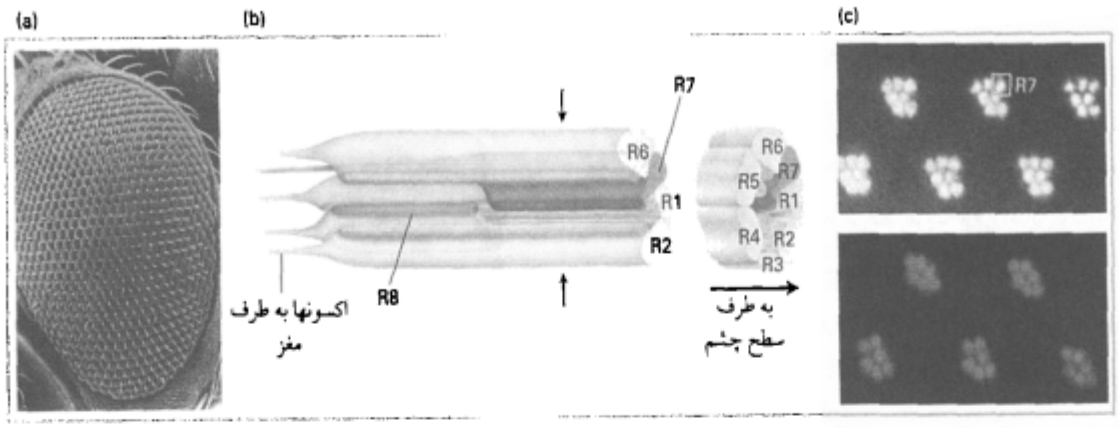
شکل ۲۰ـ۱۶ فعال‌سازی Ras به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTKs). گیرنده مربوط به فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و بسیاری از فاکتورهای رشد دیگر، RTK_s هستند. پروتئین آداپتور سیتوزولیک GRB2 به فسفوتیروزین‌های ویژه در گیرنده متصل به لیگاند فعال، متصل می‌شود و علاوه بر این به پروتئین سیتوزولیک Sos متصل شده و آن را نزدیک سوبسترایش قرار می‌دهد (Ras-GDP غیرفعال) سپس فعالیت GEF مربوط به Sos، به تشکیل Ras.GTP کمک می‌کند. نکته اینکه Ras به وسیله لنگر آبگریز فارنسیل به غشاء متصل می‌شود. (شکل ۱۹ـ۱۰ را ملاحظه کنید).

اتصال پروتئین Sos به Ras غیرفعال موجب تغییر کنفورماسیون و فعال شدن آن می‌شود

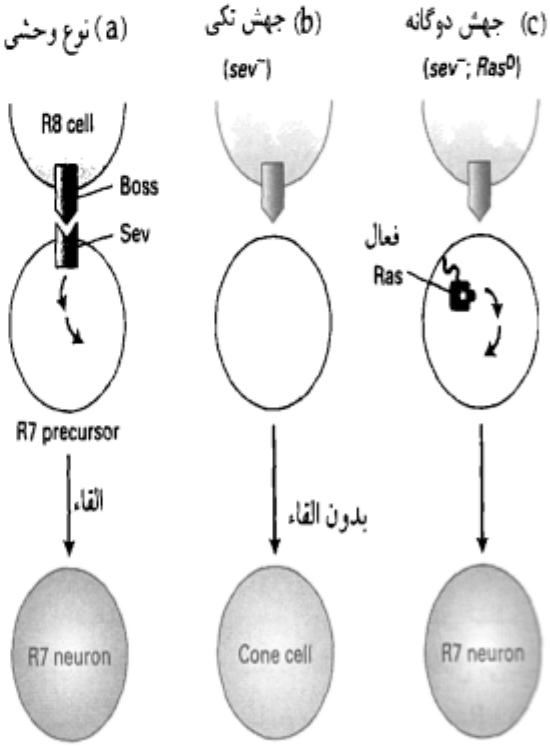
علاوه بر دُمین SH2 که به RTKهای فعال متصل می‌شود، پروتئین سازش دهنده (آداپتور) GRB2، دارای دو دُمین SH3 است که به Sos (فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین در Ras) متصل می‌شود. (شکل ۲۰ـ۱۶ را ملاحظه کنید). همانند دمین‌های اتصال به فسفوتیروزین SH2 و PTB، دُمین‌های SH3 در شمار زیادی از پروتئین‌های درگیر در پیام‌رسانی درون سلولی حضور دارند. علی‌رغم آنکه ساختار سه بعدی دُمین‌های SH3 گوناگون مشابه است، توالی‌های اسیدآمینه‌ای اختصاصی‌شان متفاوت است.

دمین‌های SH3 در GRB2 به طور انتخابی به توالی‌های غنی از پرولین در Sos متصل می‌شوند. دُمین‌های SH3 مختلف در پروتئین‌های دیگر به توالی‌های غنی از پرولین، متمایز از توالی موجود در Sos متصل می‌شوند.

ریشه‌ای پرولین دو نقش را در میانکنش بین دمین SH_3، در پروتئین سازش‌دهنده (آداپتور) (مانند GRB2) و توالی غنی از پرولین در پروتئین دیگر (مانند Sos) ایفاء می‌کنند. نخست اینکه، توالی غنی از پرولین مذکور، ساختمان فضایی گسترده به خود می‌گیرد که تماس‌های وسیع را با دُمین SH2 امکان‌پذیر می‌سازد و بدین وسیله میانکنش را تسهیل می‌نماید. دوم اینکه زیرمجموعه‌ای از این پرولین‌ها در داخل مناطق اتصالی بر روی‌سطح دُمین SH3 جاگیری می‌کنند (شکل ۲۳ـ۱۶). تعدادی از ریشه‌های غیرپرولینی همچنین با دُمین SH3 میانکنش کرده و مسئول تعیین ویژگی اتصال هستند. از این رو، اتصال پروتئین‌ها به دُمین‌های SH3 و SH2، استراتژی مشابه را دنبال می‌کند: ریشه‌های معین، موتیف ساختاری کلی را برای اتصال فراهم می‌کنند و ریشه‌های مجاور ویژگی به اتصال را اعطاء می‌کنند.



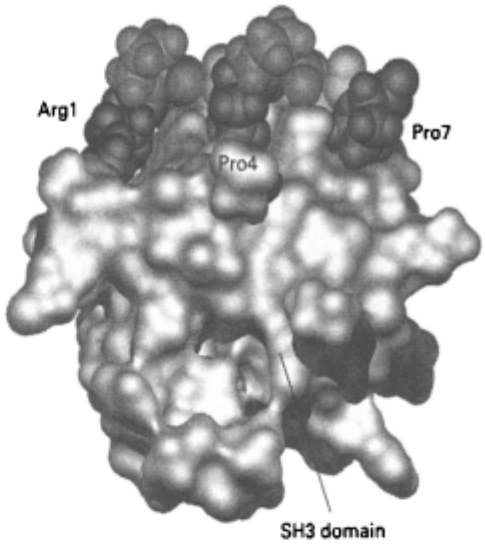
▲ **شکل ۲۱ـ۱۶ (شکل رنگی) چشم مرکب دروزوفیلا ملانوگاستر.** (a) اسکن با میکروسکوپ الکترونی نشان دهندهٔ اُماتیدیای منفرد که چشم مگس میوه را به وجود می‌آورد. (b) نماهای طولی و برشی از یک اُماتیدیای هر یک از این ساختارهای لوله‌ای دارای ۸ گیرنده نوری (R1-R8 نامیده می‌شوند) که سلول‌های طویل، استوانه‌ای شکل و حساس به نور هستند. R1-R6 (زرد) در سرتاسر عمق شبکیه گسترش دارند، در حالی که R7 (قهوه‌ای)، به‌طرف سطح چشم و R8 (آبی) به سوی انتها مکان حضور اکسون قرار گرفته‌اند. (c) مقایسه چشم‌های نوع وحشی و جهش یافته sevenless در مگس به وسیله تکنیک‌های ویژه حضور گیرنده‌های نوری را در اُماتیدیوم نشان داد. صفحه برش‌گیری شده توسط پیکانهای آبی در (b) نشان داده شده‌اند و سلول R8 خارج از صفحه این تصاویر است. هفت گیرنده نوری در این صفحه به راحتی در اُماتیدیای نوع وحشی (سمت بالا) دیده می‌شود، در صورتیکه فقط شش عدد در اُماتیدیای جهش یافته قابل مشاهده است (سمت پایین). مگس‌هایی با sevenless جهش یافته فاقد سلول R7 در چشمانشان هستند.



◀ **شکل تجربی ۲۲ـ۱۶ مطالعات ژنتیکی آشکار کرد که فعال‌سازی Ras، ایجاد گیرنده‌های نوری R7 را در چشم دروزوفیلا القاء می‌کند** (a) در خلال تکوین لارو مگس‌ها نوع وحشی، در سلول R8 در هراُماتیدیوم در حال ایجاد پروتئین سطح سلول با عنوان Boss بیان می‌شود که به sev-RTK بر روی سطح سلول پیش‌ساز R7 مجاورشان متصل می‌شوند. این برهمکنش تغییرات را در بیان ژن القاء می‌کند که سبب تمایز سلول پیش ساز به نورون R7 واجد عملکرد می‌شود. (b) جنین مگس با جهش در ژن sev (sevenless) سلول‌های پیش ساز R7، قادر به اتصال به Boss نیستند و لذا به طور نرمال به سلول‌های R7 تمایز پیدا نمی‌کنند. به بیانی دقیق‌تر، سلول پیش ساز وارد مسیر تکوین دیگری می‌شود و سرانجام یک کلون سلولی تشکیل می‌دهد. (c) لارو با جهش دوگانه ($sev;Ras^D$)، Ras دائماً فعال (Ras^D) را در سلول پیش ساز R7 بیان می‌کند که این تمایز سلول‌های پیش ساز R7 را در نبود پیام با واسطه‌ی Boss القاء می‌نماید.

این یافته نشان می‌دهد که Ras فعال شده برای وساطت القاء یک سلول R7 کافی است.

به دنبال فعال‌سازی RTK (از قبیل sevenless یا گیرنده EGF)، کمپلکسی حاوی گیرنده فعال شده GRB2 و Sos بر روی سطح سیتوزولیک غشاء پلاسمایی تشکیل می‌شود (شکل ۲۰ـ۱۶ را



▲ **شکل ۲۳ـ۱۶ (شکل رنگی) مدل سطحی از یک دُمین SH3 متصل به پپتید هدف.** به طور مختصر، پپتید هدف غنی از پرولین به صورت مدل فضا پرکن نشان داده شده است. در این پپتید هدف، دو پرولین (Pro4 و Pro7) داخل مناطق اتصال بر روی سطح دُمین SH3 جای گرفته‌اند. میانکنش‌های درگیرکننده آرژینین (Arg_1 قرمز)، دو پرولین دیگر (آبی رنگ) و ریشه‌های دیگر در این پپتید هدف (سبز) ویژگی اتصال را تعیین می‌کنند.

ملاحظه کنید). تشکیل کمپلکس بستگی به توانایی RB2 برای اتصال توأم به گیرنده و Sos دارد. از این رو فعال‌سازی گیرنده منجر به جایگیری مجدد Sos از سیتوزول به غشاء می‌شود و این Sos را به سوبسترایش (Ras.GDP متصل به غشاء) نزدیک می‌کند. اتصال Sos به Ras-GDP منجر به تغییرات ساختمان فضایی در قطعات سویچ I و II مربوط به Sos شده و بدین وسیله منطقه اتصال برای GDP به منظور انتشار آن به خارج باز می‌شود (شکل ۲۴ـ۱۶). سپس GTP به Ras متصل و آن را فعال می‌کند. اتصال GTP به Ras به نوبه خود، ساختمان فضایی ویژه‌ای را در سویچ I و II القاء می‌کند که اجازه می‌دهد Ras.GTP نخستین پروتئین کیناز پایین دست مسیر MAP کیناز را فعال کند.

عبور پیام‌ها از Ras فعال به سمت آبشار پروتئین کینازها

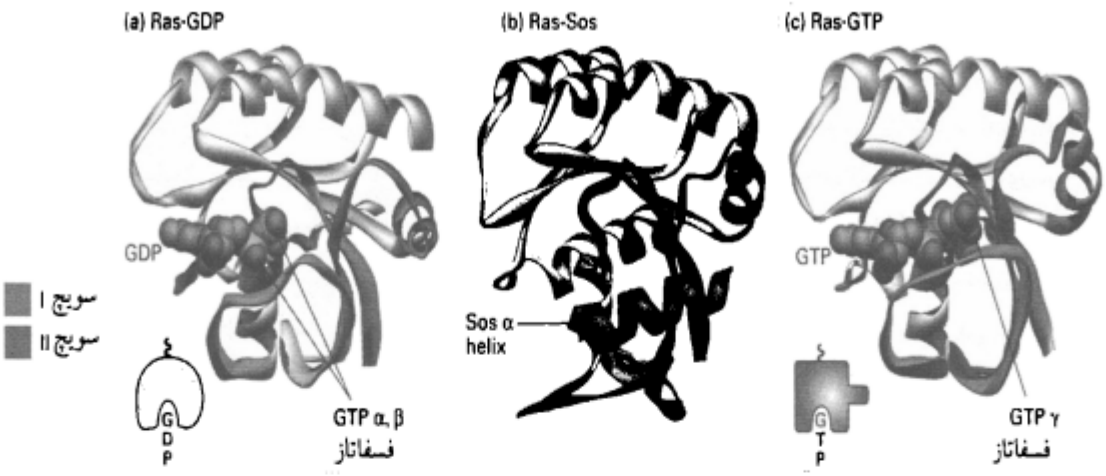
مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی در مخمر، کرم الگانس، دروزوفیلا و پستانداران، یک آبشار فوق‌العاده محافظت شده از پروتئین کینازها را آشکار نموده است (منتهی به MAP کیناز) که پایین دست Ras فعال عمل می‌کنند. اگرچه فعال‌سازی این آبشار کینازی، نتایج همسان بیولوژیکی را در تمامی سلول‌ها نمی‌دهد، مجموعه‌ای مشترک از عمل کینازی زنجیره‌وار، مسیر MAP کینازی را توصیف می‌کند (همانطور که طرح کلی آن در شکل ۲۵ـ۱۶ آورده شده است). Ras.GTP فعال، به دُمین تنظیمی موجود در N-ترمینال Raf (یک سرین/ ترئونین کیناز) متصل شده و بدین وسیله آن را فعال می‌کند (مرحله ❷). هیدرولیز Ras-GTP به Ras.GDP، Raf فعال را رها می‌کند (مرحله ❸)، که این MEK را فسفریله و فعال می‌کند (مرحله ❹) (MEK یک پروتئین کیناز با دو خصوصیت است که پروتئین‌های هدفش را در هم سرین و هم ترئونین فسفریله می‌کند). MEK فعال، سپس MAP کیناز را فسفریله می‌کند (MAP کیناز یک سرین ترئونین کیناز دیگر است که ERK نیز نامیده می‌شود) (مرحله ❺). MAP کیناز، بسیاری از پروتئین‌های مختلف مانند فاکتورهای رونویسی موجود در هسته را فسفریله می‌کند و بدین وسیله پاسخهای سلولی را وساطت می‌نماید (مرحله ❻).

تعدادی از آزمایشات نشان داده است که Raf، MEK و MAP کیناز، پایین دست Ras قرار می‌گیرند و مضاف بر این ترتیب زنجیره‌وار این پروتئین‌ها را در مسیر یاد شده آشکار کرده‌اند. برای مثال، پروتئین Raf جهش یافته که دُمین تنظیمی N-ترمینال خود را از دست داده، به طور دائم فعال است و سلول‌های کشت شده در حالت غیرفعال را به تکثیر در فقدان تحریک به وسیله فاکتورهای رشد القاء می‌کند. این پروتئین‌های Raf جهش یافته، در ابتدا در سلول‌های توموری شناسایی شدند (همانند پروتئین دائماً فعال RasD). تصور می‌شود که پروتئین‌های Raf جهش یافته توسط انکوژن‌ها[1] رمزدهی می‌شوند (انکوژن‌ها به تغییر شکل سلول‌های بیان‌کننده‌شان کمک می‌نمایند).

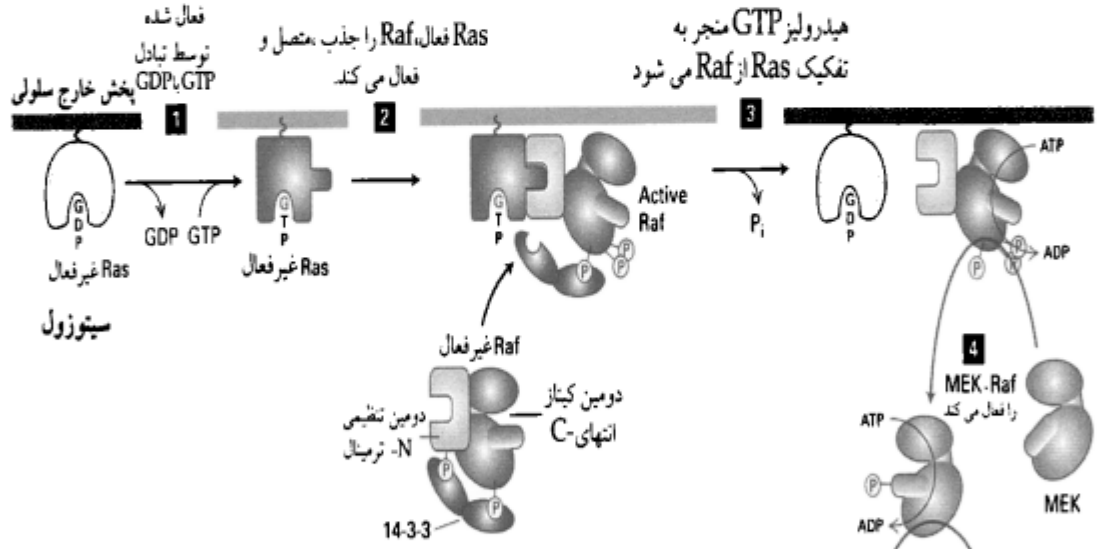
برعکس سلول‌های کشت شده پستانداران که یک جهش یافته را بیان می‌کنند، پروتئین Raf غیرعملکردی قادر به تحریک تکثیر غیرقابل کنترل به وسیله پروتئین دائماً فعال RasD نیست. این یافته یک ارتباط بین پروتئین‌های Ras و Raf را اثبات کرد. مطالعات بیشتر اتصال در *In Vitro* نشان داد که کمپلکس Ras.GTP خالص شده به طور مستقیم به دمین تنظیمی N-ترمینال Ras متصل و عملکرد کاتالیتیکی آن را فعال می‌کند.

اینکه MAP کیناز در پاسخ به فعال شدن Ras فعال می‌شود، در سلول‌های کشت شده خاموش بیان‌کننده پروتئین دائماً فعال Ras^D نشان داده شد. در این سلول‌ها MAP کیناز فعال در نبود تحریک به وسیله هورمون‌های تحریک‌کننده رشدایجاد

1- Oncogenes



▲ **شکل ۲۴-۱۶ ساختار Ras متصل به GDP، پروتئین Sos و GTP.** (a) در کمپلکس Ras.GTP قطعات، سویچ I و II به طور مستقیم با GDP میانکنش نمی‌دهند. (b) یک مارپیچ آلفای موجود در Sos به هر دو ناحیه سویچ Ras.GDP متصل و منجر به تغییر ساختمان فضایی عظیم در Ras می‌شود. در نتیجه Sos، فاکتور Ras را توسط تغییر مکان ناحیه سویچ I متحمل به باز شدن می‌کند و بدین وسیله امکان انتشار GDP را به خارج فراهم می‌کند. (c) تصور می‌شود که در ابتدا GTP از طریق بازش (گوانین) به کمپلکس Ras.Sos متصل می‌شود و اتصال بعدی GTP فسفاتاز این میانکنش را تکمیل می‌کند. تغییر ساختمان فضایی حاصله در قطعات سویچ I و II مربوط به Ras، به انرگرش (بعداً بحث می‌شود) کمک می‌کند. شکل ۸-۱۵ مربوط به تصویر دیگر Ras.GDP و Ras.GTP را ملاحظه کنید.



▲ **شکل ۲۵-۱۶ مسیر Ras/MAPkinase.** در سلول‌های تحریک شده، اکثراً Ras در شکل غیرفعال و متصل به GDP است. اتصال لیگاند به RTK آن یا گیرنده سیتوکین، منجر به تشکیل کمپلکس فعال Ras.GTP می‌شود. (مرحله ❶ شکل ۲۰-۱۶ را نیز ملاحظه کنید). Ras فعال، آبشار کینازی پایین دست نشان داده شده در مراحل ❷ و ❻ را آغاز می‌کند، و به فعال شدن MAP کیناز (MAPK) منتهی می‌شود. در سلول‌های تحریک نشده اتصال پروتئین ۳-۳-۱۴ به Raf، آن را در ساختمان فضایی غیرفعال تثبیت می‌کند. میانکنش دُمین تنظیمی N-ترمینال Raf با Ras.GTP، این مهار را برطرف می‌کند و باعث دِفسفریلاسیون یکی از سرین‌های متصل‌کننده Raf به ۳-۳-۱۴ و منجر به فعال‌سازی فعالیت کینازی Raf می‌شود. نکته اینکه، برعکس بسیاری از کینازهای دیگر، فعال‌سازی Raf به فسفریلاسیون لبه فعال‌سازی بستگی ندارد. پس از تفکیک Ras.GDP غیرفعال از Raf، احتمالاً می‌تواند به وسیله پیام از گیرنده‌های فعال مجدداً فعال شود، و بدین وسیله مولکول‌های Raf دیگری را به غشاء جذب می‌کند. برای جزئیات به متن رجوع کنید.

می‌شود. نکته جالب توجه اینکه گیرنده‌های نوری R7 به طور طبیعی در چشم در حال تکوین دروزوفیلای جهش یافته به وجود آمدند که فاقد پروتئین Ras یا Raf عملکردی بودند ولیکن MAP کیناز دائماً فعال را بیان می‌کردند. این یافته نشان می‌دهد که فعال‌سازی MAP کیناز برای انتقال طبیعی پیام تکثیر یا تمایز آغاز شده با اتصال لیگاند به گیرنده تیروزین کیناز مانند sevenless کافی است (شکل ۲۲ـ۱۶ را ملاحظه کنید). با این حال، مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که Raf نمی‌تواند به طور مستقیم MAP کیناز را فسفریله و یا اینکه به طریقی دیگر فعالیت آن را فعال کند. ارتباط پایانی در آبشار کینازی فعال شده توسط Ras.GTP از مطالعاتی بدست آمد که دانشمندان عصاره سلول‌های محیط کشت را در حین تحقیق برای فعالیت کینازی بخش بخش کردند که قادر به فسفریله کردن MAP کیناز بودند و فقط در سلول‌های تحریک شده با فاکتور رشد (نه سلول‌های خاموش) حضور دارند. این کار منجر به شناسایی MEK (کینازی که به طور اختصاصی یک ترئونین و یک تیروزین در روی لبه فعال‌سازی MAP کیناز را فسفریله می‌کند و بدین وسیله عملکرد کاتالیتیکی آن را فعال می‌کند) شد (واژه MEK از MAP و ERK آمده است). مطالعات بعدی نشان داد که MEK به دُمین کاتالیکتیک C- ترمینال Raf متصل شده و توسط فعالیت سرین / ترئونین کینازی Raf، فسفریله می‌شود. این فسفریلاسیون، فعالیت کاتالیتیکی MEK را فعال می‌کند. از این رو، فعال شدن Ras، یک آبشار کینازی را القاء می‌کند که شامل Raf، MEK و MAP کیناز است:

RTK→Ras→Raf→MEK→MAPKinase فعال

فعال‌سازی Raf کیناز. مکانیسم مربوط به فعال‌سازی Raf متفاوت از مکانیسم مورد استفاده‌ی بسیاری از پروتئین کینازهای دیگر از جمله MEK و MAP کیناز است. در سلول در حال استراحت و پیش از تحریک، Raf در سیتوزول در کونفورماسیونی قرار دارد که دُمین تنظیمی N-ترمینال آن با اتصال به دُمین کینازی مهار می‌شود. این ساختمان فضایی غیرفعال به وسیله پروتئین دیمر ۳ـ۳ـ۱۴ تثبیت می‌شود، که به ریشه‌های فسفوسرین در تعدادی از پروتئین‌های پیامرسان مهم متصل می‌شود. هر ۳ـ۳ـ۱۴ مونومر به یک ریشه فسفوسرین در Raf متصل می‌شود (یکی به فسفوسرین ۲۵۹ در دُمین N-ترمینال و دیگری به فسفوسرین ۶۲۱، شکل ۲۵ـ۱۶ را ملاحظه کنید). تصور می‌شود این میانکنش‌ها برای اینکه RaF حالت ساختاری به خود بگیرد و بتواند به Ras فعال شده متصل شود، ضروری است.

اتصال Ras.GTP (که به غشاء لنگراندازی می‌کند) به دمین N-ترمینال Raf، مهار فعالیت کینازی آن را از بین می‌برد و همچنین تغییر ساختمان فضایی را در Raf القاء می‌کند که اتصالش با ۳ـ۳ـ۱۴ را از بین می‌برد. سپس فسفوتیروزین ۲۵۹ در Raf، دِفسفریله می‌شود (به وسیله یک فسفاتاز ناشناخته) و ریشه‌های سرین و یا ترئونین دیگری بر روی Raf توسط کینازهای دیگر فسفریله می‌شوند. این واکنش‌ها به طور فزاینده‌ای فعالیت کینازی Raf را با مکانیسم‌هایی که کاملاً درک نشده‌اند افزایش می‌دهند.

فعال‌سازی MAP کیناز مطالعات بیوشیمیایی و کریستالوگرافی اشعه x، تصویری مشروح از شیوه فعال‌سازی MAP با فسفریلاسیون را فراهم کرده است. همانند JAK کینازها و گیرنده‌های تیروزین کیناز، جایگاه کاتالیتیک در شکل غیرفسفریله و غیرفعال MAP کیناز به وسیله قطعه‌ای از اسیدهای‌آمینه (لبه فعال‌سازی) بلوکه می‌شود. (شکل ۲۶ـ۱۶ قسمت a). اتصال MEK به MAP کیناز، ساختار لبه مذکور را بی ثبات می‌کند و موجب در معرض قرار دادن تیروزین ۱۸۶ می‌شود که این تیروزین در ساختمان فضایی غیرفعال، پنهان می‌شود. پس از فسفریلاسیون این تیروزین مهم، MEK، ترئونین مجاور (ترئونین ۱۸۳) آن را فسفریله می‌کند (شکل ۲۶ـ۱۶ قسمت b). هم تیروزین فسفریله و هم ترئونین فسفریله در MAP کیناز، با اسیدهای‌آمینه دیگر میانکنش می‌کنند و بدین وسیله موجب تغییر ساختمان فضایی لبه فعال‌سازی شده که این به نوبه خود امکان اتصال ATP به جایگاه کاتالیتیک آن را فراهم می‌کند. ریشه فسفوتیروزین (pY185) نیز نقش کلیدی را در اتصال سوبسترای پروتئینی ویژه به سطح MAP کیناز ایفاء می‌کند. فسفریلاسیون علاوه بر فعالیت کاتالیتیکی MAP کیناز به دیمریزاسیون آن نیز کمک می‌کند. شکل دیمر MAP کیناز (نه شکل مونومر آن) قادر به نقل مکان به هسته است که فعالیت بسیاری از فاکتورهای رونویسی هسته‌ای را تنظیم می‌کند.

MAP کیناز، فعالیت بسیاری از فاکتورهای رونویسی کنترل‌کننده ژن‌های پاسخ اولیه را تنظیم می‌کند

اضافه شدن فاکتور رشد (از قبیل EGF یا PDGF) به سلول‌های کشت شده خاموش موجب افزایش فوری بیان حدوداً ۱۰۰ ژن مختلف می‌شود. اینها به دلیل اینکه قبل از وارد شدن سلول‌ها به مرحله S و همانندسازی DNA القاء می‌شوند **ژن‌های پاسخ**

اولیه[1] نامیده می‌شود.. (فصل ۲۰ را ملاحظه کنید). یک ژن پاسخ اولیه مهم، فاکتور رونویسی با نام c-Fos راکدگذاری می‌کند. c-Fos به همراه فاکتورهای رونویسی دیگر (مانند c-Jun) بیان بسیاری از ژن‌های رمزدهنده لازم برای سلول‌ها به منظور پیشرفت چرخه سلولی را القاء می‌کند. اکثر RTKها که به فاکتورهای رونویسی متصل می‌شوند، مسیر MAP کیناز را برای فعال کردن ژن‌های رمزدهی پروتئین‌هایی نظیر c-Fos استفاده می‌کند که به نوبه خود آن سلول را به سمت چرخه سلولی سوق می‌دهد.

تشدیدکننده‌ای که ژن c-Fos را تنظیم می‌کند حاوی عنصر پاسخ به سرم (SRE) است (نامگذاری آن به خاطر این است که توسط بسیاری از فاکتورهای رشد موجود در سرم فعال می‌شود). این تشدیدکننده کمپلکس حاوی توالی‌های DNA است که به فاکتورهای رونویسی متعددی متصل می‌شود. برخی از اینها توسط MAP کیناز فعال می‌شوند و برخی دیگر به وسیله پروتئین کینازهای مختلف که در مسیرهای پیام‌رسانی دیگر فعالیت دارند، فعال می‌شوند. همانطور که در شکل ۱۶-۲۷ نشان داده شد، MAP کیناز دیمر فعال شده (فسفریله) رونویسی از ژن c-Fos را با فعال‌سازی مستقیم یک فاکتور رونویسی (TCF) و علاوه بر این فعال‌سازی مستقیم فاکتور دیگر (SRF) القاء می‌کند.

در سیتوزول، MAP کیناز، کینازی به نام $p90^{RSK}$ را فسفریله و فعال می‌کند که بعد از آن به هسته نقل مکان کرده و سرین ویژه‌ای را در SRF فسفریله می‌کند. بعد از نقل مکان MAP کیناز به هسته، به طور مستقیم سرین ویژه‌ای را در TCF فسفریله می‌کند. اتصال TCF فسفریله با دو ملکول SRF فسفریله، یک فاکتور تریمر فعال را تشکیل می‌دهد و به طور محکم به توالی DNA در SRE متصل می‌شود. همانطور که در مورد این مدل ثابت شده است بیان فراوان TCF جهش یافته غالب منفی در سلول‌های کشت شده پستانداران که فاقد ریشه‌های سرین فسفریله شده به وسیله‌ی MAP کیناز هستند، توانایی MAP کیناز را برای فعال کردن بیان ژن توسط تشدیدکننده SRE بلوکه می‌کند. از این گذشته، مطالعات بیوشیمیایی به طور مستقیم نشان داد که فسفریلاسیون SRE توسط $p90^{RSK}$ سرعت و تمایل اتصالش به توالی SRE در DNA را افزایش می‌دهد (دلیلی برای افزایش در فراوانی آغاز رونویسی). از این رو هر دو فاکتور رونویسی برای حداکثر تحریک القاء شده با فاکتور رشد بیان ژن از طریق مسیر MAP کیناز نیاز هستند، اگرچه فقط TCF به طور مستقیم توسط MAP کیناز فعال می‌شود.

▲ **شکل ۱۶-۲۶ ساختارهای غیرفعال و غیرفسفریله MAP کیناز و شکل فعال و فسفریله شده آن.** (a) در MAP کیناز غیرفعال، لبه فعال‌سازی کاملاً در معرض نمی‌باشد. (b) فسفریلاسیون توسط MEK در تیروزین ۱۸۵ (Y-185) و ترئونین ۱۸۳ (T-183) منجر به تغییر ساختمان فضایی آشکار در لبه فعال‌سازی می‌شود. این تغییر فعال‌کننده به دیمریزاسیون MAP کیناز و اتصال سوبستراهایش (ATP و پروتئین‌های هدفش) کمک می‌کند. یک مکانیسم مشابه وابسته به فسفریلاسیون، JAK کینازها، فعالیت کینازی ذاتی RTKها و MEK را فعال می‌کند.

گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها، پیامها را به سمت MAP کیناز در مسیرهای آمیزش مخمر انتقال می‌دهند

به رغم آنکه بسیاری از مسیرهای MAP کیناز با RTKها یا گیرنده‌های سیتوکینی آغاز می‌شوند، پیام‌رسانی از گیرنده‌های دیگر می‌تواند MAP کینازها را در انواع مختلف سلول‌های یوکاریوت‌های پیشرفته فعال کند. علاوه بر این، مخمرها و یوکاریوت‌های تک سلولی دیگر، که فاقد گیرنده سیتوکین و یا RTK_s هستند، دارای مسیرهای MAP کیناز متعدد هستند. برای روشن شدن آن، مسیر آمیزش را در ساکارومایسس سرویزیه بررسی می‌کنیم. (مثال به خوبی مطالعه شده مسیر MAP کیناز مربوط به گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین (GPCRها) است). در این مورد برای دو فورمون پپتیدی ترشحی با نام فاکتورهای a و α اشاره می‌کنیم.

همانطور که در فصل ۲۱ شرح داده شد، این فورمون‌ها، آمیزش

1- Early - response - genes

بین سلول‌های هاپلوئید مخمر مربوط به نوع مخالف آمیزشی را کنترل می‌کند(α یا a). سلول هاپلوئید a، فاکتور آمیزش a را ترشح می‌کند که دارای گیرنده‌های سطح سلولی برای فاکتور α است و سلول α فاکتور α را ترشح می‌کند و گیرنده‌های سطحی برای فاکتور a دارد (شکل ۱۹ـ۲۱ را ملاحظه کنید). از این رو، هر نوع سلولی، فاکتور آمیزش تولید شده توسط نوع مقابل را شناسایی می‌کند. فعال‌سازی مسیر MAP کیناز به وسیله گیرنده‌های α یا a، رونویسی از ژن‌های مهارکننده پیشرفت چرخه سلولی و ژن‌هایی که سلول‌های با نوع آمیزش مقابل را قادر به ادغام با یکدیگر و احتمالاً تشکیل سلول دیپلوئید را القاء می‌کند. اتصال لیگاند به هر یک از GPCRها فورمون مخمر به تبادل GDP به GTP در زیرواحد G_α و تفکیک G_α.GTP از کمپلکس $G_{\beta\gamma}$ کمک می‌کند.

این فرآیند فعال‌سازی با آنچه که برای GPCRها در فصل قبلی بحث شد، یکسان است. (شکل ۱۳ـ۱۵ را ملاحظه کنید). در بسیاری از مسیرهای آغاز شده با GPCR در پستانداران، G_α فعال، پیام را منتقل می‌کند. در مقابل، مطالعات نشان داده است که کمپکلس تفکیک شده $G_{\beta\gamma}$ تمامی پاسخ‌های فیزیولوژیکی القاء شده توسط فعال شدن گیرنده فورمون در مخمر را وساطت می‌کند. برای مثال، در سلول‌های مخمر فاقد زیرواحد G_α، زیر واحد $G_{\beta\gamma}$ همیشه آزاد است. این سلول‌ها قادر به آمیزش در نبود فاکتورهای آمیزشی هستند، به عبارت دیگر پاسخ آمیزشی دائماً روشن است. ولیکن، در سلول‌های واجد زیر واحد G_β یا G_γ ناقص، مسیر آمیزشی نمی‌تواند القاء شود. اگر زیرواحد G_α تفکیک شده انتقال دهنده بود، در این سلول‌های جهش یافته انتظار خواهد رفت که این مسیر دائماً فعال باشد.

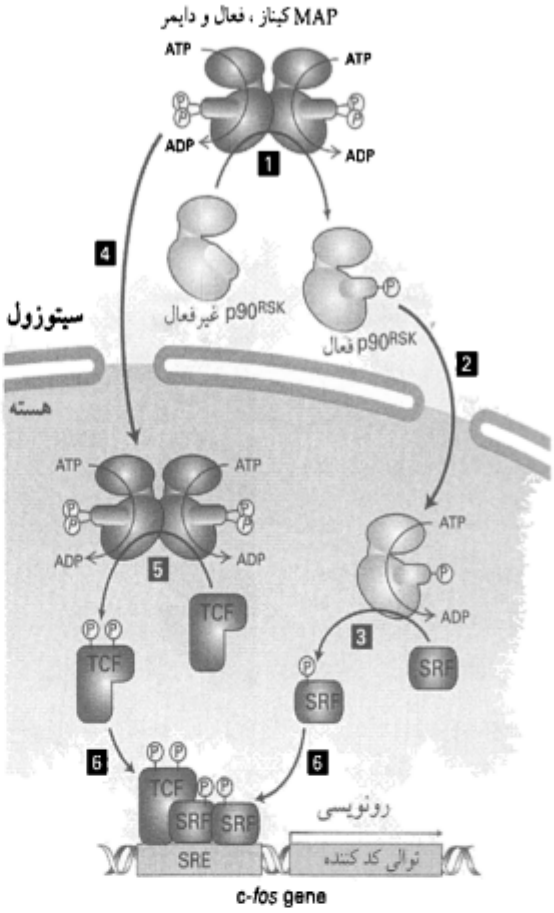
در مسیرهای آمیزشی در مخمر، $G_{\beta\gamma}$ با آغاز یک آبشار کینازی فعالیت می‌کند که مشابه مسیر پایین دست Ras است. عوامل این آبشار عمدتاً از طریق آنالیزهای جهش یافته‌هایی مشخص شدند که دارای گیرنده‌های α و a و G-پروتئین‌های عملکردی ولیکن عقیم بودند (Ste)[1] و یا اینکه در پاسخ‌های آمیزشی نقص داشتند. میانکنش‌های فیزیکی بین این عوامل از طریق آزمایشات رسوبدهی ایمنی با عصاره‌گیری از سلول‌های مخمر و انواع دیگر مطالعات برآورد شد. بر مبنای این مطالعات، دانشمندان آبشار کینازی نشان داده شده در شکل ۲۸ـ۱۶ قسمت a را پیشنهاد کردند. $G_{\beta\gamma}$ آزاد، که از طریق اتصال لیپید به زیرواحد γ به غشاء متصل می‌شود، با اتصال به پروتئین Ste5، آن را جذب و لذا کینازها را به غشاء پلاسمایی متصل می‌کنند. Ste5 فعالیت کاتالیتیکی دقیقی ندارد و به عنوان اسکلت برای تجمع عوامل دیگر در این آبشار عمل می‌نماید (Fus3، Ste7 و Ste11). سپس، پروتئین کیناز Ste20 (یک پروتئین قرار گرفته در غشاء پلاسمائی)، Ste11 (یک سرین/ترئونین کیناز مشابه با Raf و پروتئین‌های MEK دیگر در پستانداران) را فسفریله و فعال می‌کند. سپس Ste11 فعال، Ste7 را فسفریله می‌کند. Ste7 یک MEK با دو ویژگی است که Fus3 (سرین/ ترئونین کیناز معادل با MAP کیناز) را فسفریله و فعال می‌کند. بعد از نقل مکان Fus3 به هسته، دو پروتئین Dig1 و Dig2 را فسفریله می‌کند و مهارشان را از فاکتور رونویسی Ste12 کاهش می‌دهد. Ste12 فعال به نوبه‌ی خود بیان پروتئین‌های لازم در پاسخ‌های سلولی ویژهٔ آمیزش را القاء می‌کند.

پروتئین‌های اسکافلدی مسیرهای متعدد MAP کیناز را در سلول‌های یوکاریوت جدا می‌کند

علاوه بر MAP کینازهای بحث شده در بالا، هم مخمرها و هم سلول‌های یوکاریوت پیشرفته دارای اعضاء دیگر خانواده MAP کیناز هستند. MAP کینازهای پستانداران شامل N-ترمینال Jun کینازها (JNKها) و p38 کینازها می‌باشند که اینها توسط انواع مختلفی از استرس‌ها فعال می‌شوند. تعدادی از اعضاء خانواده MAP کینازهای موجود در مخمر در پایین شرح داده می‌شوند. تمامی اعضاء خانواده MAP کیناز، سرین / ترئونین کیناز هستند که در سیتوزول در پاسخ به پیام‌های خارج سلولی ویژه فعال می‌شوند و سپس به داخل هسته منتقل می‌شوند. فعال‌سازی تمامی MAP کینازهای شناخته شده، نیازمند فسفریلاسیون هر دو ریشه تیروزین و ترئونین در ناحیه لبه فعال‌سازی به وسیله اعضاء خانواده‌ی MEK (از کینازهای دو عملکردی) است. (شکل ۲۶ـ۱۶ را ملاحظه کنید). از این رو در تمامی سلول‌های یوکاریوتیک، اتصال مجموعه وسیعی از مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی، آبشارهای فوق‌العاده محافظت شده کینازی را آغاز می‌کند که به MAP کینازهای ویژه‌ای ختم می‌شود.

مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی کنونی در موش و دروزوفیلا در تعیین لزوم MAP کینازها برای وساطت پاسخ به پیام‌ها در یوکاریوت‌های پیشرفته مورد هدف قرار می‌گیرند. این تا حد زیادی برای موجود ساده‌تر ساکارومایسس انجام شده است. هر یک از شش MAP کیناز رمزدهی شده در ژنوم ساکارومایسس سرویزیه توسط آنالیزهای ژنتیکی برای مسیرهای پیام‌رسانی ویژه آغاز شده توسط

1- Sterile



▲ **شکل ۲۷ـ۱۶. القاء رونویسی ژن توسط MAP کیناز.** مراحل ❶ـ❸: در سیتوزول، MAP کیناز، پروتئین $p90^{RSK}$ کیناز را فسفریله و فعال می‌کند که این نیز به داخل هسته حرکت کرده و فاکتور رونویسی SRF را فسفریله می‌کند. مراحل ❹و❺ : بعد از نقل مکان MAP کیناز به داخل هسته، به طور مستقیم فاکتور رونویسی TCF را فسفریله می‌کند. مرحله ❻: TCF و SRF فسفریله شده به همراه هم رونویسی از ژن‌هایی (مثل c-Fos) که حاوی توالی SRE در پروموتورشان هستند را تحریک می‌کند. متن را برای جزئیات مشاهده نمایید.

پیام‌های خارج سلولی متنوع تعیین شده است (از قبیل فرومون‌ها، فشار اسمزی بالا، گرسنگی، شوک‌های هیپوتونیک و فقدان کربن/ نیتروژن). هر یک از این MAP کینازها، پاسخ‌های سلولی بسیار ویژه را وساطت می‌کنند(همانطور که به وسیله fus3در مسیر آمیزش و Hog1 در مسیر تنظیم فشار اسمزی نشان داده شد) (شکل ۲۸ـ۱۶ را ملاحظه کنید).

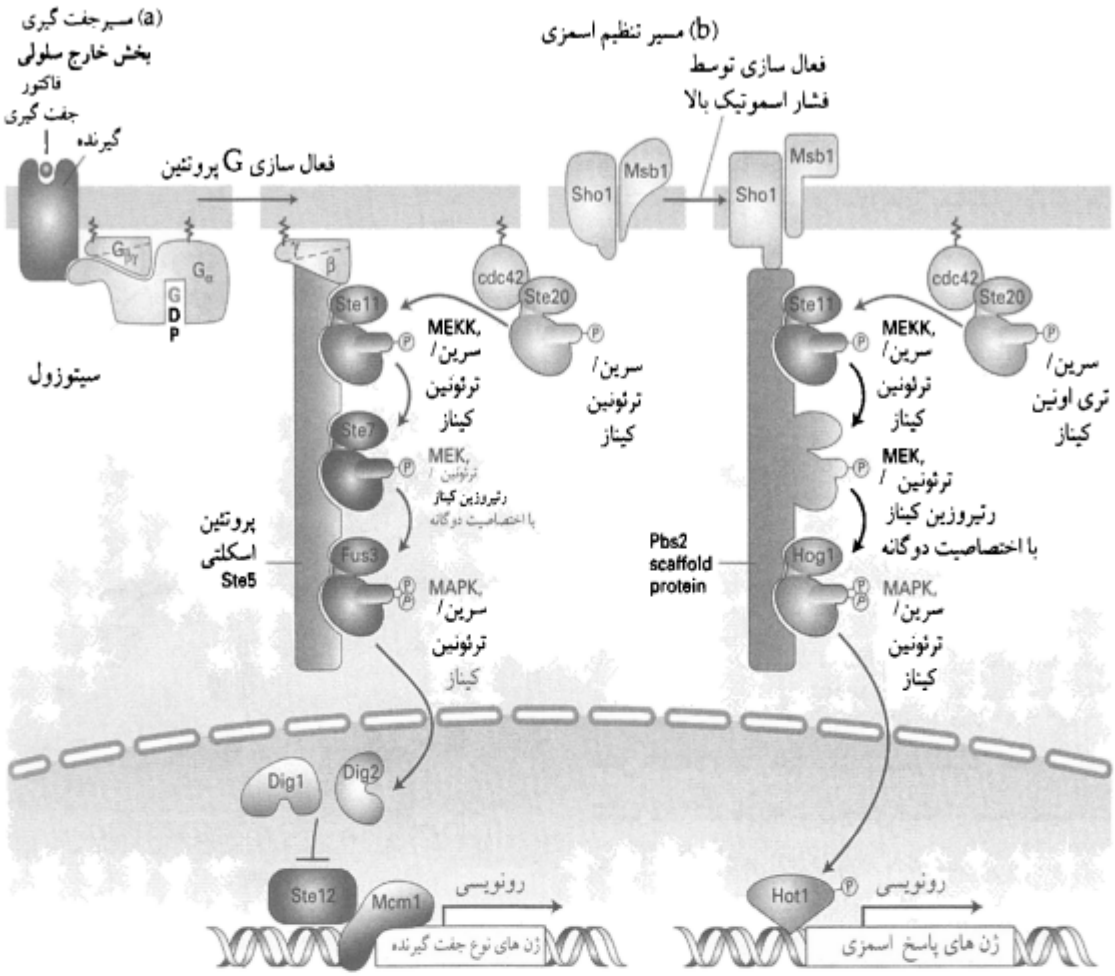
هم در مخمر و هم در سلول‌های پستانداران، آبشارهای مختلف MAP کیناز از نظر برخی از عوامل مشترک هستند. برای مثال، Ste11 در سه مسیر پیام‌رسانی مخمر فعالیت می‌کند که تنظیم آمیزش، پاسخ به شرایط با فشار اسمزی بالا و رشد فیلامنت (با گرسنگی القاء می‌شود) را به عهده دارد. با این حال، هر مسیر با MAP کیناز مختص خودش فعال می‌شود: Fus3 در مسیر آمیزش، Hog1 در مسیر تنظیم فشار اسمزی و Kss1 در مسیر ایجاد فیلامنت، به همین ترتیب در سلول‌های پستانداران پروتئین‌های انتقال‌دهنده پیام بالادست مشترک در فعال کردن JNK کینازهای متعدد شرکت می‌کنند.

هنگامی که عوامل مشترک در میان مسیرهای MAP کیناز مختلف شناسایی شدند، محققان حیرت زده شدند که چگونه اختصاصیت پاسخ‌های سلولی می‌توانند به پیام‌های ویژه حاصل شوند. مطالعات بر روی مخمر، مدارک اولیه‌ای را فراهم کرد که پروتئین‌های اسکلتی (اسکافلدی) ویژه در مسیر[1] کینازهای ناقل پیام را قادر می‌سازند تا در یک مسیر خاص با یکدیگر میانکنش بدهند ولی با کینازهای دیگر در سایر مسیرها میانکنش ندهند. برای مثال، پروتئین اسکلتی Ste5 کمپلکس بزرگی را تثبیت می‌کند که شامل Ste11 و کینازهای دیگر در مسیر آمیزش است. به همین ترتیب Pbs2 به Ste11 و کینازهای دیگر در مسیر تنظیم فشار متصل می‌شود (شکل ۲۸ـ۱۶ را ملاحظه کنید). در هر مسیری که Ste11 شرکت می‌کند، الزاماً در داخل یک کمپلکس بزرگ محدود می‌شود که در پاسخ به پیام خارج سلولی ویژه تشکیل می‌شود، مضاف بر اینکه پیام‌رسانی پایین دست Ste11 به کمپلکسی محدود می‌شود که در آن قرار دارد. لذا در معرض قرارگرفتن سلول‌های مخمر به فاکتورهای آمیزش، فعال‌سازی یک MAP کیناز (Fus3) را القاء می‌کند، در حالی که در معرض قرار گرفتن با فشار اسمزی بالا، فعال‌سازی MAP کیناز متفاوتی (Hog1) را القاء می‌کند.

پروتئین‌های اسکلتی متعلق به مسیر MAP کیناز به خوبی در سلول‌های مخمر، مگس و کرم اثبات شده است، ولیکن حضورشان در سلول‌های پستانداران به سختی اثبات شده است. شاید اثبات عمده‌ترین پروتئین اسکلتی Ksr[2] است که هم به MEK و هم به MAP کیناز متصل می‌شود. نبود هومولوگ Ksr در دروزوفیلا، پیام‌رسانی به وسیله پروتئین Ras دائماً فعال بلوکه می‌شود، که این نقش مثبت Ksr را در مسیر MAP/Ras کیناز در سلول‌های مگس را پیشنهاد می‌کند. به رغم آنکه موش‌های تخریب ژنی فاقد Ksr، از نظر فنوتیپ طبیعی هستند، فعال‌سازی MAP کیناز توسط

1- Pathway - specific scaffold protein

2- Kinase Supressor of Ras



▲ **شکل ۲۸ـ۱۶. آبشارهای MAP کیناز مخمر در مسیرهای آمیزش و تنظیم فشار اسمزی.** در مخمر، گیرنده‌های گوناگون چندین مسیر MAP کیناز را فعال می‌کنند که دو تا از اینها در اینجا به طور خلاصه بیان می‌شوند. (a) مسیر آمیزش گیرنده‌های متعلق به فاکتورهای آمیزشی a و α با G-پروتئین‌هایی ۳ زیرواحدی و یکسان جفت می‌شوند. به دنبال اتصال لیگاند و تفکیک G-پروتئین، زیرواحد $G_{\beta\gamma}$ متصل به غشاء به پروتئین اسکلتی Ste5 را به غشاء پلاسمایی متصل می‌کند. سپس کیناز ساکن غشاء، Ste20، فاکتور Ste_{11} را فسفریله و فعال می‌کند که با Raf و سایر پروتئین کینازهای MEK (MEKK) مشابه است. Ste11 یک آبشار کینازی را آغاز می‌کند که با Fus3 (از نظر عملکرد معادل با MAP کیناز (MAPK) در یوکاریوت‌های پیشرفته) پایان می‌پذیرد. همانند با MAP کینازهای دیگر، Fus_3 فعال سپس به داخل هسته نقل مکان می‌کند. در آنجا دو پروتئین Dig1 و Dig2 را فسفریله و اثر مهاریشان را بر روی فاکتور رونویسی Ste12 می‌کاهد و سبب اتصال آن به DNA و رونویسی از ژن‌های نوع آمیزشی آغاز می‌شود. (b) مسیر تنظیم فشار اسمزی دو پروتئین غشاء پلاسمایی Sho1 و Msb1 به شیوه ناشناخته‌ای با در معرض قرار گرفتن سلول‌های مخمر با محیط کشت با فشار اسمزی بالا فعال می‌شوند. Sho1 فعال پروتئین اسکلتی Pbs2 (دارای دمین MEK) را به غشاء پلاسمایی جذب می‌کند. در غشاء پلاسمایی Set20، ste11 را فسفریله و فعال می‌کند و ste11 یک آبشار کینازی را آغاز می‌کند که سبب فعال شدن Hog1 (یک MAP کیناز) می‌شود. بعد از نقل مکان Hog1 به هسته، فاکتور رونویسی Hot1 را فسفریله می‌کند. Hot1 به رونویسی از ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئینی‌هایی کمک می‌کند که سنتز پروتئین‌های لازم برای بقاء در محیط با فشار اسمزی بالا را کاتالیز می‌کنند.

فاکتورهای رشد یا سیتوکین‌ها کمتر از حالت طبیعی در انواع مختلف سلول‌های این موجود صورت می‌پذیرد. این یافته پیشنهاد می‌کند که Ksr به‌عنوان اسکلت عمل می‌کندکه پیام‌رسانی MAP/Ras کیناز را در سلول‌های پستانداران تشدید می‌نماید ولیکن ضروری نیست. پروتئین‌های دیگری نیز برای اتصال به MAP کینازهای ویژه پستانداران یافت شده‌اند. بنابراین ممکن است که پیام اختصاصی از MAP کینازهای مختلف در سلول‌های موجودات از اتصالشان با پروتئین‌های شبه اسکلت متعدد به وجود آید، ولیکن تحقیقات بسیار

دیگری برای بررسی این احتمال نیاز است.

مسیر MAP/Ras کیناز قادر به القاء پاسخهای سلولی گوناگون است

مسیر MAP/Ras کیناز می‌تواند در بسیاری از سلول‌های مهره داران (البته نه همه) توسط مجموعه وسیعی از گیرنده‌های تیروزین کینازی (RTK) فعال شود. به ویژه پیام‌رسانی از طریق این مسیر مکرراً در روند تکامل استفاده می‌شود، با این همه پیامد آن با توجه به تعیین سرنوشت سلول در بافت‌های متفاوت اختلاف دارد. چرا یک سلول با تقسیم و دیگری تمایز و با وجود این، سلول دیگر با مرگ پاسخ می‌دهد؟ در صورتی که هیچ ویژگی غیر از لیگاند و گیرنده وجود ندارد، Ras فعال ممکن است برای هر پیام جایگزین شود. در واقع، Ras فعال می‌تواند بدین سان در بسیاری از انواع سلول‌ها عمل نماید. برای مثال، در یک مطالعه ریز آرایه DNA از فیبروبلاست، مجموعه یکسانی از ژن‌ها از نظر رونویسی توسط فاکتور رشد PDGF[1] و FGF[2] القاء شدند که این امر پیشنهاد می‌کند که در معرض قرار گرفتن به وسیله هر یک از این دو مولکول‌های پیام‌رسان اثر مشابهی دارد. هر دو گیرنده‌های FGF و PDGF، گیرنده‌های تیروزین کیناز هستند و مضاف بر اینکه اتصال لیگاند به گیرنده به هر یک از این دو گیرنده قادر به فعال کردن Ras است. به رغم آنکه چندین مکانیسم برای ایجاد پاسخ‌های سلولی گوناگون برای یک مولکول پیام‌رسان ویژه شناخته شده است، در اینجا ما بر روی دو مورد متمرکز می‌شویم: ۱ـ قدرت یا مدت زمانی که یک پیام، پاسخ طبیعی را مدیریت می‌کند. ۲ـ مسیرهای داخل سلولی مختلف توسط پاسخ یکسان در انواع مختلف سلول‌ها فعال می‌شوند.

تفاوت در مدت زمان یا قدرت پیام

مدارک حمایت‌کننده کاربرد اولین مکانیسم از مطالعات بر روی سلول‌های PC12 (رده سلولی با توانایی تمایز به بافت چربی یا نورون) بدست آمد. فاکتور رشد NGF[3] به تشکیل نورون‌ها کمک می‌کند، در حالی که EGF[4] به تشکیل بافت چربی کمک می‌کند. تشدید پیام EGF با در معرض قرار گرفتن طولانی مدت موجب تمایز به نورون می‌شود. اگرچه هر دو فاکتور رشد NGF و EGF لیگاندهای RTK هستند ولیکن NGF فعال‌کننده بسیار قوی‌تری نسبت به EGF برای مسیر MAP/Ras کیناز است. ظاهراً گیرنده EGF می‌تواند این مسیر را فقط به دنبال تحریک طولانی مدت فعال کند.

تفاوت‌ها در مسیرهای پایین دست

پیام‌رسانی از طریق مسیرهای ویژه هر نوع سلول و پایین دست RTK در کرم الگانس نشان داده شده است در کرم‌ها، پیام‌های EGF حداقل ۵ پاسخ جداگانه را القاء می‌کنند (هریک در یک نوع سلول متفاوت). ۴ تا از ۵ پاسخ توسط مسیر مشترک MAP/Ras کیناز وساطت می‌شود. پنجمین پاسخ (تخمک‌گذاری موجود هرمافرودیت) یک مسیر پایین دست متفاوت را به کار می‌برد که در آن پیامبر ثانویه IP_3[5] تولید می‌شود. اتصال IP_3 به گیرنده‌اش (کانال کلسیمی دریچه‌دار وابسته به IP_3) در غشاء شبکه آندوپلاسمی منجر به رها شدن Ca^{2+} ذخیره شده از شبکه آندوپلاسمی می‌شود (شکل ۲۰ـ۱۵ را ملاحظه کنید). افزایش Ca^{2+} سیتوزولی موجب تخمک‌گذاری می‌شود. مسیر دیگری را که در آن گیرنده IP_3 در پیام رسانی EGF درگیر می‌شود با غربالگری ژنتیکی کشف شد. (یک مثال خوب از شیوه‌ای که موتاسیون در یک ژن غیرمنتظره می‌تواند منجر به یک یافته شود).

نکات کلیدی بخش ۴-۱۶

فعال‌سازی مسیرهای MAP کیناز و Ras

- Ras یک پروتئین روشن-خاموش شونده GTPase درون سلولی است که در پائین دست اغلب RTKها عمل می‌کند. مانند $G\alpha$، Ras بین حالت متصل به GDP غیرفعال و حالت متصل به GTP در چرخش است. چرخش Ras نیاز به کمک دو پروتئین: یک فاکتور تبادل نوکلئوتیدگوانین (GEF) و یک پروتئین فعال‌ساز GTPase دارد (GAP).
- RTKها به طور غیرمستقیم به Ras از طریق دو پروتئین: GRB2 (یک پروتئین وفق دهنده) و Sos که فعالیت GEF را دارد مرتبط هستند (شکل ۲۰-۱۶ را ملاحظه کنید).
- دُمین SH2 در GRB2 به یک فسفوتیروزین در RTKهای فعال شده متصل می‌شود در حالیکه دُمین SH3 آن به Sos متصل می‌شوند بدان‌جهت Sos را به نزدیکی Ras.GDP متصل به غشاءمی‌آورند و فعالیت تبادل نوکلئوتیدی آن را فعال می‌کنند.

1- Platelet derived growth factor
2- Fibroblast growth factor
3- Nerve growth factor
4- Epidermal growth factor
5- Inositol 1,4,5 - trisphosphate

■ اتصال Sos به Ras غیرفعال باعث یک تغییر ساختاری بزرگ می‌شود که اجازه رهایی GDP و اتصال GTP را می‌دهد و Ras فعال را تشکیل می‌کنید (شکل ۲۴-۱۶ را ملاحظه کنید) GAP هیدرولیز GTP را شتاب می‌دهد و در نزدیکی Ras.GTP توسط اتصال به RTKهای فعال شده قرار می‌گیرد.

■ Ras فعال شده یک آبشار کینازی را به راه می‌اندازد که در آن Raf، MAP کیناز به ترتیب فسفریله و بنابراین فعال می‌شوند. MAP کیناز فعال شده دیمری شده و به هسته منتقل می‌شود (شکل ۲۵-۱۶ را ملاحظه کنید).

■ فعال‌سازی MAP کیناز به دنبال تحریک یک گیرنده فاکتور رشد منجر به فسفریله شدن و فعال‌سازی دو فاکتور رونویسی می‌گردد که به کمپلکس سه‌تایی متصل می‌شود که رونویسی چندین ژن به پاسخ اولیه را شروع می‌کند.

■ پیام‌های خارج سلولی مختلف فعال‌سازی مسیرهای MAP کینازی مختلف را القاء می‌کنند و بدین صورت فرآیندهای سلولی متنوعی را تنظیم می‌کنند.

■ ترکیبات بالادستی آبشارهای MAP کینازی به کمپلکس‌های بزرگ مختص مسیر پیام‌رسانی تجمع می‌یابند و توسط پروتئین‌های اسکافولد پایدار می‌شوند (شکل ۲۸-۱۶ را ملاحظه کنید). این امر اطمینان می‌دهد که فعال‌سازی یک مسیر توسط پیام خارج سلولی خاص منجر به فعال‌سازی سایر مسیرهای دارای ترکیبات مشترک می‌شود.

۱۶-۵ فسفواینوزیتیدها در نقش ناقلین پیام

در بخش‌های قبلی شیوه انتقال پیام از گیرنده‌های سیتوکین‌ها و گیرنده‌های تیروزین کینازی (RTK) را مشاهده کردیم که با تشکیل کمپلکس‌های چند پروتئینی متصل به غشاء پلاسمایی آغاز می‌شوند (شکل ۱۲-۱۶ و ۲۰-۱۶ را ملاحظه کنید). در اینجا شیوه‌ای را که این گیرنده‌های همسان مسیرهای پیام‌رسانی را آغاز می‌کنند را بحث می‌کنیم که لیپیدهای اینوزیتول فسفریله شده متصل به غشاء (مجموعاً **فسفواینوزیتید**[1] نامیده می‌شوند) را درگیر می‌کنند. بسیاری از این مسیرها اثرات کوتاه مدت بر روی متابولیسم سلولی دارند و مضاف بر اینکه همه اثرات طولانی مدت بر روی الگوی بیان ژن دارند. ما شاخه‌ای از مسیر فسفواینوزیتیدها را آغاز می‌کنیم که همچنین توسط گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها وساطت می‌شوند و سپس شاخه‌ای دیگر را که این گیرنده‌ها مشترک نیست را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

فسفولیپاز $C\gamma$ توسط برخی از گیرنده‌های تیروزین کیتازی و گیرنده سیتوکین‌ها فعال می‌شود

همانطور که در فصل ۱۵ عنوان شده تحریک هورمونی برخی از گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها منجر به فعال‌سازی فسفولیپاز C (به ویژه ایزوفرم β(PLC_β)) می‌شود. سپس این آنزیم متصل به غشاء، فسفواینوزیتول ۴ و ۵-بیس فسفات (PIP_2) را برای ایجاد دو پیامبر ثانویه (۱ و۲- دی اسیل گلیسرول (DAG) و اینوزیتول ۱ و۴ و ۵-تری فسفات (IP3)) می‌شکند. پیام‌رسانی از طریق IP_3/DAG که در فصل ۱۵ شرح داده شد، منجر به افزایش در Ca^{2+} سیتوزولی و فعال‌سازی پروتئین کیناز C می‌شود.

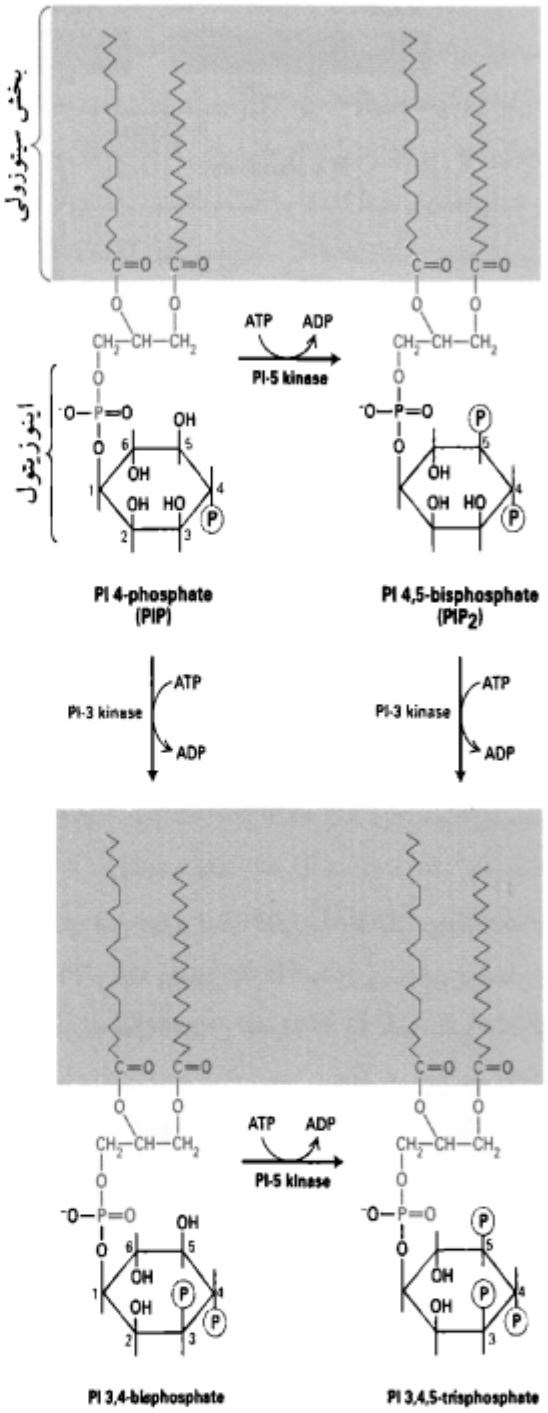
بسیاری از گیرنده‌های تیروزین کینازی و گیرنده سیتوکین‌ها همچنین می‌توانند مسیر IP_3/DGA را توسط فعال کردن ایزفروم دیگر فسفولیپاز C(PLC_γ) آغاز کنند. دُمین‌های SH2 این فسفولیپاز به فسفوتیروزین‌های ویژه‌ای بر روی گیرنده فعال شده متصل می‌شود و از این رو آنزیم را نزدیک به سوبسترای متصل به غشاء آن (فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و۵- بیس فسفات (PIP_2)) قرار می‌دهد. به علاوه، فعالیت کینازی مرتبط با فعال شدن گیرنده، ریشه‌های تیروزین بر روی PLC_γ متصل شده را فسفریله و بدین ترتیب فعالیت هیدرولازی آن را تشدید می‌کند. بنابراین گیرنده‌های تیروزین کینازی و گیرنده‌های سیتوکینی فعال، در دو جهت به فعالیت PLC_γ کمک می‌کنند: متمرکز کردن این آنزیم به غشاء و فسفریله کردن آن.

فرخواندن PI-3 کیناز به سمت گیرنده‌های تحریک شده با هورمون منجر به سنتز فسفاتیدیل اینوزیتول‌های فسفریله می‌شود

بسیاری از RTKها و گیرنده‌های سیتوکینی فعال مسیر فسفواینوزیتید دیگری را با فراخوانی آنزیم IP-3 کیناز به سمت غشاء آغاز می‌کنند. در برخی از سلول‌ها، مسیر IP-3 کیناز مذکور قادر به ایجاد تقسیم سلولی و مهار آپوپتوزی می‌بشد و لذا بقاء سلول را تضمین می‌نماید. در سلول‌های دیگر، این مسیر تغییرات ویژه‌ای را در متابولیسم سلول القاء می‌کند.

PI-3 کیناز در ابتدا در مطالعات بر روی ویروس پولیوما (یک ویروس DNA که سلول‌های بخصوصی از پستانداران را به سلول‌هایی با

1- Phospoinositide



▲ **شکل ۲۹ـ۱۶. ایجاد فسفواینوزیتول ـ۳ـ فسفات‌ها** آنزیم PI-3 کیناز[1] توسط بسیاری از گیرنده‌های تیروزین کینازی (RTKs) و گیرنده‌های سیتوکینی به سمت غشاء جذب می‌شوند. ۳ـ فسفات اضافه شده به وسیله این آنزیم (ایجاد محصولات PI-3,4 بیس فسفات یا PI-3,4,5 تری فسفات) جایگاه اضافی را برای پروتئین‌های انتقال پیام مختلف از قبیل دُمین PH متعلق به پروتئین کیناز B ایجاد می‌کند. علاوه بر این PI-4,5 بیس فسفات، سوبسترای آنزیم فسفولیپاز C است (شکل ۲۹ـ۱۵ را ملاحظه کنید).

رشد غیرقابل کنترل تغییر شکل می‌دهد) شناسایی شد. تغییر شکل نیازمند انکوپروتئین‌های مختلف رمز شده توسط ویروس (به عنوان مثال Middle T) است. محققان در تلاشی به منظور کشف شیوه عملکرد Middle T، پروتئین PI-3 کیناز را با خالص سازی نسبی Middle T کشف کردند که این میانکنش ویژه‌ای را بین این دو فاکتور پیشنهاد می‌کند. سپس آنها شیوه‌ای را که احتمالاً PI-3 کیناز رفتار سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد را بیان نمودند.

وقتی که نوع غالب منفی این آنزیم (نوع غیرفعال آن) در سلول‌های تغییر شکل یافته با ویروس پولیوما بیان شد، تکثیر بدون کنترل ویژه این سلول‌ها نیز مهار شد. این یافته، پیشنهاد کرد که کیناز طبیعی در مسیر پیام‌رسانی بخصوص مورد نیاز برای تکثیر سلول و یا برای مهار آپوپتوز مهم است. کارهای بعدی نشان داد که PI-3 کیناز در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با رشد سلول و آپوپتوز شرکت می‌کند. از ۹ هومولوگ PI-3 کیناز رمز شونده به وسیله ژنوم انسان، بهترین زیرواحدهای توصیف شده شامل زیرواحد p110 با فعالیت کاتالیتیک و زیر واحد P85 با یک دُمین اتصال به فسفوتیروزین SH2 می‌باشد.

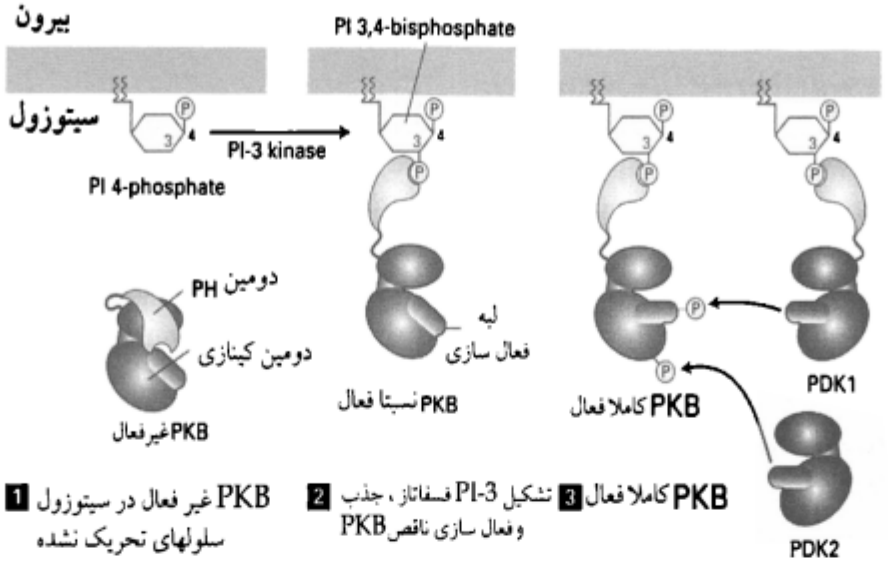
PI-3 کیناز توسط اتصال دُمین SH2 آن به فسفوتیروزین بر روی دُمین سیتوزولی بسیاری از RTKها و گیرنده سیتوکین‌های فعال به سمت غشاء پلاسمایی فراخوانده می‌شود. این فراخوانی PI-3 کیناز به غشاء پلاسمایی دُمین کاتالیتیک آن را نزدیک سوبسترای فسفواینوزیتدیش در سمت سیتوزولی غشاء پلاسمایی قرار می‌دهد و این امر منجر به تشکیل فسفاتیدیل اینوزیتول 4,3- بیس فسفات و یا فسفاتیدیل انیوزیتول 5,4,3- تری فسفات می‌شود (شکل ۲۹ـ۱۶).

با عملکرد این فسفاتیدیل اینوزیتول فسفات‌های متصل به غشاء به‌عنوان جایگاه‌های لنگراندازی برای پروتئین‌های گوناگون انتقال دهنده پیام، به نوبه خود پیام‌های پایین دست را در تعدادی از مسیرهای مهم انتقال می‌دهند.

تجمع PI-3 فسفات‌ها در غشاء پلاسمایی منجر به فعال‌سازی کینازهای مختلف می‌شود

بسیاری از پروتئین کینازها با اتصال به فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ـ فسفات‌های موجود در غشاء پلاسمایی، فعال می‌شوند. این کینازها به نوبه خود فعالیت بسیاری از پروتئین‌های سلولی را تحت تأثیر قرار

1- Phosphatidyl inositol - 3 kinase



▲ **شکل ۳۰ـ۱۶ جذب و فعال‌سازی پروتئین کیناز B(PKB)، در مسیرهای PI-3 کینازی.** در سلول‌های تحریک نشده ❶، PKB موجود در سیتوزول، دمین PH آن به دُمین کاتالیتیک کینازی متصل و آن را مهار می‌کند. تحریک هورمونی منجر به فعال‌سازی PI-3 کیناز و تشکیل متعاقب فسفاتیدیل اینوزیتول 3-(PI) فسفات‌ها می‌شود (شکل ۲۹ـ۱۶ را ملاحظه کنید). گروه‌های ۳ـ فسفات به عنوان جایگاه‌های لنگراندازی بر روی غشاء پلاسمایی برای دُمین PH پروتئین کیناز B ❷ و کینازهای دیگر (PDK1) عمل می‌نمایند. فعال‌سازی کامل PKB نیازمند فسفریلاسیون هم لبه فعال‌سازی توسط PDK1 و هم در C-ترمینال آن به وسیله کیناز دیگر (PDK2) است ❸.

می‌دهند. یکی از این کینازهای مهم، پروتئین کیناز B[1] یا PKB است که به فسفاتیدیل اینوزیتول فسفات‌ها متصل می‌شود (یک سرین/ ترئونین کیناز که همچنین Akt نامیده می‌شود). علاوه بر دُمین کینازی، پروتئین کیناز B همچنین حاوی دُمین PH است که می‌تواند به طور محکم به ۳ـ فسفات‌ها (هم PI-3,4 بیس فسفات و هم PI-3,4,5 تری فسفات) متصل شود.

در سلول‌های تحریک نشده (در حال استراحت) سطح هر دوی این ترکیبات پایین است و علاوه بر این پروتئین کیناز B در سیتوزول در شکل غیرفعال خود حضور دارد (شکل ۳۰ـ۱۶). به دنبال تحریک هورمونی و ارتقاء حاصله در PI-3 فسفات‌ها، پروتئین کیناز B به آنها متصل شده و در غشاء پلاسمایی قرار می‌گیرد. اتصال پروتئین کیناز B به PI-3 فسفات‌ها نه تنها می‌تواند آنزیم را به سمت غشاء پلاسمایی جذب کند، بلکه همچنین مهار جایگاه کاتالیتیک را به وسیله دُمین PH از بین می‌برد. ولیکن بالاترین سطح فعال‌سازی پروتئین کیناز B به فراخوانی دو کیناز دیگر بستگی دارد (PDK2 و PDK1).

PDK1 توسط اتصال دُمین PH آن به PI-3 فسفات‌ها جذب غشاء پلاسمایی می‌شود. هم پروتئین کیناز B متصل به غشاء و هم PDK1 می‌توانند در سطح غشاء پخش شوند که این امر موجب می‌شود این دو به اندازه کافی به یکدیگر نزدیک شده و PDK1 می‌تواند پروتئین کیناز B را بر روی ریشه تیروزین اصلی و مهم در لبه فعال‌سازی آن فسفریله کند (باز هم مثالی دیگر از فعال‌سازی کیناز توسط فسفریلاسیون). فسفریلاسیون سرین دیگر (البته نه در بخش لبه) توسط PDK2 برای بالاترین سطح فعالیت پروتئین کیناز B ضروری است (شکل ۲۰ـ۱۶ را ملاحظه کنید)، همانند تنظیم فعالیت Raf (شکل ۲۵ـ۱۶ را ملاحظه کنید). رها شدن یک دُمین مهاری و فسفریلاسیون توسط کینازهای دیگر، فعالیت پروتئین کیناز B را تنظیم می‌کند.

پروتئین کیناز B فعال، بسیاری از پاسخ‌های سلولی را القاء می‌کند

وقتی که پروتئین کیناز B کاملاً فعال شد، قادر به تفکیک از غشاء پلاسمایی است و بسیاری از پروتئین‌های هدفش را فسفریله می‌کند، که این گستره وسیعی از اثرات را بر روی رفتار سلول دارد. اگرچه، فعال‌سازی PKB فقط ۱۰ـ۵ دقیقه طول می‌کشد، ولیکن اثرات آن می‌تواند چندین ساعت تداوم داشته باشد.

1- Protein kinase B

القا بقاء سلول، در بسیاری از سلول‌ها پروتئین کیناز B به طور مستقیم پروتئین‌های پروآپوپتوزی مانند Bad را فسفریله و غیرفعال می‌کند (اثر کوتاه مدتی که فعال‌سازی مسیر آپوپتوزی منجر به مرگ سلول را مهار می‌کند) (فصل ۲۱). علاوه بر این PKB به بقاء بسیاری از سلول‌های محیط کشت با فسفریلاسیون چندین ریشه سرین/ترئونین مربوط به فاکتور رونویسی FOXO3A کمک می‌کند و بدین وسیله اثر پروآپوپتوزی آن را کاهش داده و در بقاء سلول شرکت می‌کند.

در غیاب فاکتورهای رشد، FOXO3A غیرفسفریله می‌شود و عمدتاً در هسته قرار می‌گیرد تا رونویسی از ژن‌های مختلف رمزکننده پروتئین‌های پروآپوپتوزی را فعال نماید. وقتی که فاکتورهای رشد به سلول اضافه می‌شوند، PKB فعال شده و FOXO3A را فسفریله می‌کند. این به پروتئین ۳-۳-۱۴ (پروتئین سیتوزولی با قابلیت اتصال به فسفوتیروزین) امکان اتصال به FOXO3A را فراهم می‌نماید و لذا آن را در سیتوزول متوقف می‌کند (به یاد دارید که فاکتور ۳-۳-۱۴ همچنین پروتئین Raf فسفریله شده را در وضعیت غیرفعال در سیتوزول نگه می‌دارد. شکل ۲۵-۱۶ را ملاحظه کنید). عقب نشینی فاکتورهای رشد، منجر به غیرفعال شدن پروتئین کیناز B و دفسفریلاسیون FOXO3A شده و از این رو موجب تجمع آن در هسته و رونویسی از ژن‌های القاءکننده آپوپتوز می‌شود. جهش یافته‌ای از FOXO3A که سه ریشه سرین هدف برای PKB متحمل موتاسیون به آلانین می‌شود، دائماً فعال بوده و آپوپتوز را حتی در حضور PKB فعال آغاز می‌کند. این یافته اهمیت FOXO3A و PKB را در کنترل آپوپتوزی سلول‌های محیط کشت نشان می‌دهد. عدم تنظیم PKB در هر دو بیماری سرطان و دیابت درگیر می‌شود.

القا جذب و ذخیره گلوکز توسط انسولین همانطور که در فصل ۱۵ آموختیم، انسولین بر روی عضله، کبد و سلول‌های چربی به منظور پایین آوردن سطح گلوکز به واسطه افزایش جذب آن از خون عمل می‌نماید. همچنین انسولین در عضله و کبد، در ذخیره گلوکز به صورت گلیکوژن کمک می‌کند. گیرنده انسولین یک گیرنده دیمر تیروزین کیناز است که مسیر MAP/Ras کیناز را آغاز می‌کند و منجر به تغییر در بیان ژن می‌شود. تحریک با انسولین همچنین می‌تواند مسیر PI-3/PKB کیناز را آغاز کند. در نتیجه آن، PKB فعال، چندین اثر کوتاه مدت را اعمال می‌کند که گلوکز خون را پایین آورده و به سنتز گلیکوژن کمک می‌کند. اثر کوتاه مدت اصلی، افزایش ورود گلوکز توسط سلول‌های چربی و عضلانی است. ناقل CLUT4 به طور طبیعی توسط یک پروتئین تحت عنوان AS160 در وزیکول‌های غشاءدار داخل سلولی نگه داشته می‌شود. پروتئین کیناز B فعال، پروتئین AS160 را از طریق مکانیسمی که کاملاً شناخته نشده فسفریله می‌کند و موجب حرکت GLUT4 به سطح سلول می‌شود (شکل ۳۴-۱۵ را ملاحظه کنید). در نتیجه، افزایش جریان گلوکز به داخل این سلول‌ها سطح گلوکز خون را پایین می‌آورد.

در کبد و عضله، علاوه بر این، تحریک انسولین منجر به فعال‌سازی کوتاه مدت گلیکوژن سنتاز (GC) از GDP-گلوکز می‌شود (شکل ۲۴-۱۵ را ملاحظه کنید). در سلول‌های در حال استراحت (مثلاً در نبود انسولین)، آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ (GSK3) فعال بوده و گلیکوژن سنتاز را فسفریله می‌کند و بدین وسیله فعالیت آن را بلوکه می‌کند. در سلول‌های تحریک شده با انسولین، PKB فعال، GSK3 را فسفریله و غیرفعال می‌کند و این مهار با واسطه‌ی گلیکوژن سنتاز به واسطه GSK3 را از بین برده و سنتز گلیکوژن را پیش می‌برد. لذا، غلظت داخل سلولی گلوکز و متابولیت‌های آن کاهش می‌یابد (تحریک جذب گلوکز از خون). این اثر وابسته به انسولین، مکانیسم دیگری را برای کاهش سطح گلوکز خون نشان می‌دهد.

مسیر PI-3کیناز به طور منفی به وسیله PTEN فسفاتاز تنظیم می‌شود

همانند تقریباً همه وقایع پیام‌رسانی داخل سلولی، فسفریلاسیون با واسطه PI-3 کیناز برگشت‌پذیر است. فسفاتاز مربوط به آن که PTEN فسفاتاز نامیده می‌شود. به طور غیرمعمول، ویژگی گسترده‌ای دارد. علی رغم آنکه PTEN قادر به حذف گروه‌های فسفات چسبنده به ریشه‌های سرین، ترئونین و تیروزین در پروتئین‌ها است، ولیکن تصور می‌شود که تواناییش برای حذف ۳-فسفات از PI-3,4,5 تری فسفات، عملکرد اصلی آن در سلول باشد.

بیان بیش از حد PTEN در سلول‌های کشت شده پستانداران به آپوپتوز با کاهش میزان PI-3,4,5 تری فسفات شروع می‌کند و به همین دلیل به فعال‌سازی و اثر آنتی آپوپتوز PKB کمک می‌کند.

در انواع متنوع سرطان‌های پیشرفته انسانی، ژن PTEN حذف می‌شود. پیامد حذف پروتئین PTEN، رشد غیرقابل کنترل سلول است. در واقع در سلول‌های فاقد PTEN، سطح PI -3,4,5 تری فسفات و فعالیت PKB افزایش می‌یابد. به دلیل اینکه PKB اثر آنتی آپوپتوزی اعمال می‌کند، از دست دادن PTEN به طور غیرمستقیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز)

را کاهش می‌دهد که سرنوشت طبیعی بسیاری از سلول‌ها است. در سلول‌های بخصوصی، نظیر سلول‌های بنیادی نورون‌ها، نبود PTEN نه تنها آپوپتوز را مهار می‌کند، بلکه همچنین منجر به تحریک پیشرفت چرخه سلولی و تشدید سرعت تکثیر می‌شود. موش‌های تخریب ژنی شده فاقد PTEN دارای مغز بزرگ با تعداد زیادی نورون هستند که این اهمیت PTEN را در کنترل تکوین طبیعی تأیید می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۶

فسفواینوزیتیدها بعنوان انتقال‌دهنده‌های پیام

■ بسیاری از RTKها و گیرنده‌های سیتوکینی می‌توانند مسیر پیام‌رسانی IP3/DAG را توسط فعال‌سازی فسفولیپاز Cγ(PLCγ) یک ایزوفرم PLC متفاوت شروع کنند تا اینکه توسط گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین شروع کنند.

■ RTKهای فعال شده و گیرنده‌های سیتوکینی نیز می‌توانند مسیر فسفواینوزیتید دیگری را توسط اتصال PI3 کینازها شروع کنند و بدان‌جهت به آنزیم‌ها اجازه دسترسی به سوبستراهای فسفواینوزیتیدی متصل به غشاء را بدهند و سپس در موقعیت ۳ فسفریله می‌شوند (شکل ۲۹-۱۶ را ملاحظه کنید).

■ دُمین PH در پروتئین‌های مختلف به PI3 فسفات‌ها متصل می‌شود و تشکیل کمپلکس‌های پیام‌رسانی مرتبط با غشای پلاسمایی را می‌دهد.

■ پروتئین کیناز B(PKB) به طور جزئی توسط اتصال PI3 فسفات‌ها فعال می‌شود. فعالیت کامل آن نیاز به فسفریلاسیون توسط کیناز دیگر دارد (PDK1) که به غشاء توسط اتصال به و PI3 فسفات‌ها یک کیناز دوم (PDK2) فراخوانده می‌شود (شکل ۳۰-۱۶ را ملاحظه کنید).

■ پروتئین کیناز B فعال شده بقاء بسیاری از سلول‌ها را توسط فسفریله کردن مستقیم و غیرفعال‌سازی چندین پروتئین پروآپوپتوزی و توسط فسفریله‌کردن و غیرفعال‌سازی فاکتور رونویسی باعث می‌شود که سنتز پروتئین‌های پروآپوپتوزی را القا می‌کند.

■ فعال‌سازی گیرنده انسولین (یک گیرنده تیروزین کینازی) در سلول‌های ماهیچه‌ای و چربی مسیر PI-3 کیناز را شروع می‌کند. پروتئین کیناز B فعال شده جذب گلوکز و سنتز گلیکوژن را باعث می‌شود.

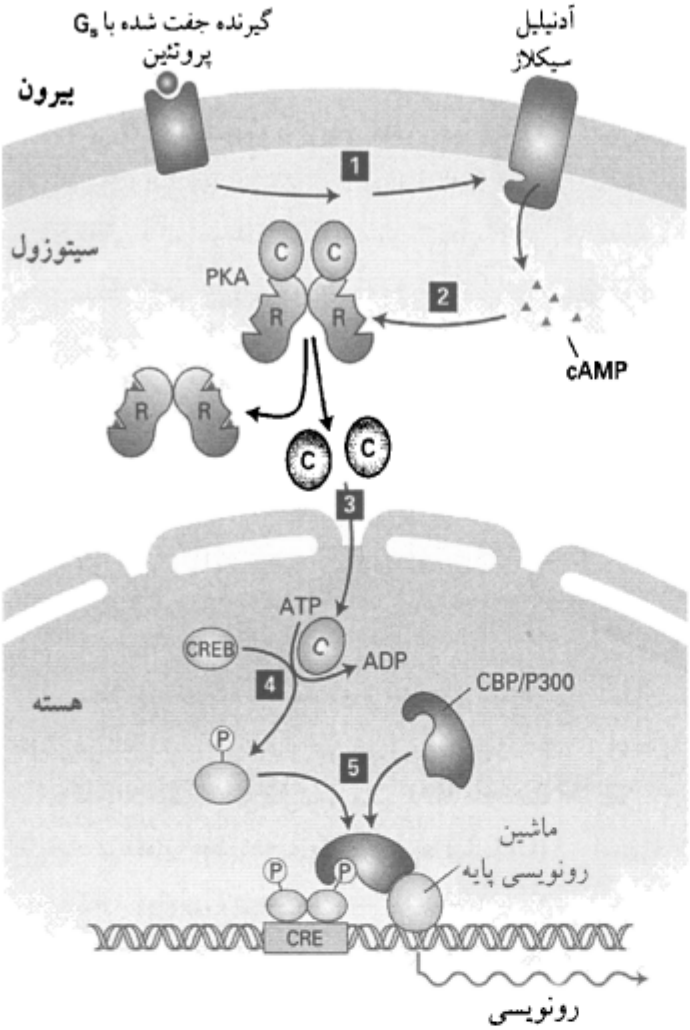
■ پیام‌رسانی از طریق مسیر PI-3 کیناز توسط PTEN فسفاتاز خاتمه می‌یابد که سه فسفات را در PI3 ـ فسفات هیدرولیز می‌کند. فقدان PTEN یک رویداد مشترک در تومورهای انسانی، بقاء و تکثیر سلول است.

۶ـ۱۶ فعال‌سازی رونویسی ژن توسط گیرنده‌های سطح سلول که هفت بار عرض غشاء را طی می‌کنند

فصل ۱۵ بر روی مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی آغاز شده با اتصال لیگاند به گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین (GPCRs) متمرکز شد. این گیرنده‌های هفت بار گذرنده از غشاء، اغلب اثرات کوتاه مدت (چند ثانیه تا چند دقیقه) بر روی متابولیسم سلول دارند و عمدتا به وسیله تنظیم فعالیت آنزیم‌های موجود و یا پروتئین‌های دیگر این کار را انجام می‌دهند. با این حال، مسیر پیام‌رسانی GPCRs همچنین می‌تواند اثرات بلندمدت (ساعت‌ها تا روزها) را در نتیجه فعال‌سازی و یا سرکوب رونویسی ژن القا کنند. ما قبلاً مشاهده کردیم شیوه‌ای که گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین متعلق به فاکتورهای آمیزش، مسیر MAP کیناز را فعال کرده و منجر به تغییرات بلندمدت در بیان ژن می‌شود (شکل ۲۸ـ۱۶ قسمت a را ملاحظه کنید). در نخستین قسمت از این بخش، بر روی دو مسیر دیگر بحث می‌کنیم که گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین، بیان ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. نخستین مکانیسم از طریق فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی توسط پروتئین کیناز A عمل می‌کند که این کیناز در پایین دست گیرنده‌های جفت شده با G_s فعال می‌شود (شکل ۲ـ۱۶ قسمت d را ملاحظه کنید). دُمین مکانیسم از طریق اتصال ارستین به بسیاری از گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌های اشغال شده با لیگاند و اتصال متعاقب آنزیم‌ها در مسیر MAP کیناز و در مسیرهای دیگر عمل می‌نماید.

در مابقی این بخش، دو دسته دیگر از گیرنده‌های هفت بار گذر از غشاء را بررسی می‌کنیم که به Wnt و هجهوگ[1] (دو پروتئین پیام دهنده که نقش کلیدی را در تکوین بازی می‌کند) متصل می‌شوند (شکل ۲ـ۱۶ قسمتهای e و f را ملاحظه کنید). اگرچه از نظر ساختار با گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین مشابهند، ولیکن گیرنده‌های متعلق به Wnt و هجهوگ، G-پروتئین‌ها را فعال نمی‌کنند. این مسیرها اساساً از طریق آنالیز ژنتیکی جهش یافته‌های تکاملی[2] در دروزوفیلا کشف شده‌اند، ولیکن علاوه بر این در انسان نیز فعالیت

1- Hedgehog 2- Developmental mutants



شکل ۱۶ـ۳۱. فعال شدن فاکتور رونویسی CREB به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده‌های جفت شده با G_s-پروتئین‌ها. تحریک گیرنده ❶منجر به فعال شدن پروتئین کیناز A(PKA) می‌شود ❷. زیرواحدهای کاتالیتیک PKA به هسته نقل مکان می‌کنند❸ و در آنجا فاکتور رونویسی CREB را فسفریله و فعال می‌کنند ❹: CREB فسفریله❺ برای تحریک کردن ژن‌های هدف گوناگون کنترل شونده به وسیله عنصر تنظیمی CRE به کمک فعال‌کننده CRE CBP/P300 متصل می‌شود برای جزئیات متن را ملاحظه کنید.

می‌کنند. فعال‌سازی این گیرنده‌ها منجر به بیان ژن‌های کلیدی لازم برای کسب هویت یا سرنوشت جدید می‌شود. در فصل ۲۲، نقش این گیرنده‌ها را در تعدادی از مسیرهای تکاملی کلیدی بررسی کرده‌ایم و همچنین شیوه میانکنش این مسیرهای پیام‌رسانی را با یکدیگر (فعال شده توسط گیرنده‌های متفاوت) به منظور مشخص کردن سرنوشت صحیح بسیاری از سلول‌ها در خلال رشد و تکامل را نشان می‌دهیم.

CREB با cAMP و پروتئین کیناز A به منظور فعال‌سازی رونویسی ژن ارتباط برقرار می‌کند

در سلول‌های پستانداران، افزایش میزان cAMP سیتوزولی موجب فعال شدن پروتئین کیناز A[1] یا PKA می‌شود که این امر منجر به انواع بسیار متنوعی از پاسخ‌های کوتاه مدت در سلول‌های مختلف می‌شود (جدول ۱۵ـ۲ را ملاحظه کنید). یکی از مهمترین اثرات کوتاه مدت باوساطت PKA، فعال‌سازی گلیکوژنولیز در کبد و عضله است (افزایش گلوکز خون) (شکل ۱۵ـ۲۵ قسمت a را ملاحظه کنید). فعال‌سازی پروتئین کیناز A همچنین بیان بسیاری از ژن‌ها را تحریک می‌کند و این امر منجر به اثرات بلندمدت بر روی سلول‌ها شده که اغلب اثرات کوتاه مدت پروتئین کیناز A فعال را تشدید می‌کند.

برای مثال، در سلول‌های کبدی، پروتئین کیناز A، بیان تعدادی از آنزیم‌های لازم در تبدیل ترکیبات سه کربنی مانند پیروات را به گلوکز (شکل ۱۲ـ۳) القاء می‌کند و لذا سطح گلوکز را در خون افزایش می‌دهد. همه ژن‌های تنظیم شونده توسط PKA حاوی توالی DNA عملگر سیس یا (CRE)[2] هستند که به شکل فسفریله یک فاکتور رونویسی تحت عنوان پروتئین (CREB)[3] به آن اتصال می‌یابد که فقط در هسته یافت می‌شود. همانطور که در فصل ۱۵ بیان شد، اتصال ناقلین عصبی[4] و هورمون‌ها به گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها سبب رها شدن زیرواحد کاتالیتیک فعال PKA می‌شود. سپس برخی از زیرواحدهای کاتالیتیک به داخل

1- Proteine Kinase A

2- cAMP response element

3- CRE - binding

4- Neurotransmiters

هسته منتقل شده و سرین ۱۳۳ را بر روی پروتئین CREB فسفریله می‌کنند.

پروتئین CREB فسفریله به ژن‌های هدف واجد CRE و علاوه بر این به *کمک فعال‌کننده‌ای*[1] با نام CBP/300 متصل می‌شود که این فاکتور نیز به CREB به منظور تشکیل ماشین رونویسی پایه متصل می‌شود و بدین وسیله به CREB اجازه تحریک رونویسی را می‌دهد (شکل ۳۱ـ۱۶). همانطور که در فصل ۷ بحث شد، فاکتورهای رونویسی دیگر تنظیم شونده با پیام به CBP/P300 برای اعمال اثر فعال کنندگی‌شان وابسته هستند. بنابراین کمک فعال‌کننده مذکور نقش مهمی را در ترکیب پیام‌ها از مسیرهای پیام‌رسان گوناگون ایفاء می‌کنند که در رونویسی ژن نقش دارند.

ارستین متصل شده به GPCR، تعدادی از آبشارهای کینازی را فعال می‌کند

در موجودات پیشرفته آغاز فعال‌سازی مسیر MAP کیناز اغلب به وسیله گیرنده‌های جفت شده با G- پروتئین‌ها ($GPCR_s$) انجام می‌شود. همانطور که در فصل ۱۵ بحث کردیم، بتاارستین به سرین‌های فسفریله شده در دُمین سیتوزولی مربوط به گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین‌ها متصل می‌شود و سلول‌ها را به تحریک هورمونی بیشتر در دو جهت حساسیت زدایی می‌کند: مهار فعال‌سازی G_α-پروتئین و کمک به آندوسیتوز کمپلکس ارستین- GPCR.

کمپلکس ارستین GPCR همچنین به‌عنوان اسکلت برای اتصال و فعال کردن تعدادی از کینازهای سیتوزولی عمل می‌کند (شکل ۲۷ـ۱۵ را ملاحظه کنید). اینها شامل c-Src که یک پروتئین کیناز سیتوزولی است و مسیر MAP کیناز و مسیرهای دیگر را که منجر به رونویسی از ژن‌های موردنیاز برای تقسیم سلول می‌شوند را فعال می‌کند. کمپلکسی از سه پروتئین متصل شده به ارستین از جمله کیناز N-ترمینال Jun (JNK-1) یک آبشار کینازی را فعال می‌کنند که احتمالاً فاکتور رونویسی c-Jun را فعال می‌کنند. c-Jun فعال شده موجب بیان آنزیم‌های ویژه پیش برنده رشد[2] و پروتئین‌های دیگر کمک‌کننده پاسخ سلول‌ها به استرس می‌گردد.

پیام‌های Wnt موجب رها شدن فاکتور رونویسی از کمپلکس پروتئین سیتوزولی می‌شوند

همانند گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین، گیرنده‌های متعلق به پروتئین‌های Wnt ۷ بار عرض غشاء پلاسمایی را طی می‌کنند. کشف نخستین ژن Wnt در مهره داران (ژن Wnt-1 در موش) مورد توجه قرار گرفت، به دلیل اینکه در سرطان‌های ویژه‌ای از سینه، دچار بیان افزایشی می‌شود. کارهای بعدی نشان داد که بیان افزایشی با الحاق پرووویروسی MMTV[3] در نزدیکی ژن Wnt-1 ایجاد شد. به دلیل اینکه Wnt-1 یک پروتوانکوژن[4] است، لذا بیان نامناسب ژن سلولی طبیعی آن به آغاز سرطان کمک می‌کند (فصل ۲۵). کلمه Wnt ترکیبی از wing less (همتای ژن مگس) و int برای جایگاه ادغام رتروویروس در موش است. فعال‌سازی مسیر Wnt، تعداد زیادی از وقایع مهم تکاملی را کنترل می‌کنند مانند تکوین مغز، الگوبندی دست و پا و اندام زایی. نقش اصلی مسیر پیام‌رسانی Wnt در تشکیل استخوان توسط این یافته آشکار شد که جهش در عوامل مسیر Wnt تراکم استخوان را در انسان تحت تأثیر قرار می‌دهد و اکنون به عنوان مسیر (پیام‌رسانی Wnt) کنترل تشکیل استئوبلاست (سلول‌های استخوان ساز) شناخته می‌شوند.

علاوه بر این، پیام‌رسانی Wnt در کنترل سلول‌های بنیادی (فصل ۲۱) و در بسیاری از جنبه‌های دیگر تکوین (فصل ۲۲) مهم است. اختلالات در پیام‌رسانی از طریق مسیر Wnt با سرطان‌های متعدد انسانی مرتبط می‌شود (به ویژه سرطان کولون) (فصل ۲۵).

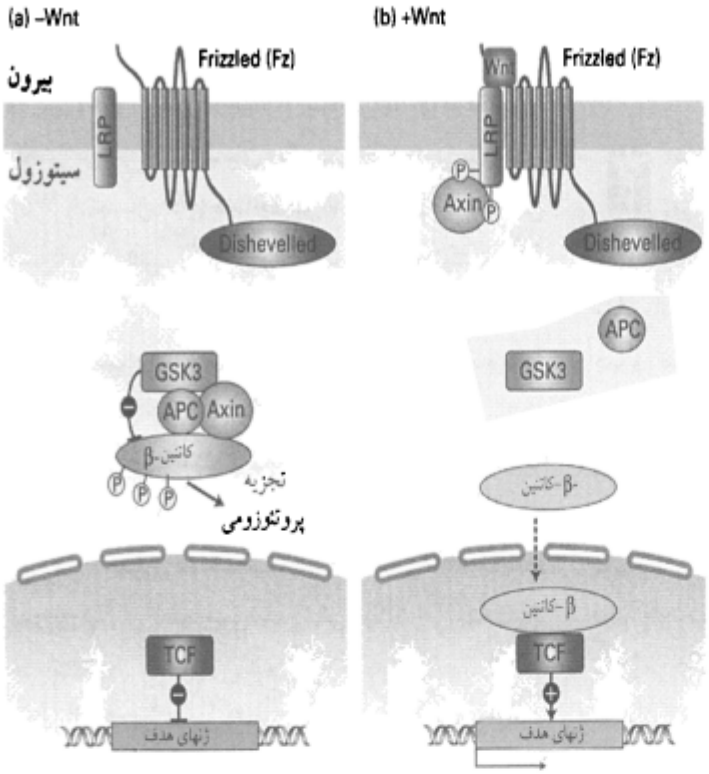
به دلیل حفظ مسیر پیام‌رسانی Wnt در تکوین موجودات پرسلولی، مطالعات ژنتیکی در دروزوفیلا و نماتود الگانس مطالعات پروتوانکوژن‌ها و ژن‌های مهارکننده تومور در موش و مطالعه اجزاء تشکیل دهنده اتصال سلولی، همگی برای شناسایی عوامل متعدد مسیر شرکت کرده‌اند. پروتئین‌های Wnt (مولکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی در این مسیر) با اضافه شدن گروه پالمیتیک (شکل یونیزه اسید چرب پالمیتیک اسید) نزدیک به انتهای N-ترمینال‌شان تغییر می‌کنند. این گروه پادمیتات تصور می‌شود که پروتئین‌های Wnt را به غشاء پلاسمایی سلول‌های ترشح‌کننده Wnt محکم می‌کند و لذا گستردهٔ فعالیت‌شان را به سلول‌های مجاور محدود می‌کنند. Wnt از طریق دو گیرنده پروتئینی سطح سلول عمل می‌کند: (FZ) فریزلد[5] که دارای ۷ مارپیچ آلفای ترانس ممبران بوده و به طور مستقیم به Wnt متصل می‌شود و یک کمک گیرنده تحت عنوان LRP که به نظر می‌رسد در مسیر وابسته به پیام‌رسانی

1- Co-activator

2- Growth - promoting - Enzyme

3- Mouse memmory tumor virus

4- Proto-oncogene 5- Frizzled



◀ **شکل ۱۶ـ۳۲ مسیر پیام‌رسانی Wnt.** (a) در نبود Wnt، بتاکاتنین در کمپلکس با آگزین (یک پروتئین اسکلتی)، APC و GSK_3 کیناز (این کیناز بتاکاتنین را فسفریله کرده و منجر به تجزیه آن می‌شود) یافت می‌شود. تشکیل این کمپلکس با واسطه‌ی آگزین، فسفریلاسیون را به بتاکاتنین وسیله GSK3 (تقریباًبیشتر از ۲۰۰۰۰بار) تسهیل می‌کند. فاکتور رونویسی TCF در هسته به عنوان یک سرکوبگر ژن‌های هدف عمل می‌کند، مگر اینکه توسط پیام‌رسانی Wnt تغییر کرده باشد. (b) اتصال Wnt به گیرنده Frizzled (Fz)، سبب فسفریلاسیون کمک‌گیرنده LRP توسط GSK3 و کینازهای دیگر می‌شود و لذا امکان اتصال متعاقب آگزین فراهم می‌شود. کمپلکس بتاکاتنین GSK3-APC-Axin از فسفریلاسیون بتاکاتنین به وسیله GSK3 جلوگیری می‌کند و منجر به تجمع بتاکاتنین در سلول می‌شود. بعد از نقل مکان بتاکاتنین به هسته، احتمالاً برای فعال کردن ژن‌های هدف عمل می‌کند و یا اینکه موجب خروج TCF از هسته و احتمالاً فعال شدن آن در سیتوزول می‌شود.

Wnt به فریزید متصل می‌شود. جهش در ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های (فریزلد Wnt یا LRP (در دروزوفیلا Arrow نامیده می‌شود))، اثرات مشابه بر روی تکوین جنین دارد.

مطابق با مدل کنونی از مسیر Wnt، عامل اصلی و مرکزی در مسیر انتقال پیام داخل سلولی Wnt، در مهره داران بتا ـکاتنین[1] و در دروزوفیلا آرمادیلو[2] نامیده می‌شود. این پروتئین چندکاره هم در نقش یک فعال‌کننده رونویسی و هم به عنوان یک پروتئین رابط اسکلت سلولی با غشاء عمل می‌کند (شکل ۱۲ـ۱۹ را ملاحظه کنید). در نبود پیام Wnt، بتاکاتنین توسط یک کمپلکس حاوی گلیکوژن سنتاز کیناز۳ (GSK3) (پروتئین کیناز همسان با آنکه در تنظیم گلوکز خون فعالیت می‌کند) (بخش ۵ـ۱۶)، پروتئین ACP[3] (یک مهارکننده تومور در انسان) و آگزین[4] (یک پروتئین اسکلتی) فسفریله می‌شود. سپس بتاکاتنین فسفریله، یوبیکوئیتینه شده و در پروتئازوم تجزیه می‌شود (شکل ۲۲ـ۱۶ قسمت a). در حضور Wnت، آگزین به دُمین سیتوزولی کمک -گیرنده LPR متصل می‌شود. این اتصال، کمپلکس حاوی GSK3 و بتاکاتنین را متلاشی می‌کند و از فسفریلاسیون بتاکاتنین توسط GSK3 و تثبیت بتاکاتنین در سیتوزول جلوگیری می‌کند (شکل ۲۲ـ۱۶ قسمت b).

تثبیت بتاکاتنین که توسط Wnt القاء می‌شود، همچنین برای پروتئین Dishevelled (Dsh) مورد نیاز است. این پروتئین به دُمین سیتوزولی گیرنده فریزلد (Fz) متصل می‌شود. بتاکاتنین رها شده به داخل هسته نقل مکان می‌کند و در آنجا همراه با فاکتور رونویسی TCF برای کنترل بیان ژن‌های هدف ویژه عمل می‌کند (به یاد دارید که TCF همچنین در مسیر MAP کیناز فعالیت می‌کند، شکل ۲۷ـ۱۶ را ملاحظه کنید). در میان ژن‌های هدف Wnت، تعداد زیادی از آنها پیام‌رسانی Wnت را نیز کنترل می‌کنند که این درجه بالای تنظیم پس نورد را نشان می‌دهد. اهمیت پایداری و قرارگیری بتاکاتنین به این منظور است که پیام‌های Wnت تعادل مهم بین سه محل ذخیره بتاکاتنین را در سلول (اسکلت سلولی، سیتوزول و هسته) تحت تأثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این پیام‌رسانی Wnت، اتصال به پروتئوگلیکان‌های سطح سلول را نیاز دارد. یک پروتئوگلیکان از یک پروتئین مرکزی متصل به زنجیره گلیکوز آمینوگلیکان (GAG) نظیر هپارین سولفات و کندروایتین سولفات تشکیل شده است. (شکل ۲۹ـ۱۹ را ملاحظه کنید). مدارک مربوط به شرکت پروتئوگلیکان‌ها در پیام‌رسانی Wnت از دروزوفیلای جهش

1- β-Catenin
2- Armadillo
3- Adenomatosis polypsis coli
4- Axin

یافته sgl[۱] به دست آمده است که اینها فاقد آنزیم کلیدی موردنیاز برای سنتز هپارین و کندرویتین سولفات هستند. این جهش یافته‌ها به طور وسیعی سطح wingless (پروتئین Wnt در مگس) را کاهش می‌دهند و فنوتیپ‌های دیگر همراه با نقص در پیام‌رسانی Wnt را نشان می‌دهند. جهش‌ها در دو ژن دیگر مگس (شبه‌دالی[۲]، دالی[۳]) که هر دو هسته پروتئینی پروتئوگلیکان‌های سطح سلول را رمزگذاری می‌کنند، با پیام‌رسانی Wnt ناقص در دروزوفیلا همراه می‌شوند. شیوه‌ای که پروتئوگلیکانها پیام‌رسانی Wnt را تسهیل می‌کنند، ناشناخته است ولیکن شاید اتصال Wnt به زنجیره‌های اختصاصی گلیکوز آمینوگلیکان‌ها برای اتصال آن به گیرنده Fz و یاکمک گیرنده LRP لازم باشد. این مکانیسم با اتصال FGF[۴] به هپاران سولفات مشابه است که اتصال FGF به گیرنده تیروزین کیناز آن را تشدید می‌نماید (شکل ۱۵ـ۱۶ را ملاحظه کنید).

پیام‌رسانی هجهوگ، سرکوب ژن‌های هدف را از بین می‌برد

مسیر هجهوگ (Hh) با مسیر Wnt تشابه دارد از این نظر که دو پروتئین غشایی (یکی با ۷ قطعه گذر از غشاء) برای دریافت و انتقال پیام موردنیاز است. (شکل ۲ـ۱۶ قسمت f را ملاحظه کنید). مسیر Hh همچنین در عدم تجمع کمپلکس داخل سلولی حاوی فاکتور رونویسی (همانند مسیر Wnt) درگیر می‌شود. با این حال، برخلاف پیام‌رسانی Wnt، پروتئین Hh (پیام خارج سلولی در این مسیر) به صورت پیش ساز شده و سپس برش می‌خورد و علاوه بر این تصور می‌شود که دو پروتئین غشایی لازم در پیام رسانی Hh میان غشاء پلاسمایی و وزیکولهای داخل سلولی حرکت می‌کنند.

اگرچه هجهوگ یک پروتئین ترشحی است، ولیکن فقط در فواصل کوتاه از سلول پیام‌رسان (۲۰ـ۱ سلول) حرکت می‌کند و به گیرنده‌های موجود بر روی سلول دریافت‌کننده متصل می‌شود. لذا پیام‌های Hh همانند پیام‌های Wnt اثرات کاملاً موضعی دارند. همانطور که Hh به فواصل دور از سلول‌های ترشح‌کننده منتشر می‌شوند، غلظتش کاهش می‌یابد.

همانطور که در فصل ۲۲ یاد می‌گیریم، غلظت‌های مختلف Hh، سرنوشت‌های متفاوتی را در سلول‌های دریافت‌کننده القاء می‌کنند. سلول‌هایی که میزان بالایی از Hh را دریافت می‌کنند، ژن‌های بخصوصی را روشن کرده و ساختارهای ویژه‌ای تشکیل می‌دهند و سلول‌هایی که میزان کمتری دریافت می‌کنند، ژن‌های متفاوتی را روشن کرده و ساختارهای متفاوتی را نیز ایجاد می‌کنند. پیام‌هایی که سرنوشت‌های سلولی متفاوت را بسته به غلظت‌شان القاء می‌کنند، ریخت‌زاها[۵] نامیده می‌شوند. در خلال تکوین، تولید هجهوگ و عوامل دیگر مؤثر در ریخت زایی به شدت از نظر زمان و مکان تنظیم می‌شوند.

پیام‌رسانی هجهوگ که در سرتاسر قلمرو موجودات حفظ می‌شود، در تشکیل بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها فعالیت می‌کنند. جهش در عوامل مسیر پیام‌رسانی هجهوگ در نواقص مغز انسان مانند سیکلوپیا[۶] (تک بخشی ناشی از اتصال پریموردیا[۷] چپ و راست مغز) و در اشکال متعدد سرطان‌ها نمایان می‌شوند.

پیرایش پروتئین پیش ساز Hh

هجهوگ از پروتئین پیش ساز با عملکرد خود تجزیه‌ای تشکیل شده است که قادر به دو نیم کردن خودش می‌باشد. این شکافت یک قطعه N-ترمینال (که مجدداً به صورت پیام به سلول‌های دیگر ترشح می‌شود) و C-ترمینال (که تجزیه می‌شود) ایجاد می‌کند. همانطور که در شکل ۳۳ـ۱۶ نشان داده شده است، برش پیش ساز توسط اضافه شدن لیپید کلسترول به صورت کوالان به انتهای C-ترمینال جدید از قطعه N-ترمینال انجام می‌شود. دُمین C-ترمینال پیش ساز، که این واکنش را کاتالیز می‌کند، در پروتئین‌های دیگر یافت می‌شود و علاوه بر این ممکن است که به پیوند پروتئین‌ها به غشاء به وسیله مکانیسم خودتجزیه‌ای مشابه کمک نماید. تغییر دیگر مربوط به هجهوگ، اضافه شدن گروه پالمیتوئیل به N-ترمینال است و این امر سبب افزایش آبگریزی این پروتئین می‌شود. به همراه هم، دو گروه آبگریز متصل شده، احتمالاً موجب اتصال غیراختصاصی و قابل برگشت هجهوگ ترشح شده به غشاء پلاسمایی سلول می‌شود و بدین وسیله انتشار و لذا دامنه عملکرد آن محدود می‌شود. محدودیت فضایی، نقش اصلی را در محدود کردن اثرات پیام‌های القایی قدرتمند همانند Hh ایفاء می‌کنند. به یاد دارید که گروه پالمیتوئیل همچنین به پروتئین‌های Wnt اضافه می‌شود و احتمالاً علاوه بر این موجب اتصال برگشت‌پذیر Wnt به سلول‌ها می‌شود و بدین وسیله پیام‌رسانی Wnt را به سلول‌های مجاور با سلول پیام‌رسان محدود می‌کند.

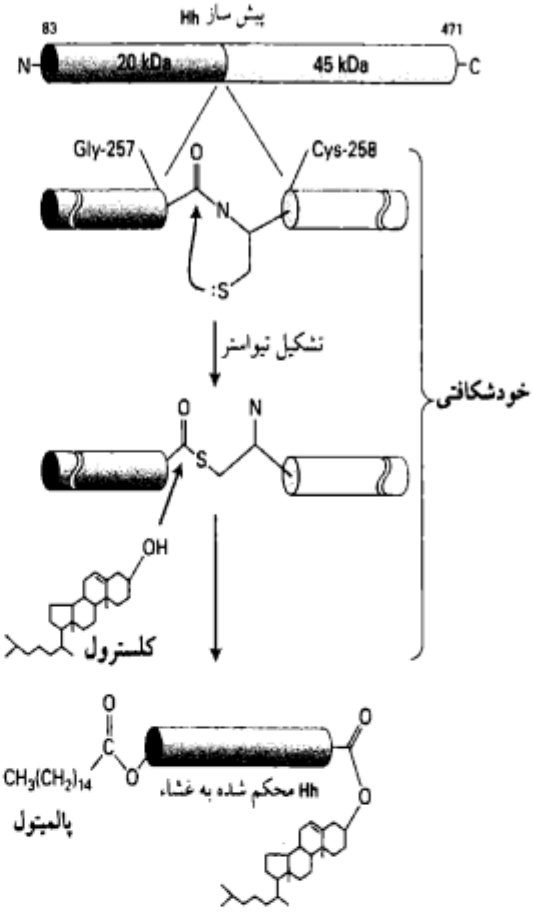
1- Drosophila sugarless

2- Dally-like 3- Dally

4- Fibroblast growth factor

5-Morphogens 6- Cyclopia

7- Primordia



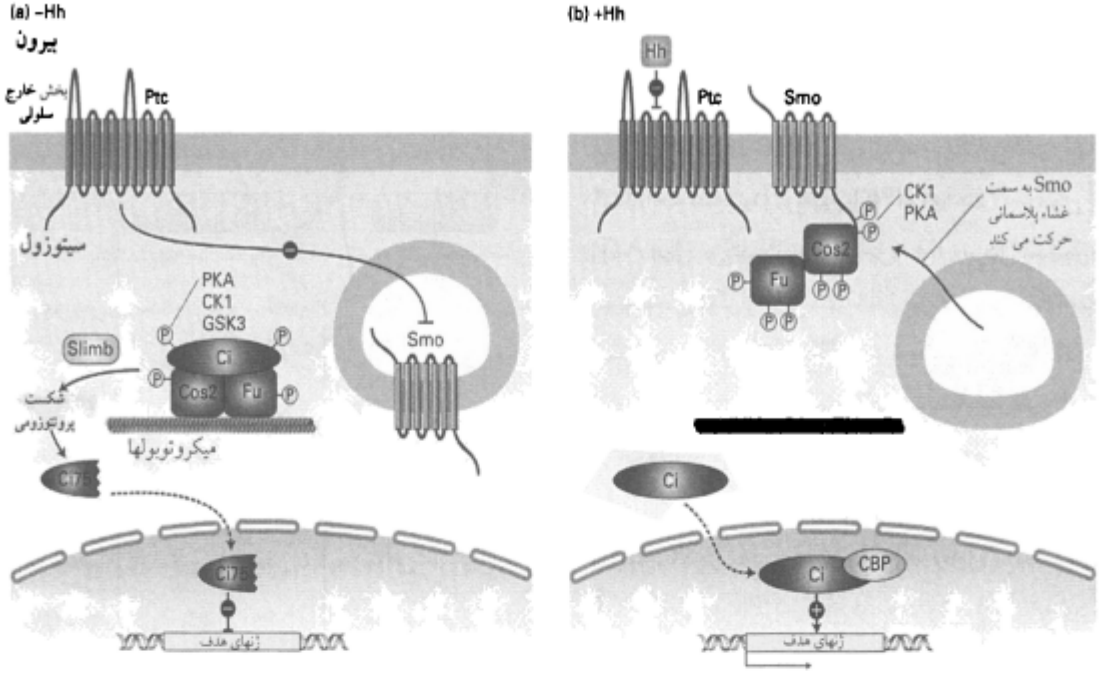
▲ **شکل ۳۳ـ۱۶(شکل رنگی) پردازش پروتئین پیش ساز هجهوگ (Hh)** سلول‌ها یک پیش ساز Hh با وزن ۴۵ کیلو دالتون (kD) سنتز می‌کنند که دچار حمله نوکلئوفیلیک به وسیله زنجیره جانبی تیولی سیستئین ۲۵۸ (Cys-۲۵۸) بر روی کربن گروه کربونیل باقیمانده گلیسین مجاور (Gly-۲۵۷) می‌شود و این حد واسط تیواستر پرانرژی ایجاد می‌کند. سپس فعالیت آنزیماتیک در دُمین C-ترمینال تشکیل یک باند استری رابین گروه کربوکسیل 3-βمتعلق به کلسترول و گلسین ۲۵۷ کاتالیز می‌کند و این پیش ساز را به دو قطعه برش می‌زند. قطعه پیام‌رسان N-ترمینال آن بخش کلسترولی را کسب می‌کند و علاوه بر این با اضافه شدن گروه پالمیتوئیل به N-ترمینال (آبی) آن تغییر می‌کند. تصور می‌شود که این پیرایش غالباً به صورت بین سلولی رخ می‌دهد. این دو لنگر آب‌دوست احتمالاً پروتئین Hh ترشحی و پردازش شده را به غشاء پلاسمایی محکم می‌کند.

مسیر Hh در دروزوفیلا

مطالعات ژنتیکی در دروزوفیلا نشان می‌دهد که دو پروتئین (smo)[1] و (ptc)[2] برای دریافت و انتقال پیام هجهوگ به داخل سلول مورد نیاز است. smo دارای ۷ مارپیچ گذرنده از غشاء است و علاوه بر این از نظر توالی منسوب با گیرنده Wnt (Fz) است. پیش‌بینی می‌شود که ptc حاوی ۱۲ مارپیچ ترانس ممبران باشد و از نظر ساختار بیشترین شباهت را با پروتئین NPC1[3] دارد که عضوی از ابرخانواده ABC[4] پروتئین‌های غشایی است (جدول ۳ـ۱۱ را ملاحظه کنید). پروتئین NPC1 که احتمالاً به عنوان پمپ ATP عمل می‌کند، در تحرک داخل سلولی نرمال استرول‌ها و سوبستراهای دیگر از طریق مسیر انتقال وزیکولی مورد نیاز است. در انسان، جهش در ژن NPC1 موجب یک بیماری نادر اتوزمال مغلوب با نقص در حرکت آندوزوم‌های ثانویه و جابه جایی کلسترول در آندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها همراه است. یک پروتئین منسوب (NPC1LI)، ناقل اصلی ورود کلسترول در روده پستانداران است. احتمالاً Ptc در حدی مشابه با NPC1 تکامل یافته است چون NPC1 (ولی نه Ptc) به وضوح در مخمر وجود دارد. شاید این یک مثال از شیوه‌ای است که عوامل سلولی مورد نیاز برای متابولیسم بنیادی سلول به‌عنوان مسیر پیام‌رسانی تکاملی سازگاری پیدا کرده‌اند. مضاعف شدن ژن NPC1 با تکامل واگرای یکی از نسخه‌ها همراه خواهد بود. شکل ۲۴ـ۱۶ مدل کنونی مسیر هجهوگ (Hh) را نشان می‌دهد (برمبنای کارهای وسیعی که بر روی دروزوفیلا انجام شده است).

مدارک حمایت‌کننده این مدل، از مطالعهٔ جنین مگس با جهش‌های فاقد فعالیت در ژن‌های smo و هجهوگ بدست آمده است. هر دو نوع جنین جهش یافته فنوتیپ‌های تکاملی بسیار مشابه دارند. علاوه بر این، هر دو ژن hh و smo برای فعال‌سازی رونویسی از ژن‌های هدف یکسانی (نظیر patched و wingless) در خلال تکوین جنین موردنیاز می‌باشند. در مقابل، جهش‌های با عدم فعالیت در ژن (ptc)، فنوتیپی کاملاً متفاوت ایجاد می‌کند (یک شباهت با اثر هجوی پروتئین هجهوگ بر روی جنین). لذا به نظر می‌رسد که ptc برای عملکرد هجهوگ به صورت آنتاگونیست عمل می‌کند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که در عدم حضور هجهوگ، ptc ژن‌های هدف را به وسیله‌ی مهار مسیر پیام‌رسانی مورد نیاز برای فعال‌سازی ژن، سرکوب می‌کند. مشاهدات دیگر که نشان دهنده نیاز smo برای رونویسی از ژن‌های هدف در جهش‌های با عدم فعالیت ptc است. این فاکتور را پایین دست ptc در مسیر Hh قرار می‌دهند. این مدارک نشان می‌دهند که هجهوگ به طور مستقیم با ptc اتصال برقرار

1- Smoothened
2- Patched
3-Niemann-Pick C1
4- ABC superfamily



▲ **شکل ۱۶-۳۴. مسیر پیام‌رسانی Hh.** (a) در نبود Hh، پروتئین Ptc(patched)، فاکتور Smoothened (smo) را مهار می‌کند که Smo به طور وسیعی در غشاء وزیکول‌های وجود حضور دارد. کمپلکس حاوی Fused (Fu)، یک کیناز، Costal-2 (Cos2)، یک پروتئین موتور منسوب با کینزین و Ci[1]، یک فاکتور رونویسی با موتیف انگشت روی که به میکروتوبول‌ها متصل می‌شود. Ci در مجموعه‌ای از مراحل با درگیری پروتئین کیناز A(PKA) گلیکوژن سنتاز کیناز 3(GSK3) و کازئین کیناز 1(CK1) فسفریله می‌شود. سپس Ci فسفریله به صورت پروتئولیتیک در یک فرایند نیازمند پروتئین slimb و مسیر یوبیکوئیتین/ پروتئازوم بریده می‌شود و قطعه Ci75 تولید می‌شود که Ci75 به عنوان مهارکننده رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به Hh عمل می‌کند. (b) در حضور Hh، سپس اتصال آن به Ptc، موجب حرکت تعدادی از Ptcها به بخش‌های داخلی و از بین رفتن سرکوب Smo می‌شود.سپس Smo به سمت غشاء پلاسمایی حرکت کرده و پس از فسفریلاسیون به Cos2 متصل می‌شود و علاوه بر این از تجزیه شدن رهایی پیدا می‌کند. هم Fu و هم Cos2 به طور وسیعی فسفریله می‌شوند و Ful/cos2/Ci از میکروتوبول‌ها جدا می‌شود. این منجر به تثبیت Ci با طول کامل (به طور متناسب تغییر یافته) می‌شود و به عنوان فعال‌کننده رونویسی در پیوند با پروتئین CBP[2] عمل می‌نماید.

می‌کند و آن را از بلوکه کردن فعالیت Smo منع کرده و لذا رونویسی از ژن‌های هدف را فعال می‌نماید.

رنگ‌آمیزی ایمنی سلول‌های جنینی ویژه‌ای از دروزوفیلا با آنتی بادی مربوط به Hh، Ptc و Smo، نشان می‌دهد که در نبود هجهوگ، patched در غشاء پلاسمایی و Smo در وزیکول‌های غشایی داخل به وفور یافت می‌شوند. به دنبال اتصال هجهوگ به Ptc، هر دو پروتئین از سطح سلول به سمت وزیکول‌های داخلی حرکت می‌کنند، در حالی که Smo از وزیکول‌های داخلی به طرف سطح حرکت می‌کند. شباهت Patched به پروتئین‌هایی ناقل پیشنهاد می‌کند که در نبود اتصال Hh، یا یک مهارکننده کوچک مولکول را به سمت Smo و یا اینکه یک فعال‌کننده را به دور از آن پمپ می‌کند. این مکانیسم توسط این یافته تأیید می‌شود که شماری از مولکول‌های سنتتیک کوچک و یا طبیعی به Smo متصل شده و فعالیت آن را تنظیم می‌کنند. در نبود پیام Hh، کمپلکس پروتئینی و سیتوزولی مسیر Hh، از سه پروتئین تشکیل شده است (شکل ۱۶-۳۴ قسمت a را ملاحظه کنید): F_u[3] که یک سرین/ ترئونین کیناز است، Cos2[4] که یک پروتئین شبه کینزین متصل شونده به میکروتوبول‌ها و Ci[5] که یک فاکتور رونویسی است. این کمپلکس در سیتوزول به میکروتوبول‌ها متصل می‌شود. فسفریلاسیون Ci توسط حداقل ۳ کیناز موجب اتصال پروتئین Slimb می‌شود. Slimb به نوبه‌ی خود، Ci را یوبیکوئیتینه کرده و آن را به سمت پروتئازوم هدایت می‌کند و Ci متحمل برش پروتئولیتیک می‌شود.

1- CREB binding protein
2- Cubitis interruptus
3- Fused
4- Costal2
5- Cubitis interruptus

قطعه حاصل از Ci (تحت نام Ci75) به هسته نقل مکان کرده و بیان ژن‌های هدف Hh را سرکوب می‌کند. اتصال هجهوگ به Ptc فعالیت آن را مهار می‌کند (شاید توسط بلوکه کردن فرایند پمپاژ، که مهار Smo را از بین می‌برد (شکل ۳۴-۱۶ قسمت a را ملاحظه کنید). چندین پاسخ توسط اتصال Hh آغاز می‌شوند: برخی از Patched توسط سلول‌های گیرنده جذب می‌شوند. Smoothened توسط دو پروتئین کیناز فسفریله می‌شود و به سمت غشاء پلاسمایی حرکت می‌کند و فسفریلاسیون Fu و Cos2 افزایش می‌یابد. علاوه بر این، کمپلکس Fu، Cos2 و Ci از میکروتوبول‌ها جدا می‌شوند و Cos2 به دُم C-ترمینال Smoothened متصل می‌شود. نتیجه حاصل از تخریب کمپلکس Fus/Cos2/Ci، کاهش فسفریلاسیون و کاهش برش Ci است. از این رو، شکل تغییر یافته‌ای از Ci با طول کامل ایجاد می‌شود و به هسته نقل مکان کرده و در آنجا به پروتئین کمک فعال‌کننده رونویسی متصل به CREB متصل شده (CBP) و موجب بیان ژن‌های هدف می‌شود.

مسیر Hh در پستانداران: مسیر پیام‌رسانی Hh در پستانداران از نظر بسیاری از ویژگی‌ها با مسیر دروزوفیلا مشترک هست، اما چندین تفاوت چشمگیر وجود دارد. نخست اینکه ژنوم پستانداران حاوی ۳ ژن hh و دو ژن ptc است که در میان بافت‌های گوناگون به طور متناوب بیان می‌شوند. دوم اینکه، پستانداران ۳ فاکتور رونویسی Gli را بیان می‌کنند که نقش‌های پروتئین منفرد Ci را در دروزوفیلا از هم جدا کرده‌اند. سوم اینکه، به نظر نمی‌رسد اُرتولوگ برای Cos2 در پستانداران وجود داشته باشد و مضاف بر اینکه نقش احتمالی ارتولوگ‌های Fu مبهم است.

جذاب‌ترین جنبه مسیر Hh در پستانداران درگیری پروتئین‌های به تازگی شناخته شدهٔ IFT[1] است. پروتئین‌های IFT برای حرکت مواد به داخل تاژک‌ها[2] و مژک‌ها[3] (ساختارهای طویل پوشاننده غشاء پلاسمایی که از سطح سلول بیرون می‌آیند) مورد نیاز می‌باشند. نقش‌های مژک‌های فراوان در نای در حرکت مواد در طول سطح مربوط به آن و همچنین تاژک‌ها در تحرک اسپرم به خوبی شناخته شده است (فصل ۱۸). ولیکن اکثر سلول‌ها، یک مژک بی‌حرکت تحت عنوان مژک اولیه[4] دارند. عملکرد مژک اولیه نسبتاً غیرمشهود است ولیکن مدارک رو به افزایش برای درگیری آن در انتقال پیام وجود دارد (به ویژه در مسیر پیام‌رسانی Hh در پستانداران). برای مثال، جهش‌هایی که فعالیت IFT را از بین می‌برند، موجب القاء ژن‌های هدف مربوط به مسیر Hh می‌شود (مشابه با اثر جهش‌های غیرفعال‌کننده Patched) علاوه بر این، تعدادی از عوامل مسیر Hh، مانند Smoothened تا حدودی در مژک اولیه قرار دارند. مژک اولیه احتمالاً جایگزین ظاهراً مفقود پروتئین شبکه کینزین Cos2 است که در مسیر Hh در دروزوفیلا یافت می‌شود. نبود پروتئین‌های IFT در مسیر پیام‌رسانی Hh در دروزوفیلا، برخی از حمایت‌ها را برای این فرضیه جایگزینی فراهم می‌کند.

ما قبلاً مثال‌هایی را از چگونگی اثر عبور و مرور گیرنده‌های سطح سلول بر میزان وجود آنها بر روی غشاء پلاسمایی و لذا توانایی پیام رسانیشان را مشاهده کردیم. شیوه شرکت Cos2 در مگس‌ها و پروتئین‌های IFT در پستانداران در عبور و مرور Smoothened هنوز مشخص نیست. به وضوح مطالب بسیاری در مورد کمپلکس مرتبط بین انتقال پیام گیرنده و عبور و مرور پروتئین در داخل سلول ریشه که باید آموخت.

تنظیم مسیر پیام‌رسانی Hh

کنترل پس نورد مسیر Hh اهمیت دارد زیرا پیام‌رسانی عنان گسیخته مسیر Hh می‌تواند موجب رشد فزاینده سرطان و تشکیل انواع سلول‌های نادرست شود. در دروزوفیلا، یکی از ژن‌های القاء شده توسط پیام Hh، ژن Patched است. به دنبال افزایش در بیان Patched، با پیام Hh در مقیاس وسیعی با کاهش در ذخیره پروتئین Smoothened مخالفت می‌کند. از این رو، این سیستم به عنوان یک پشتیبان عمل می‌کند: چنانچه در خلال تکوین میزان بسیار زیادی پیام Hh سنتز شود، نتیجه افزایش در Patched جبران خواهد شد، و در صورتی که مقدار بسیار کمی از پیام Hh سنتز شود، میزان Patched کاهش می‌یابد.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۶

فعال‌سازی رونویسی ژن توسط گیرنده‌های سطح سلولی هفت بار گذرنده از غشاء

- پائین دست گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین فعال‌شده، فعال‌سازی القاء شده با پیام پروتئین کیناز A (PKA)، اغلب منجر به فسفریلاسیون پروتئین CREB هسته‌ای می‌شود که همراه با کمک فعال‌کننده CBP/300 رونویسی بیشتر ژن‌های هدف را تحریک می‌کند (شکل ۳۱-۱۶ را ملاحظه کنید).

1- Intraflagellar transport

2- Flagella 3- Cilia

4- Primary cilium

■ کمپلکس ارستین - GPCR چندین کیناز سیتوزولی را فعال می‌کنند و آبشارهایی را شروع می‌کنند که منجر به فعال‌سازی رونویسی بسیاری از ژنهای کنترل‌کننده رشد سلولی می‌شوند (شکل ۲۷-۱۵ را ملاحظه کنید).

■ هر دو پروتئین پیامی هجهوگ و Wnt دارای لنگرهای لیپیدی هستند که می‌توانند آنها را به غشاءهای سلولی متصل کنند، بدانجهت محدوده پیام‌رسانی آنها کاهش می‌یابد.

■ پیام‌های Wnt از طریق دو پروتئین سطح سلولی عمل می‌کنند گیرنده فریزلد و کمک گیرنده Lrp، و یک کمپلکس درون سلول دارای بتاکاتنین (شکل ۳۲-۱۶ را ملاحظه کنید) اتصال Wnt پایداری و قرارگیری هسته‌ای بتاکاتنین را باعث می‌شود که یا به طور مستقیم و یا به طور غیر مستقیم فعال‌سازی فاکتور رونویسی TCF را باعث می‌شود.

■ پیام هجهوگ از طریق دو پروتئین سطح سلولی (Smoothened و Patched) و یک کمپلکس درون سلولی دارای فاکتور رونویسی کوبی‌تیس اینتر رویتوس (Ci) نیز عمل می‌کند (شکل ۳۴-۱۶ را ملاحظه نمائید). یک شکل فعال Ci در حضور هجهوگ تولید می‌شود یک قطعه مهاری Ci در غیاب هجهوگ تولید می‌شود. هر دو پروتئین Patched و Smoothened قرارگیری سلولی‌شان را در پاسخ به هجهوگ متصل به Patched تغییر می‌دهند.

۱۶-۷ مسیرهایی که پیام رسانی مستلزم برش در پروتئین است

تمامی مسیرهای پیام‌رسانی که تاکنون بحث شده‌اند، برگشت پذیرند و لذا قادر به خاموش شدن نسبتاً سریع در صورت حذف پیام هستند. در این بخش، ما چندین مسیر الزاماً غیرقابل برگشت را بحث می‌کنیم که عوامل آن به صورت پروتئولیتیک برش می‌خورند. در ابتدا مسیر NF-κB را مطالعه می‌کنیم که یک فاکتور رونویسی غیرفعال است که توسط اتصال به یک مهارکننده در سیتوزول متوقف می‌شود (شکل ۱-۱۶ قسمت g را ملاحظه کنید). برخی از شرایط القاءکننده استرس، موجب تجزیه فوری مهارکننده شده و سلول‌ها را قادر به پاسخ دادن فوری و شدید با فعال سازی رونویسی از ژن می‌کنند. متعاقباً مسیرهای پیام‌رسانی لازم در برش پروتئین خارج از سلول توسط اعضاء خانواده‌ها متالوپروتئازهای ماتریکس[1] یا MMP را بررسی می‌کنیم.

برای مثال در مسیر Notch/Delta (شکل ۱-۱۶ قسمت h را ملاحظه کنید)، MMP خارج سلولی، گیرنده را می‌برد و این با برش آن در داخل غشاء پلاسمایی توسط پروتئازهای مختلف دنبال می‌شود. این مسیر سرنوشت انواع بسیار زیادی از سلول‌ها را در خلال تکوین تعیین می‌کند.

بسیاری از فاکتورهای رشد مانند اعضاء خانواده EGF[2] به صورت پیش سازهای گذرنده از غشاء ساخته می‌شوند. برش این پروتئین‌ها توسط متالوپروتئازهای ماتریکس سبب رهاسازی فاکتور رشد فعال به داخل محیط خارج سلولی می‌شود. این فرایند در بسیاری از سرطان‌ها دچار اشتباه می‌شود واحتمالاً مسبب اغلب فجایع عظیم قلبی است. برش نامناسب MMP (پروتئین گذرنده از غشاء) در آسیب‌شناسی بیماری آلزایمر درگیر می‌شود. بحث ما با شرح حال برش داخل غشایی فاکتور رونویسی پیش ساز در داخل غشاءگلژی در پاسخ به سطح پایین کلسترول خاتمه می‌یابد. این مسیر برای حفظ تعادل مناسب کلسترول و فسفولیپیدها به منظور تشکیل غشاء سلولی ضروری است (فصل ۱۰).

تجزیه پروتئین مهارکننده، فاکتور رونویسی NF-κB را فعال می‌کند

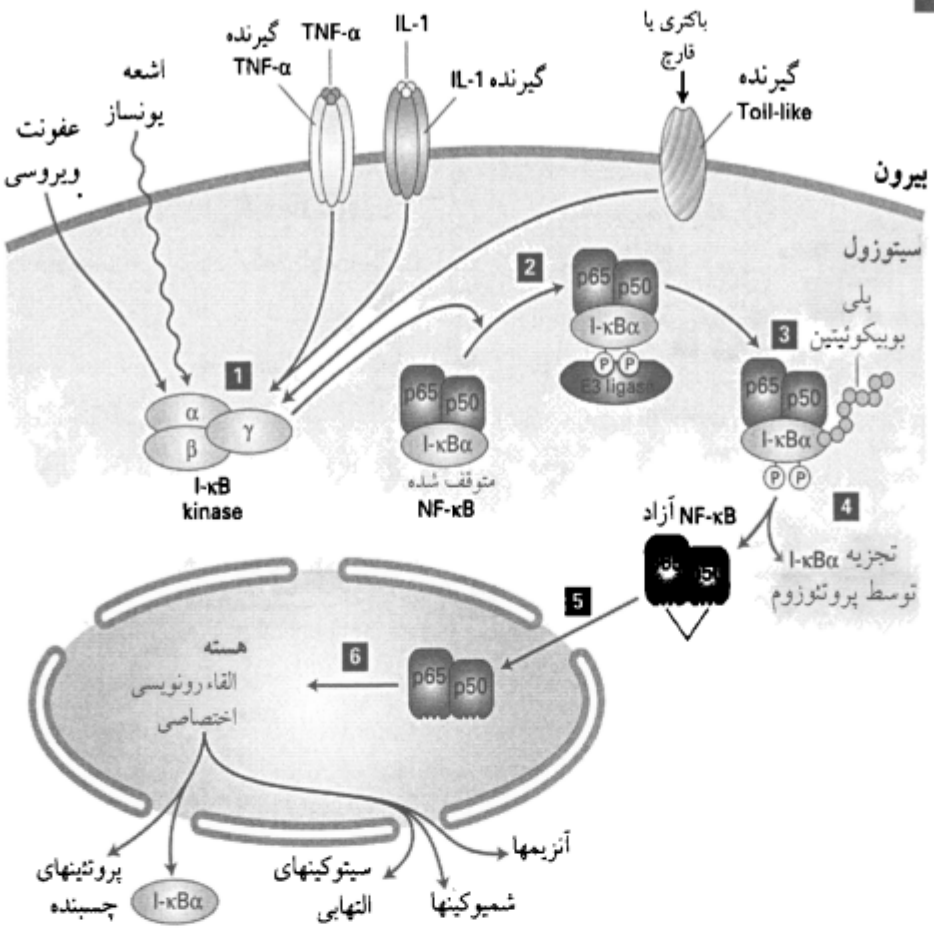
مثال‌های یاد شده در بخش‌های قبلی، مانند گیرنده‌های TGFβ و MMP کینازها، اهمیت فسفریلاسیون القاء شده با پیام را در تنظیم فعالیت بسیاری از فاکتورهای رونویسی نشان داد. مکانیسم دیگر برای تنظیم فعالیت فاکتور رونویسی در پاسخ به پیام‌های خارج سلولی در مطالعه بر روی هم سلول‌های پستانداران و هم دروزوفیلا نشان داده شد. این مکانیسم، که فسفریلاسیون و تجزیه متعاقب با واسطه‌ی یوبیکوئیتین یک پروتئین مهاری را درگیر می‌کند، به وسیله فاکتور رونویسی NF-κB نشان داده می‌شود.

NF-κB به سرعت در سلول‌های سیستم ایمنی پستانداران در پاسخ به عفونت ویروسی و یا باکتریایی و علاوه بر این تعداد دیگری از شرایط استرس نظیر اشعه یونیزه کننده فعال می‌شود. همانطور که در فصل ۲۴ خواهیم آموخت، مسیر NF-κB در برخی سلول‌های سیستم ایمنی هنگام اتصال عوامل دیواره سلولی باکتریایی یا قارچ‌ها به گیرنده‌های Toll-like بر روی سطح سلول فعال می‌شود. این مسیر همچنین به وسیله سیتوکین‌های التهابی مانند TNFα[3] و

1- Matrix metaloprotein family

2- Epidermal growth factor

3- Tumor necrosis factor alpha



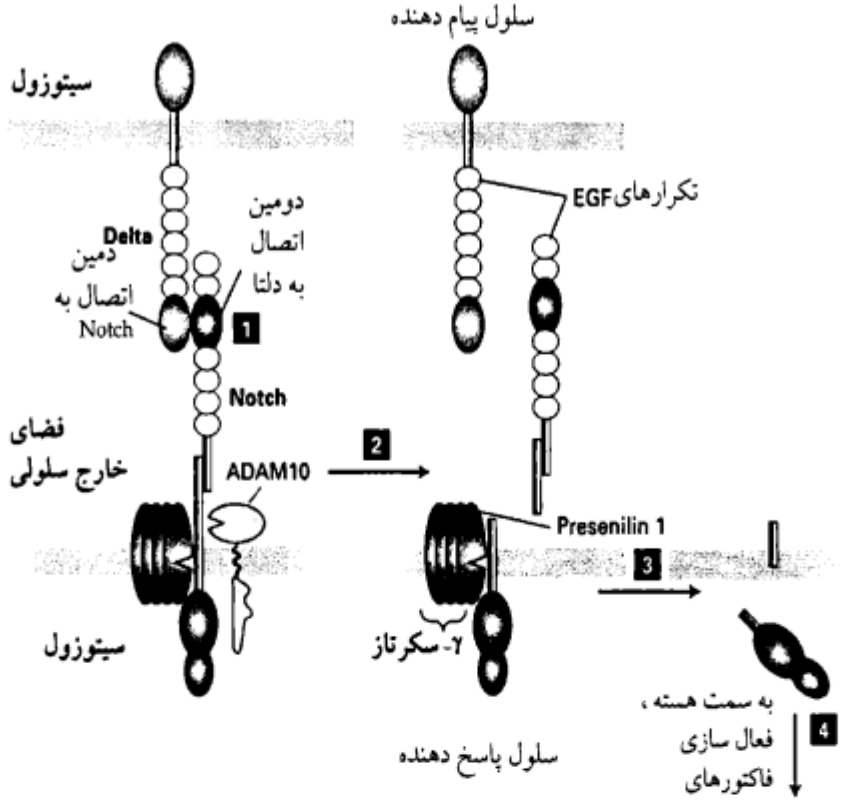
شکل ۱۶-۳۵ مسیر پیام‌رسانی NF-κB: در سلول‌های در حال استراحت، فاکتور رونویسی دیمر NF-κB از زیرواحدهای P65 و P50 تشکیل شده است و در سیتوزول متوقف شده و به مهارکننده I-κB متصل می‌شود. مرحله ❶: فعال‌سازی I-κB کیناز ترایمر، توسط بسیاری از عوامل از جمله عفونت ویروسی، اشعه یونیزان، اتصال سیتوکین‌های پیش التهابی NF-κB یا IL-1 به گیرنده‌های مربوط به آنها و یا فعال‌سازی هر یک از گیرنده‌های Toll-Like مختلف توسط عوامل مهاجم باکتریایی یا قارچی تحریک می‌شود. مرحله ❷: I-κB سپس کیناز مهارکننده، I-Bα را فسفریله می‌کند و متعاقب آن به یوبیکوئیتین لیگاز E3 متصل می‌شود. مرحله ❸ و ❹ : پلی یوبیکوئیتیناسیون بعدی I-κB آن را برای تجزیه شدن توسط پروتئازوم هدف قرار می‌دهد. مرحله ❺ : حذف I-κB، NLS را در هر دو زیرواحد NF-κB آشکار می‌کند و امکان نقل مکان آن به هسته فراهم می‌شود. مرحله ❻: در هسته NF-κB رونویسی از تعداد زیادی از ژن‌های هدف را مانند ژن رمزکننده $I\text{-}\kappa B_\alpha$ (که این برای خاتمه پیام‌رسانی عمل می‌نماید) و ژن‌ها رمزکننده سیتوکین‌های التهابی مختلف (آغاز کننده پیام) را فعال می‌کند.

IL-1[1] فعال می‌شود که توسط سلول‌های نزدیک در پاسخ به عفونت ترشح می‌شوند. در تمامی موارد، اتصال لیگاند به گیرنده‌اش تجمع کمپلکس مولتی پروتئین را در سیتوزول القاء می‌نماید. تشکیل این کمپلکس یک مسیر پیام‌رسانی را آغاز می‌کند که باعث فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-κB می‌شود.

در ابتدا NF-κB بر پایه فعال‌سازی رونویسی ژن رمزگذار زنجیره سبک آنتی بادی‌ها (ایمنوگلوبین‌ها) در سلول‌های B کشف شد. اکنون تصور می‌شود که تنظیم‌کننده اصلی رونویسی سیستم ایمنی در پستانداران باشد. به رغم آنکه مگس‌ها آنتی بادی سنتز نمی‌کنند، هومولوگ‌های NF-κB در دروزوفیلا سنتز تعداد زیادی از پپتیدهای ترشحی ضدمیکروبی را در پاسخ به عفونت ویروسی و باکتریایی القاء می‌کنند (فصل ۲۴). این پدیده نشان می‌دهد که سیستم تنظیمی NF-κB در طی تکوین حفظ شده است و این بیشتر از نیم بیلیون سال پیش است.

مطالعات بیولوژیکی در سلول‌های پستانداران و مطالعات ژنتیکی در مگس‌ها درک مهمی را در مورد کارکرد مسیر NF-κB فراهم کرده است. دو زیرواحد هترودایمر NF-κB (P50 و P65) واجد ناحیه مشابهی در N-ترمینالشان هستند که برای دیمریزاسیون

1- Interleukin - 1



▲ **شکل ۳۶ـ۱۶ مسیر پیام‌رسانی Delta/Notch**. در فقدان دلتا، زیرواحد خارج سلولی نوتچ بر روی سلول پاسخ دهند. به صورت غیرکوالان با زیرواحد سیتوزولی ترانس ممبران آن اتصال برقرار می‌کند. وقتی که نوتچ (Notch) به لیگاند دلتا در روی سلول پاسخ دهنده مجاور متصل می‌شود (مرحله ❶)، در ابتدا نوتچ توسط متالوپروتئاز ماتریکس تحت عنوان ADAM (متصل به غشاء) برش می‌خورد و قطعه خارج سلولی Notch رها می‌شود (مرحله ❷). سپس گاماسکرتاز (کمپلکسی از چهار پروتئین غشایی از جمله پروتئاز فرضی presenilin-1) با بخش باقیمانده نوتچ متصل شده و یک برش داخل غشایی را کاتالیز می‌کند که قطعه سیتوزولی نوتچ را رها می‌کند (مرحله ❸). پس از انتقال به هسته، این بخش نوتچ با تعدادی از فاکتورهای رونویسی به منظور اثر بر روی بیان ژن‌ها میانکنش می‌کند که این ژن‌ها به نوبه خود تعیین سرنوشت سلول در خلال رشد و تکامل را تحت تأثیر قرار می‌دهد (مرحله ❹).

آنها و اتصال به DNA لازم است. در سلول‌هایی که دچار استرس یا پاسخ به علائم عفونت نمی‌شوند، NF-κB در وضعیت غیرفعال در سیتوزول توسط اتصال مستقیم به مهارکننده‌ای تحت عنوان I-κB متوقف می‌شود. یک مولکول از I-κB به دُمین‌های جفت شده N-ترمینال هترودایمر P65/P50 متصل می‌شود و بدین وسیله NLS[1] آنها را می‌پوشاند. کمپلکس پروتئین کیناز تحت عنوان I-κB کیناز نقطه تلاقی تمامی پیام‌های خارج سلولی فعال‌کننده NF-κB است. در مدت چند دقیقه بعد از تحریک سلول توسط یک عامل عفونت‌زا یا سیتوکین التهابی، I-κB کیناز فعال شده و دو ریشه سرین N-ترمینال را بر روی I-κB فسفریله می‌کند (شکل ۳۵ـ۱۶ مراحل ❶ و ❷). سپس یوبیکوئیتین لیگاز E3 به این فسفوسرین‌ها متصل شده و I-κB را پلی‌یوبیکوئیتینه نموده و موجب تجزیه فوری آن به وسیله پروتئازوم می‌شود (مراحل ❸ و ❹). در سلول‌های بیان‌کننده شکل جهش یافته I-κB که این دو سرین به آلانین تغییر کرده‌اند و لذا نمی‌توانند فسفریله شوند، NF-κB دائماً غیرفعال است. این امر نشان می‌دهد که فسفریلاسیون I-κB برای مسیر فعال‌سازی الزامی است.

تجزیه I-κB، NLS را بر روی NF-κB در معرض قرار می‌دهد که این نیز سپس به هسته نقل مکان کرده و رونویسی انبوهی از ژن‌های هدف را فعال می‌کند (شکل ۳۵ـ۱۵، مراحل ❺ و ❻). برخلاف فعال‌سازی NF-κB به وسیله پروتئولیز، پیام‌رسانی آن سرانجام توسط حلقه پس نورد منفی خاموش می‌شود (به دلیل اینکه یکی از ژن‌هایی که رونویسی آن فورا توسط NF-κB القاء می‌شود، I-κB را رمزدهی می‌کند). افزایش سطح پروتئین I-κB حاصله، در هسته به NF-κB فعال متصل شده و آن را به سیتوزول باز می‌گرداند. در بسیاری از سلول‌های سیستم ایمنی، NF-κB

1- Nuclear localization signals

رونویسی بیش از ۱۵۰ ژن را تحریک می‌کند از جمله ژن‌های رمزدهنده سیتوکین‌ها و کموکین‌ها. (کموکین‌ها سلول‌های سیستم ایمنی دیگر را به محل عفونت جذب می‌کنند.) NF-κB همچنین به بیان گیرنده‌های پروتئینی کمک می‌کند که امکان مهاجرت نوتروفیل‌ها (نوعی از سلول‌های سفید خون) از خون به بافت اصلی را فراهم می‌کند (شکل ۳۶-۱۹ را ملاحظه کنید). علاوه بر این، NF-κB بیان iNOS (ایزفروم قابل القاء آنزیمی که اکسید نیتریک را تولید می‌کند) تحریک می‌کند که یک سم برای سلول‌های باکتری است. علاوه بر این بیان تعدادی از پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی را تحریک می‌کند. از این رو این فاکتور رونویسی منفرد دفاع بدن را یا به طور مستقیم توسط پاسخ به بیماری‌زاها و استرس و یا به طور غیرمستقیم توسط پاسخ به مولکول‌های پیام‌رسان رها شده از عفونت‌های دیگر یا سلول و بافت‌های آسیب دیده هماهنگ و فعال می‌کند. علاوه بر نقش NF-κB در التهاب و ایمنی، این پروتئین نقش کلیدی در طی تکوین پستانداران ایفاء می‌کند. برای مثال، NF-κB برای بقاء سلول‌های در حال رشد کبدی ضروری است. جنین موش‌هایی که قادر به بیان یکی از زیرواحدهای I-κB کیناز نیستند، در اواسط دوره جنینی می‌میرند و به علت تخریب کبد در نتیجه آپوپتوز بیش از حد سلول‌هایی که در حالت طبیعی بقاء خواهند داشت.

همانطور که در فصل ۲۰ خواهیم دید، تجزیه وابسته به فسفریلاسیون مهارکننده وابسته به سیکلین کیناز نقش مهمی را در تنظیم پیشرفت سرتاسر چرخه سلولی در ساکارومایسس سرویزیه ایفاء می‌کند. به نظر می‌رسد که تجزیه پروتئین وابسته به فسفریلاسیون به عنوان یک مکانیسم تنظیمی مشترک در بسیاری از فرایندهای مختلف سلولی ظاهر می‌شود.

نوتچ فعال شده با لیگاند دو بار بریده می‌شود و یک فاکتور رونویسی را رها می‌نماید

هم گیرنده نوتچ و هم لیگاند آن تحت عنوان دلتا، پروتئین‌های ترانس ممبران یک بار گذرنده از غشاء هستند که بر روی سطح سلول یافت می‌شوند. نوتچ لیگاندهای دیگری نیز دارد مانند سرّات[1]، ولی مکانیسم مولکولی فعال‌سازی لیگاندها با یکدیگر همسان است. دلتا به نوتچ متصل می‌شود تا اینکه با فعال کردن نوتچ متحمل وقوع دوبار برش شود و این امر باعث رها شدن دُمین سیتوزولی نوتچ می‌شود که به عنوان فاکتور رونویسی عمل می‌کند. به منظور وقوع فعال‌سازی، نوتچ و دلتا باید در غشاء سلول‌های مجاور قرار بگیرند. قرارگیری آنها در سلول‌های مختلف الزامی است، به دلیل اینکه آنها در فرایند تمایز فوق العاده محافظت شده و هم در مهره داران و هم در بی مهرگان با نام **مهار جانبی**[2] شرکت می‌کنند.

در این فرایند، سلول‌های مجاور و یکسان از نظر تکاملی، سرنوشت‌های کاملاً متفاوتی را نشان می‌دهند. در نتیجه، یک سلول در یک گروه سلولی یکسان به سلول‌های مجاورش به انتخاب سرنوشت متفاوت فرمان می‌دهد. این فرایند (در فصل ۲۲ به طور مشروح بحث شده است) به طور ویژه در مهار شکل گرفتن تعداد بسیار زیادی از سلول‌های عصبی پیش ساز از یک لایه تمایز نیافته سلول‌های اپتیلیال مهم است.

پروتئین نوتچ به صورت یک پروتئین مونومری غشایی در شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شود. در کمپلکس گلژی، متحمل برش پروتئولیتیک می‌شود که یک زیرواحد خارج سلولی و یک زیرواحد سیتوزولی ترانس ممبران ایجاد می‌کند. این دو زیرواحد در فقدان میانکنش با دلتای موجود بر روی سلول دیگر به صورت غیرکوالان در حال اتصال با یکدیگر باقی می‌مانند. به دنبال اتصال دلتا، پروتئین دلتا بر روی سلول پاسخ دهنده متحمل دو برش پروتئولیتیک می‌شود (شکل ۳۶-۱۶). نخستین برش به وسیله ADAM10 (یک متالوپروتئاز ماتریکس) کاتالیز می‌شود (نام ADAM نماینده دیس اینتگرین[3] و متالوپروتئاز است). دیس اینتگرین به دیگر دُمین ADAM اطلاق می‌گردد که به اینتگرین متصل شده (فصل ۱۹) و میانکنش سلول - ماتریکس را متلاشی می‌کند. دُمین برش در داخل ناحیه آبگریز گذرنده از غشاء نوتچ رخ می‌دهد و توسط یک کمپلکس ترانس ممبران تشکیل شده از چهار پروتئین با نام گاماسکرتاز کاتالیز می‌شود. این برش قطعه سیتوزولی نوتچ را آزاد می‌کند که فوراً به هسته نقل مکان کرده و رونویسی از مجموعه‌ای از ژن‌های هدف را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این پروتئولیز داخل غشایی تنظیمی القاء شده با پیام (RIP)[4] همچنین در پاسخ سلول‌ها به کلسترول پایین و وجود پروتئین‌های تا نشده در شبکه آندوپلاسمی (فصل ۱۳) رخ می‌دهد.

کمپلکس گاماسکرتاز حاوی یک پروتئین با نام prese linin-1 و سه زیرواحد ضروری دیگر (aph-۱ و pen-۲ و

1- Serrate
2- lateral inhibition
3-Disintegrin
4- Regulated intramembrane proteolysis (RIP)

nicastrin) است. (PS1) presenilin-1 در ابتدا به عنوان محصول یک ژن شناسایی شد که عموماً در بیماران با شکل پیش رس غالب اتوزومال عارضه آلزایمر جهش می‌یابد. مطالعات بر روی سلول‌های فاقد nicastrin علت اینکه گاماسکرتاز فقط قادر به برش پروتئین‌هایی است که در ابتدا توسط ADAM یا متالوپروتئاز دیگر ماتریکس برش خورده باشد را نشان داد. Nicastrin به ریشه (stump) خارج سلولی مربوط به N-ترمینال پروتئین غشایی متصل می‌شود که توسط نخستین پروتئاز ایجاد می‌شود (شکل ۱۶ـ۳۶ را ملاحظه کنید). بدون این ریشه، nicastrin و لذا کمپلکس کامل گاماسکرتاز قادر به میانکنش با پروتئین هدفش نیست. ما نقش پروتئین‌های ADAM و گاماسکرتاز را در رشد و تکامل و سپس در عارضه آلزایمر بررسی می‌کنیم.

در دروزوفیلا، قطعه داخل سلولی رها شده نوتچ، کمپلکس را با پروتئین اتصالی به DNA با نام سرکوبگر تاسی یا Su(H) تشکیل می‌دهد. این کمپلکس رونویسی بسیاری از ژن‌هایی را که اثر نهایی‌شان اثر بر روی تعیین سرنوشت سلول در خلال رشد و تکامل است را تحریک می‌کند. یکی از پروتئین‌های افزایش یافته در این حالت خود نوتچ است و علاوه بر این تولید دلتا به همین نسبت کاهش می‌یابد (شکل ۲۲ـ۴۲ را ملاحظه کنید). همانطور که در فصل ۲۲ می‌بینیم، تنظیم متقابل گیرنده و لیگاند به این طریق، مشخصه ضروری میانکنش بین سلول‌های ابتدایی یکسان است که موجب می‌شود آنها سرنوشت سلولی متفاوتی را به خود بگیرند.

مطالعات بیشتر و کسب چندین ردیف از مدارک، آشکار کرده‌اند که مسیر نوتچ توسط بسیاری از توازن‌ها و کنترل‌های داخلی با دقت تنظیم می‌شود. مطالعات ژنتیکی در دروزوفیلا منجر به کشف پروتئین Fng[1] شد. این فاکتور یک گلیکوزیل ترانسفراز است که فعالیت نوتچ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در شبکه ترانس گلژی (فصل ۱۴)، Fng ریشه‌ای فوکوز را به ناحیه‌ای در دُمین خارج سلولی نوتچ اضافه می‌کند. این تغییر نوتچ را به سمت حساسیت بیشتر نسبت به لیگاند دلتایش در مقایسه با لیگاند سرّات متمایل می‌کند. در مهره داران، سه پروتئین رنگارنگ که پروتئین‌های منسوب به Fringe نامیده می‌شوند (Lunatic Fringe، Manic Fringe و Radical fringe) حساسیت نسبی نوتچ را به سه لیگاندش (دلتا، Jagged-1 و Jagged-2) تغییر می‌دهد. در مگس‌ها و در پستانداران گرایش تحمیل شده توسط پروتئین‌های Fng، نتایج تکاملی را تحت تأثیر قرار می‌دهند زیرا Fng گیرنده نوتچ را در برخی از سلول‌ها تغییر می‌دهد.

متالوپروتئازهای ماتریکس، برش بسیاری از پروتئین‌های پیام‌رسان را از سطح سلول کاتالیز می‌کنند

بسیاری از مولکول‌های پیام‌رسان به صورت پروتئین‌های ترانس ممبران سنتز می‌شوند که دُمین پیام رسانشان به فضای خارج سلولی امتداد پیدا می‌کنند. این پروتئین‌های پیام‌رسان اغلب از نظر بیولوژیکی فعال هستند ولیکن می‌توانند فقط پیام را با اتصال به گیرنده‌ها بر روی سلول‌های مجاور انتقال دهند. دلتا یک مثال خوب از این پیام متصل شده به غشاء است که اثرات کاملاً موضعی دارند. با این حال، بسیاری از فاکتورهای رشد و پروتئین‌های پیامی دیگر به صورت پیش سازهای ترانس ممبران سنتز می‌شوند که برش آنها مولکولی پیام‌رسان محلول و فعال را به داخل فضای خارج سلولی رها می‌کند. ژنوم انسان ۱۹ متالوپروتئاز به صورت خانواده ADAM رمز می‌کند و اغلب آنها در برش پیش سازهای پروتئین‌های پیام‌رسان تنها در خارج از قطعه ترانس ممبران آنها دخالت می‌کنند. پروتئولیز با واسطه ADAM از این پیش سازها، مشابه با برش نوتچ توسط ADAM10 است (شکل ۱۶ـ۳۶ را ملاحظه کنید). به استثنای اینکه قطعه خارج سلولی رها شده دارای فعالیت پیام‌رسانی است. فعالیت ADAM و به این دلیل رهایی پروتئین‌های پیام‌رسان فعال باید به شدت توسط سلول تنظیم شود، اما شیوه‌ای که وقوع آن تاکنون مبهم است اختلال در مکانیسم‌های متعلق به تنظیم ADAM پروتئازها می‌تواند منجر به تکثیر نابهنجار سلول شود

مثال‌های مهم از نظر پزشکی مربوط به برش تنظیم شونده پیش ساز پیام‌های پروتئینی، اعضاء خانواده EGF مانند EGF، HB-EGF، TGF-α، NRG1 و NRG2 هستند (شکل ۱۶ـ۱۸ را ملاحظه کنید). افزایش فعالیت یک یا تعداد بیشتری از ADAMها که در بسیاری از سرطان‌ها مشاهده می‌شود، می‌تواند باعث ایجاد سرطان به دو روش شود. نخست اینکه، تشدید فعالیت ADAM می‌تواند منجر به افزایش میزان فاکتورهای رشد خارج سلولی از خانواده EGF شود که سلول‌های ترشحی (پیام‌رسانی اتوکرین) یا سلول‌های مجاور (پیام‌رسانی پاراکرین) را به سمت تکثیر نامناسب تحریک می‌کند. دوم اینکه، با تخریب اجزاء تشکیل شده ماتریکس خارج سلولی، تصور می‌شود که افزایش فعالیت ADAM، متاستاز (حرکت سلول‌های توموری به جایگاه‌های دیگر در بدن) را تسهیل می‌کند.

پروتئازهای ADAM همچنین فاکتور مهمی در عارضه قلبی

1- Fringe

هستند. همانطور که در فصل گذشته آموختیم، فعال‌سازی گیرنده‌های β- آدرنرژیک توسط آدرنالین در عضله قلبی موجب گلیکوژنولیز و افزایش در سرعت عضله قلب می‌شود. ولیکن تیمار طولانی مدت سلول‌های عضله قلب با اپی‌نفرین منجر به فعال‌سازی ADAM9 توسط مکانیسم ناشناخته‌ای می‌شود. این متالوپروتئاز ماتریکس، پیش ساز ترانس ممبران HB-EGF را برش می‌دهد. سپس HB-EGF رها شده، به گیرنده‌های EGF بر روی سلول‌های عضله قلبی متصل شده و رشد نامناسب آنها را تحریک می‌نماید. این تکثیر بیش از حد می‌تواند منجر به ایجاد قلبی بزرگ اما ضعیف شود (شرایط شناخته شده با عنوان بزرگ شدن قلب[1] که ممکن است منجر به مرگ زودرس شود).

برش نامناسب پروتئین پیش ساز آمیلوئید می‌تواند منجر به عارضه آلزایمر شود

بیماری آلزایمر اختلال دیگری است که با فعالیت نامناسب متالوپروتئازهای ماتریکس مشخص می‌شود. تغییر پاتولوژیک اصلی مربوط به این بیماری، تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی[2] حاوی دسته‌هایی از پپتیدهای کوچک دارای ۴۲ ریشه با نام $A\beta_{42}$ در مغز است. این پپتید از برش پروتئولیتیک پروتئین APP[3] حاصل می‌شود. APP یک پروتئین ترانس ممبران سطح سلول با عملکرد نامشخص است که به وسیله نورون‌ها بیان می‌شود.

همانند پروتئین نوتچ، APP متحمل یک برش خارج سلولی ویک برش درون غشایی می‌شود (شکل ۱۶-۳۷). نخست، دُمین خارج سلولی در یکی از دو جایگاه توسط ADAM10 یا ADAM17 (اغلب مجموعاً آلفاسکرتاز نامیده می‌شوند) یا به وسیله متالوپروتئاز دیگر ماتریکس با نام بتاسکرتاز برش می‌خورد. سپس در هر دو حالت گاماسکرتاز برش دوم را در همان جایگاه درون غشایی کاتالیز کرده و دُمین سیتوزولی یکسانی از APP اما با پپتیدهای کوچک متفاوت در دو مسیر آزاد می‌کند. مسیر آغاز شده توسط آلفاسکرتاز یک پپتید با ۲۶ ریشه را ایجاد می‌کند که هیچ آسیبی به همراه ندارد. در مقابل، مسیر آغاز شده توسط بتاسکرتاز، پپتید پاتولوژیک $A\beta_{42}$ را ایجاد می‌کند که به طور خود به خود الیگومرهایی را ایجاد می‌کند و سپس پلاک‌های آمیلوئیدی بزرگتر یافت شده در مغز بیماران با عارضه آلزایمر را تشکیل می‌دهند.

با آنالیزهای ژنتیکی درصد کوچکی از بیماران با سابقه فامیلی عارضه آلزایمر، مشخص شده است که APP عامل اصلی این بیماری است. بسیاری از آنها جهش‌هایی در پروتئین APP دارند و مضاف بر اینکه این جهش‌ها در اطراف جایگاه‌های برش آلفا، بتا و گاماسکرتاز جمع می‌شوند (در شکل ۱۶-۳۷ نشان داده شده است). موارد دیگری از بیماری آلزایمر فامیلی، جهش‌های معنی دار در پری سنیلین ۱[4] (زیرواحدی از گاماسکرتاز) را شامل می‌شود که تشکیل پپتید $A\beta_{42}$ افزایش می‌یابد و منجر به تشکیل پلاک و نهایتاً مرگ نورون‌ها می‌شود.

آلفاسکرتاز برش داخل غشایی تنظیم شونده مربوط به بیش از ۱۰۰ پروتئین سطح سلولی مانند نوتچ را کاتالیز می‌کند (شکل ۱۶-۳۶ را ملاحظه کنید). مدارک تائید کننده دخالت زیرواحد مربوط به آنزیم پری سنیلین ۱ آلفاسکرتاز در مسیر پیام‌رسانی نوتچ از مطالعات ژنتیکی در کرم حلقوی الگانس بدست آمده است. جهش در همتای پری سنیلین ۱ در کرم موجب نقایص تکوینی همانند آنچه که برای جهش‌های نوتچ وجود دارد، می‌شود. کارهای بعدی نشان داد نوتچ پستانداران نمی‌تواند متحمل پروتئولیز داخل غشایی القاء شده با پیام در سلول‌های عصبی موش فاقد پری سنیلین ۱ از نظر ژنتیکی، را شوند. اینکه آیا پری سنیلین ۱ یک پروتئاز آلفاسکرتاز واقعی است و یا اینکه یک فاکتور ضروری پروتئاز واقعی است هنوز معین نشده است. در داخل قطعه گذرنده از غشای پری سنیلین ۱، ساختمان فضایی دو ریشه آسپارت همانند آسپارت‌هایی است که در جایگاه فعال آسپارتیل پروتئازهای محلول در آب وجود دارد و جهش در هر یک از این ریشه‌های آسپارتات در پری سنیلین ۱ توانایی آن را در تحریک برش نوتچ متوقف می‌کند. لذا اطلاعات کنونی سازگار با این تصور است که پری سنیلین ۱، پروتئازی می‌باشد که بخش‌های ترانس ممبران نوتچ، App و بسیاری از پروتئین‌های دیگر را برش می‌دهد.

پروتئولیز تنظیم شده داخل غشایی SREBP یک فاکتور رونویسی را رها می‌کند که به منظور حفظ میزان کلسترول و فسفولیپید عمل می‌نماید

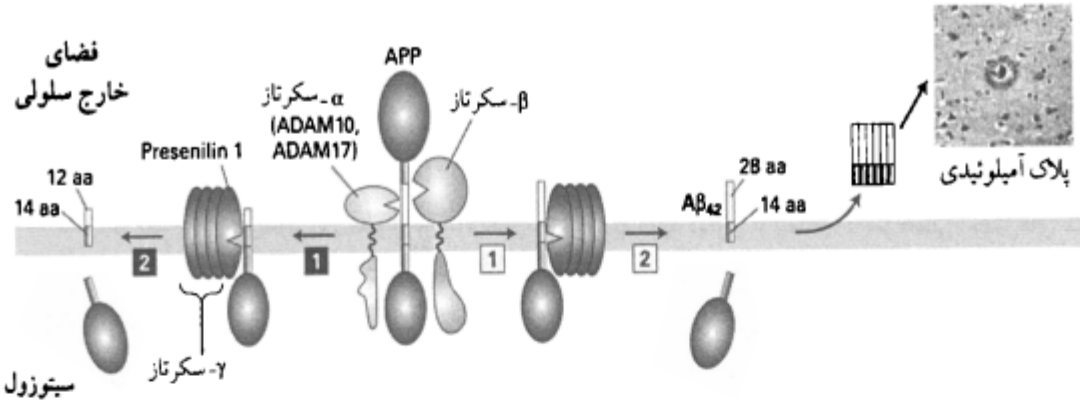
اگر یک سلول لیپید کافی برای ساخت میزان کافی از غشاء را نداشته باشد و یا اینکه مقدار بسیار زیادی کلسترول داشته باشد به

1- Cardiac hypertrophy

2- Amyloid plaques

3- Amyloid precursor protein

4- Presenilin-1



▲ **شکل ۳۷-۱۶ برش پروتئولیتیک APP و عارضه آلزایمر.** (سمت چپ) برش پروتئولیتیک پی در پی توسط آلفاسکرتاز (ADAM17 یا ADAM10) ❶ و گاماسکرتاز ❷ یک پپتید قرار گرفته در غشای بی‌خطر با ۲۶ آمینواسید را تولید می‌کند. (سمت راست) برش دمین خارج سلولی توسط بتاسکرتاز ① با شکست در داخل غشاء توسط آلفاسکرتاز ② دنبال می‌شود و پپتید $A\beta_{42}$ با ۴۲ ریشه را ایجاد می‌کند که به طور خود به خود الیگومر تشکیل داده و سپس پلاک‌های آمیلوئیدی بزرگتر یافت شده در مغز بیماران با عارضه آلزایمر را تشکیل می‌دهد. در هر دو مسیر، قطعه سیتوزولی APP به داخل سیتوزول آزاد می‌شود، ولیکن نقش آن ناشناخته است.

طوری که کریستال‌های بزرگی تشکیل شده و ساختارهای سلولی آسیب بینند، این سلول به زودی با یک بحران رو به رو خواهد شد. برای جلوگیری از این حوادث فاجعه‌آمیز، سلول‌ها به طور طبیعی مقدار پپتید مناسب را توسط تنظیم عرضه و مصرف آنها، حفظ می‌کنند. تنظیم هماهنگ متابولیسم فسفولیپیدها و کلسترول برای حفظ ترکیب صحیح غشاء ضروری است. پروتئولیز تنظیم شده داخل غشایی که در مسیر نوتچ رخ می‌دهد، نقش مهمی را نیز در پاسخ سلول به میزان پایین کلسترول ایفا می‌کند.

همانطور که در فصل ۱۴ یاد گرفتیم، LDL غنی از کلسترول است و در انتقال کلسترول به داخل سیستم گردش خون عمل می‌کند (شکل ۲۷-۱۴ را ملاحظه کنید). هر دو مسیر بیوسنتز کلسترول (شکل ۳۶-۱۰ را ملاحظه کنید) و میزان سلولی گیرنده‌های LDL هنگامی که کلسترول اضافی وجود دارد، دچار تنظیم کاهشی می‌شوند.

چون LDL از طریق آندوسیتوز با واسطه‌ی گیرنده به داخل سلول جذب می‌شود (شکل ۲۹-۱۴ را ملاحظه کنید)، کاهش در تعداد گیرنده‌های LDL منجر به کاهش در ورود کلسترول به سلول می‌شود. هم بیوسنتز کلسترول وهم ورود آن در سطح رونویسی ژن تنظیم می‌شوند. برای مثال، هنگامی که سلول‌های محیط کشت با غلظت فرایند LDL انکوبه می‌شوند، میزان و فعالیت HMG-COA ردوکتاز (آنزیم کنترل‌کننده سرعت بیوسنتز کلسترول) سرکوب می‌شود، در حالی که فعالیت آنزیم آسیل کلسترول - آسیل ترانسفراز (ACAT) که کلسترول را به اشکال ذخیره‌ای استروئیدی تبدیل می‌کند، افزایش می‌یابد.

تنظیم رونویسی وابسته به کلسترول، اغلب به عناصر تنظیمی استرول (SRES)[1] ۱۰ جفت بازی بستگی دارد (SREها در پروموتر ژن‌های هدف تنظیم شونده وجود دارد). SREهای مذکور با عناصر پاسخ سرمی که کنترل بسیاری از ژن‌های پاسخ اولیه را بر عهده دارند، متفاوت هستند (در بخش ۴-۱۶ بحث شده است). میانکنش فاکتورهای رونویسی وابسته به کلسترول تحت عنوان (SREBP)[2] با این عناصر پاسخی، بیان ژن‌های هدف را تنظیم می‌کند. مسیر به واسطه SREBP در غشاء شبکه آندوپلاسمی آغاز می‌شود و حداقل شامل دو پروتئین دیگر علاوه بر SREBP است.

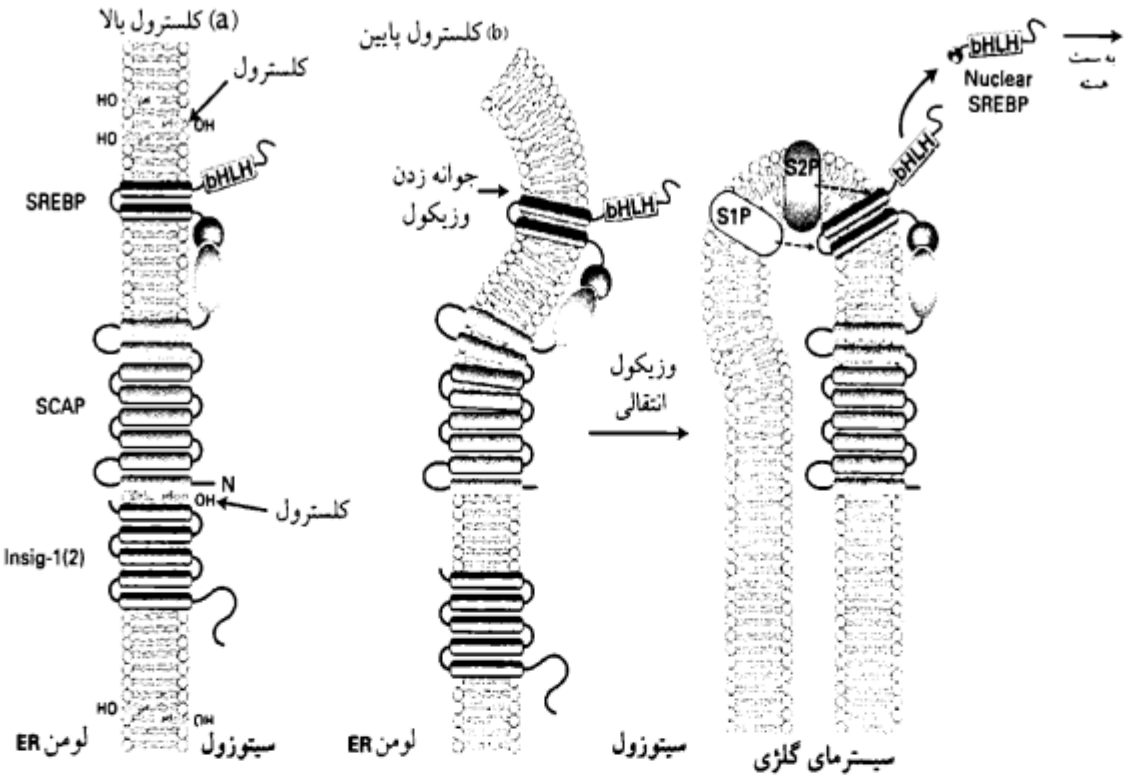
وقتی که سلول‌ها غلظت کافی از کلسترول را دارند، SREBP در غشاء شبکه آندوپلاسمی با SCAP[3]، insig-1 (یا مشابه نزدیک آن insig-2) و احتمالاً پروتئین‌های دیگر کمپلکس تشکیل می‌دهد (شکل ۳۸-۱۶ قسمت a). SREBP دارای سه دُمین متفاوت است: دُمین N-ترمینال سیتوزولی دارای موتیف اتصال به DNA به صورت bHLH[4] (شکل ۲۶-۷ را ملاحظه کنید) که به

1-Sterol regulatory elements (SRES)

2- SRE binding proteins

3- SREBP cleavage activating protein

4- Basic - helix - loop - helix



▲ **شکل ۱۶ـ۳۸ کنترل حساس به کلسترول در فعال‌سازی SREBP.** ذخیره سلولی کلسترول با عملکرد ترکیبی Insig-1 (2) و SCAP کنترل می‌شود. هر دوی این پروتئین‌های سرتاسری در غشاء ER قرار گرفته‌اند. (a) وقتی که سطح کلسترول بالاست، insig-1 (2) به دمین حساس به استرول در SCAP متصل می‌شود و این امر باعث لنگراندازی کمپلکس SCAP-SREBP در غشاء شبکه آندوپلاسمی می‌شود. (b) تفکیک insig-1 (2) از SCAP در سطح پایین کلسترول به کمپلکس SCAP-SREBP امکان حرکت به سمت کمپلکس گلژی را از طریق وزیکول‌های ناقل فراهم می‌کند. در گلژی برش پی در پی SREBP توسط پروتئازهای جایگاه ۱و۲ (S1P و S2P)، دمین bHLH موجود در N-ترمینال SREBP را رها می‌کند. بعد از رهایی این دمین (که SREBP هسته‌ای (nSREBP) نامیده می‌شود)، به داخل هسته نقل مکان کرده و رونویسی از ژن‌هایی را که در پروموترشان دارای SRE[1] هستند را کنترل می‌کند.

عنوان فاکتور رونویسی هنگام جدا شدن از ریشه SREBP عمل می‌کند، یک دُمین مرکزی لنگرانداز به غشاء حاوی دو مارپیچ آلفای ترانس ممبران و یک دُمین تنظیمی C-ترمینال سیتوزولی. SCAP دارای هشت مارپیچ آلفای سرتاسری و یک دُمین بزرگ سیتوزولی C-ترمینال است که با دُمین تنظیمی SREBP میانکنش می‌دهد. پنج مارپیچ آلفای سرتاسری در SCAP یک دُمین حساس به استرول[2] مشابه با HMG-COA ـ ردوکتاز را تشکیل می‌دهند (بخش ۳ـ۱۰ را ملاحظه کنید). وقتی که دُمین حساس به استرول در SCAP به کلسترول متصل شود، این پروتئین به insig-1 (2) نیز متصل می‌شود. وقتی که insig-1 (2) به طور محکم به کمپلکس - SCAP ـ کلسترول متصل می‌شود، اتصال SCAP پوشش پروتئینی موجود بر روی وزیکول‌های COPII را بلوکه می‌کند و بدین وسیله‌ی الحاق کمپلکس SCAP/SREBP را به داخل وزیکول‌های ناقل از شبکه آندوپلاسمی به طرف گلژی مهار می‌کند (فصل ۱۴ را ملاحظه کنید). بنابراین اتصال وابسته به کلسترول insig به کمپلکس SREBP -کلسترول - SCAP، این کمپلکس را در ER گرفتار می‌کند.

وقتی که میزان سلولی کلسترول کاهش یابد، برخی از کلسترول‌های متصل شده به SCAP رها می‌شوند. در نتیجه insig-1 (2) دیگر اتصالی با SCAP خالی از کلسترول برقرار نمی‌کند و کمپلکس SCAP-SREBP از شبکه آندوپلاسمی به طرف دستگاه گلژی از طریق وزیکول‌های COPII حرکت می‌کند (شکل ۱۶ـ۳۸ قسمت b). در دستگاه گلژی، SREBP به طور متوالی در دو

1- Sterol regulatory elements

2- Sterol - sensing domain

جایگاه توسط دو پروتئاز متصل به غشاء (S2P,S1P) برش می‌خورد (نمونه‌ای دیگر از پروتئولیز تنظیم شونده داخل غشائی). برش دوم از جایگاه ۲، دُمین حاوی bHLH در N-ترمینال را به داخل سیتوزول رها می‌کند. این قطعه که SREBP (هسته‌ای SREBP) نامیده می‌شود، فورا به داخل هسته نقل مکان می‌کند، در آنجا رونویسی از ژن‌هایی که دارای SRE در پروموترشان هستند را فعال می‌کند. (مانند گیرنده LDL و HMG-CoA ردوکتاز). بنابراین کاهش در کلسترول سلولی با فعال شدن میسر insig-1(2) SCAP/SREBP/ موجب بیان ژن‌های رمز کننده پروتئین‌هایی می‌شود که هم کلسترول را به داخل سلول وارد می‌کنند (گیرنده LDL) و هم کلسترول را از مولکول پیش ساز کوچک سنتز می‌کنند (آنزیم HMG-CoA ردوکتاز). پس از برش SREBP، در دستگاه گلژی، SCAP به وضوح به سمت شبکه آندوپلاسمی باز می‌گردد که می‌تواند با insig-1 (2) و مولکول SREBP سالم دیگری میانکنش دهد. سطح بالای رونویسی ژن‌های کنترل شونده با SRE برای تولید در حال پیشرفت nSREBP جدید موردنیاز است، چون با سرعت نسبتاً بالایی توسط مسیر پروتئازوم با واسطه‌ی یوبی‌کوئیتین تجزیه می‌شود (فصل ۳). تولید سریع و تجزیه nSREBP به پاسخ سریع سلول به تغییرات میزان کلسترول داخل سلولی کمک می‌کند.

تحت برخی شرایط (مثلاً در طی رشد سلول)، سلول‌ها به موجودی بالایی از تمامی لیپیدهای ضروری غشایی و پیش‌سازهای اسیدهای چرب نیاز دارند (تنظیم هماهنگ). اما گاهی اوقات سلول‌ها به میزان بالاتری از برخی از لیپیدها نیاز دارند، مانند کلسترول نسبت به فسفولیپیدها برای سنتز هورمون‌های استروئیدی (تنظیم متمایز). تنظیم پیچیده متابولیسم لیپیدها که از ویژگی یوکاریوت‌های پیشرفته است، بستگی به بخش گسترده‌ای از فاکتورهای رونویسی مانند چندین SREBP دارد که بیان پروتئین‌های درگیر در متابولیسم لیپید را کنترل می‌کنند. برای مثال چندین SREBP، رونویسی از ژن‌های رمز کننده بسیاری از پروتئین‌های شرکت‌کننده در جذب سلولی لیپیدها (مانند گیرنده LDL) و اکثر آنزیم‌های مربوط به مسیر سنتز کلسترول، اسیدهای چرب، تری گلیسیریدها و فسفولیپیدها را تنظیم می‌کنند. پستانداران سه ایزوفوم شناخته شده از SREBP را بیان می‌کنند. SREBP-1a و SREBP-1c که از پیرایش متناوب RNAهای تولید شده از ژن‌های یکسان ایجاد می‌شوند و SREBP-2 توسط ژن متفاوتی رمز می‌شود. این فاکتورهای رونویسی تنظیم شونده با پروتئاز به همراه یکدیگر نه تنها دسترسی به کلسترول بلکه همچنین تری گلیسریدها و فسفولیپیدهای ساخته شده از اسیدهای چرب را کنترل می‌کند. در سلول‌های پستانداران، SREBP-1a و SREBP-1c اثر بیشتری را بر روی متابولیسم اسید چرب در مقایسه با متابولیسم کلسترول اعمال می‌کنند، در حالی که در مورد SREBP-2 عکس این قضیه است.

به دلیل اینکه ریسک عارضه آرترواسکلروز نسبت مستقیمی با سطح پلاسمایی LDL (کلسترول بد) و رابطه معکوس با HDL دارد، هدف اصلی در مقوله سلامت عمومی کاهش سطح کلسترول LDL و افزایش کلسترول HDL بوده است. موفق‌ترین داروها برای کنترل نسبت LDL:HDL، استاتین‌ها[1] هستند، که موجب کاهش LDL پلاسمایی می‌شوند. همانطور که در فصل ۱۰ بحث شد، این داروها به آنزیم HMG-CoA ردوکتاز متصل می‌شوند و به طور مستقیم فعالیت آن را مهار می‌کنند و بدین وسیله‌ی بیوسنتز کلسترول و ذخیره کلسترول در کبد را کاهش می‌دهند. فعال‌سازی SREBP در پاسخ به این کاهش کلسترول به افزایش سنتز آنزیم HMG-CoA ردوکتاز و گیرنده LDL کمک می‌کند. مهمترین پیامد وضعیت یاد شده افزایش تعداد گیرنده‌های LDL کبدی است که اینها افزایش ورود کلسترول LDL را از پلاسما وساطت کرده و از این رو سطح کلسترول LDL را در سیستم گردش خون کاهش می‌دهند. به نظر می‌رسد که استاتین‌ها همچنین با سرکوب التهاب که آغازگر این فرایند است، موجب مهار آرترواسکروز می‌شوند. به رغم آنکه مکانیسم این مهار به خوبی شناخته نشده است، اما به وضوح در اثرات محافظت عروقی استاتین شرکت دارد.

نکات کلیدی بخش ۷-۱۶

مسیرهای دخیل در برش پروتئینی القاءشده با پیام

- فاکتور رونویسی NF-κB بسیاری از ژن‌هایی را که اجازه می‌دهند سلول‌ها به عفونت و التهاب پاسخ دهند را تنظیم می‌کند.
- در سلول‌های تحریک‌نشده NF-κB (در سیتوزول قرار می‌گیرد) به یک پروتئین مهارگر I-κB متصل شده است. در پاسخ به بسیاری از پیامهای خارج سلولی، یوبی کوئیتینه شدن وابسته به فسفریلاسیون و تجزیه I-κB در پروتئزوم، NF-κB فعال را آزاد می‌کند که به طرف هسته منتقل می‌شود (شکل ۳۵-۱۶ ملاحظه کنید).
- پروتئین نوتچ گیرنده با اتصال به لیگاند دلتا بر روی سطح سلول و سلول مجاور، متحمل برش پروتئولیتیکی می‌شود (شکل ۳۶-۱۶ را ملاحظه کنید). قطعه سیتوزولی نوتچ آزاد به هسته منتقل می‌شود و رونویسی ژن‌های هدف اساسی در تعیین سرنوشت سلولی در طی تکوین را تنظیم می‌کند.

1- Statins

■ شکست پیش‌سازهای متصل به غشاء خانواده EGF از مولکول‌های پیام‌رسان توسط پروتئاز ADAM کاتالیز می‌شود. نتیجه شکست نامناسب این پیش‌سازها نتیجه‌اش می‌تواند تکثیر سلولی غیرطبیعی، ایجاد سرطان، هتروپاتی قلبی و سایر بیماریها باشد.

■ گاماسکرتاز که پرتئولیز درون غشایی تنظیم شدهٔ نوتچ را کاتالیز می‌کند در برش پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) به پپتیدی که تشکیل پلاک‌های مشخصه بیماری آلزایمر را می‌دهد، نیز نقش دارد.

■ در مسیر insig-1(2)/SCAP/SREBP فاکتور رونویسی nSREBP فعال از غشاء گلژی توسط پروتئولیز درون غشایی وقتی که کلسترول سلولی پائین است آزاد می‌شود (شکل ۳۸-۱۶ را ملاحظه کنید). آن سپس بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی که در بیوسنتز کلسترول نقش دارند (مانند HMG-COA ردوکتاز) و دخول سلولی کلسترول (مانند گیرنده LDL) را تحریک می‌کند. وقتی که کلسترول بالا است، SREBP در غشاء ER در کمپلکس با insig-1(2) و SCAP حفظ می‌شود.

چشم‌اندازی به آینده

ژنتیک، بیوشیمی و زیست‌شناسی ساختاری به ما دید تفسیری زیادی در مورد اینکه چگونه پیام‌ها از سطح سلول‌ها عبور می‌کنند و تبدیل به تغییراتی در رفتار سلولی می‌شوند داده‌اند. اندازه پیام‌های خارج سلولی مختلف، گیرنده‌های آنها و مسیرهای انتقال پیام داخل سلول در مقدار نسبتاً کمی از دسته‌ها قرار می‌گیرند و هدف اصلی فهم این است که چگونه مسیرهای پیام‌رسانی مشابه، فرآیندهای سلولی خیلی متفاوتی را تنظیم می‌کنند. برای مثال، STAT5 دسته‌های خیلی متفاوتی از ژن‌ها را در سلول‌های پیش‌ساز اریتروئید (به دنبال تحریک گیرنده اریتروپوئیتین) نسبت به سلول‌های اپی‌تلیالی بستان (به دنبال تحریک گیرنده پرولاکتین) فعال می‌کند. احتمالاً STAT5 به گروه‌های متفاوت از فاکتورهای رونویسی در این سلول‌ها و سایر سلول‌ها متصل می‌شود ولی طبیعت این پروتئین‌ها و اینکه آنها چگونه برای القاء الگوهای بیان ژن مختص سلولی با هم همکاری می‌کنند، کشف نشده است.

در مقابل، فعال‌سازی اجزاء انتقال پیام همسان در یک سلول از طریق گیرنده‌های متفاوت اغلب اوقات پاسخ‌های سلولی متفاوتی را آشکار می‌کند. یک دیدگاه مشترک این است که مدت فعال‌سازی MAP کیناز و سایر مسیرهای پیام‌رسانی، الگوی بیان ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ولی اینکه چگونه این ویژگی تعیین می‌شود به صورت یک سؤال در مبحث انتقال پیام باقی می‌ماند. مطالعات ژنتیکی و مولکولی در حشرات، کرمها و موش‌ها در فهم ما از ارتباط بین اجزاء مسیرهای پیام‌رسانی متفاوت و اساس تنظیمی کنترل‌کننده اختصاصیت در موجودات زنده پرسلولی نقش دارد.

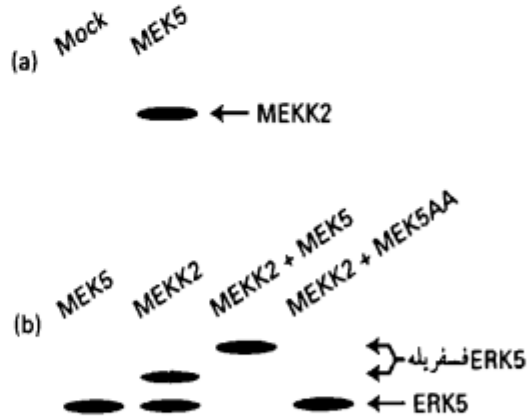
محققان ساختار سه‌بعدی چندین پروتئین پیام‌رسان را در طی چندین سال گذشته تعیین کرده‌اند این امر اجازه تحلیل بیشتر چندین مسیر انتقال پیام را می‌دهد. ساختارهای مولکولی کینازهای مختلف شباهت‌های بارز و تغییرات مهمی را نشان می‌دهد که در خصوصیات تنظیمی جدید آنها شرکت می‌کند. فعالیت چندین کیناز (مانند Raf و پروتئین کیناز B(PKB)) توسط دُمین‌های مهاری و همچنین توسط چندین فسفریلاسیون کاتالیز شده توسط چندین کیناز دیگر تنظیم می‌شود. درک ما از اینکه چگونه فعالیت این کنیازها و سایر کینازها به طور دقیق به منظور رفع نیازهای سلول تنظیم می‌شود نیاز به مطالعات زیست‌شناسی سلولی و ساختاری بیشتری دارد.

اختلالات در انتقال پیام زمینه بسیاری از بیماریهای متفاوت شامل عمدهٔ سرطان‌ها و بسیاری از شرایط التهابی است. دانش مفصل از مسیرهای پیام‌رسانی دخیل و ساختار اجزاء پروتئینی آنها به منظور فراهم کردن نشانه‌های مولکولی مهمی برای طراحی درمانهای خاص ادامه خواهد یافت. برخلاف ارتباط ساختاری نزدیک بین مولکولهای پیام‌رسان متفاوت (مانند کینازها) مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که مهارگرهای انتخابی برای زیردسته‌های خاص می‌تواند طراحی شود. در بسیاری از تومورهای با منشاء اپی‌تلیالی، گیرنده EGF متحمل یک جهش شده است که فعالیت آن را افزایش می‌دهد. به طور بارزی مولکول دارویی کوچک (Iressa^{TM}) فعالیت کینازی گیرنده EGF جهش یافته را مهار می‌کند ولی اثری بر روی گیرنده EGF طبیعی یا سایر گیرنده‌ها ندارد. بنابراین این دارو رشد سرطان را تنها در بیماران با این جهش خاص آهسته می‌کند. به طور مشابهی آنتی بادی‌های مونوکلونال با گیرنده‌های به دام انداز (پروتئین‌های محلولی که دارای دُمین اتصالی به لیگاند از یک گیرنده هستند و بنابراین لیگاند را جمع می‌کنند) که مانع از عمل سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 و TNFα از طریق اتصال به گیرنده‌هایشان می‌شوند، اکنون در درمان چندین بیماری التهابی نظیر آرتریت استفاده می‌شوند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جی. جانسون [1] و همکارانش آبشار MAP کینازی را بررسی کرده‌اند که در آن MEKK2 در سلول‌های پستانداری نقش دارد. با غربال‌گری دورگه مخمری (فصل ۷ را ملاحظه کنید) مشخص شد که MEKK2 به MEK5 متصل می‌شود و می‌تواند یک MAP کیناز را فسفریله کند. برای روشن‌شدن مسیر پیام‌رسانی به راه انداخته شده توسط MEKK2 در *In Vivo* مطالعات زیر در سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK293) در محیط کشت انجام شد.

a) سلول‌های HEK293 با پلاسمید رمزکننده نوترکیب (MEKK2نشاندار) همراه با پلاسمید رمزکننده MEK5، با یک حامل کنترلی که پروتئینی را رمز نمی‌کرد (MOCK) مورد انتقال ژن قرار گرفتند. MEK5 نوترکیب از عصاره سلولی توسط جذب به یک آنتی‌بادی ویژه رسوب داده شد. این ماده‌ای که به روش ایمنی رسوب داده شده بود تحت الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید قرار گرفت، به غشاء انتقال یافت و توسط وسترن بلاتینگ با یک آنتی بادی که MEKK2 نشاندار را شناسایی می‌کرد، بررسی شد. نتایج در قسمت (a) در شکل زیر نشان داده شده‌اند. چه اطلاعاتی درباره این آبشار MAP کیناز از این آزمایش یاد می‌گیریم؟ آیا داده‌های قسمت (a) از شکل تأیید می‌کنند که MEKK2، MEK5 را فعال می‌کند، چه اطلاعات دیگری حاصل می‌شود؟



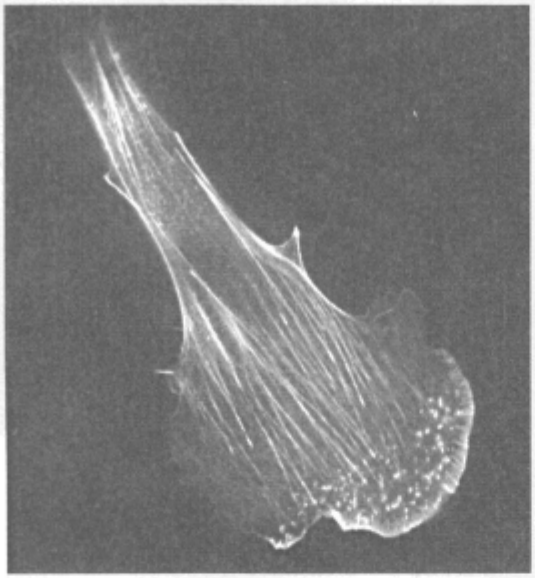
b) EKK5 یک MAP کینازی است که قبلاً نشان داده شده است که وقتی توسط MEK5 فسفریله می‌شود فعال می‌شود. وقتی ERK5 توسط MEK5 فسفریله می‌شود، حرکتش بر روی ژل پلی‌آکریل آمیدکم می‌شود. در آزمایش دیگر، سلول‌های HEK293 با یک پلاسمید رمزکننده ERK5 همراه با پلاسمید رمزکننده MEK5، MEKK2، MEKK2 و MEK5 یا MEKK2 و MEK5AA ترانسفکت شدند. MEK5AA یک نوع جهش‌یافته و غیرفعال از MEK5 است که بصورت غالب منفی عمل می‌کند. بیان MEK5AA در سلول‌های HEK293 مانع از پیام‌رسانی از طریق MEK5 فعال و درون‌زا می‌شود. عصاره‌های سلول‌های ترانسفکت شده، توسط وسترن بلاتینگ با یک آنتی‌بادی بر علیه ERK5 مورد بررسی قرار گرفتند. ازداده‌های قسمت (b) شکل، ما چه چیزی می‌توانیم درباره نقش MEKK2 در فعال‌سازی ERK5 نتیجه‌گیری کنیم؟ چگونه داده‌های مشاهده شده وقتی که سلول‌ها هم ژن MEKK5 و ژن ERK5 و هم ژن MEK5AA دریافت کردند به روشن‌سازی ترتیب اجزاء شرکت‌کننده در این آبشار کینازی کمک می‌کند؟

1- G.Johnson

فصل ۱۷

سازمان‌دهی و حرکت سلولی

I: میکروفیلامنت‌ها



(شکل رنگی) **سلول** در حال مهاجرت که با فالوئیدین **فلورسنت**، رنگی که به‌طور ویژه به F- اکتین متصل می‌شود، رنگ‌آمیزی شده است.

رئوس مطالب

۱۷-۱ میکروفیلامنت‌ها و ساختارهای **اکتینی**

۱۷-۲ دینامیک فیلامنت‌های اکتینی

۱۷-۳ مکانیسم‌های تجمع فیلامنت اکتین

۱۷-۴ سازمان‌دهی ساختارهای سلولی مبتنی بر اکتین

۱۷-۵ میوزین‌ها: پروتئین‌های حرکتی **مبتنی** بر اکتین

۱۷-۶ حرکات ناشی از میوزین

۱۷-۷ مهاجرت سلولی: پیام‌دهی **و کموتاکسی**

زمانی که با میکروسکوپ به تنوع شگفت‌انگیز سلول‌های موجود در طبیعت می‌نگریم، با اشکال و حرکات سلولی گوناگون و تعجب‌برانگیز مواجه می‌شویم. نخست ممکن است متوجه شویم که بعضی از سلول‌ها، مثل اسپرم مهره‌داران، مژکدارانی مثل تتراهایمنا، یا تاژکدارانی مثل کلامیدوموناس سریعاً توسط مژک و تاژک به جلو هل داده می‌شوند و شنا می‌کنند. سلول‌های دیگر مثل آمیب‌ها و ماکروفاژهای انسانی بسیار آهسته حرکت می‌کنند و توسط هیچ زائده خارجی هل داده نمی‌شوند و تنها حرکات هماهنگ خود سلول باعث حرکت آنها می‌شود. هم‌چنین ما ممکن است متوجه شویم که بعضی از سلول‌های بافتی به یکدیگر متصل شده‌اند و صفحه شبه سنگفرشی تشکیل می‌دهند، در حالی که سلول‌های دیگری ـ مثل نورون‌ها ـ دارای تشکیلات طویلی تا طول ۳ فوت می‌باشند و بین آنها تماس‌های انتخابی برقرار است. اگر به سازمان‌دهی درونی سلول‌ها به دقت بنگریم، مشاهده می‌کنیم که اندامک‌ها دارای جایگاه‌های مشخصی هستند، برای مثال دستگاه گلژی عموماً در نزدیک هسته مرکزی قرار دارد. چگونه این تنوع در شکل، سازمان‌دهی سلولی و حرکت سلولی محقق می‌گردد؟ چرا برای سلول‌ها مهم است که شکل خاص و سازمان‌دهی درونی واضحی داشته باشند؟ اجازه دهید ابتدا دو مثال از سلول‌هایی که دارای عملکرد و سازمان‌دهی‌های متفاوتی می‌باشند را بررسی کنیم.

سلول‌های اپی‌تلیال که روده کوچک را مفروش کنند یک لایه محکم و شبه سنگفرشی از سلول‌های آجری شکل به نام **اپی‌تلیوم** را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۷-۱a, b). نقش آنها وارد کردن مواد غذایی (مثل گلوکز) از غشای پلاسمایی راسی (بالا) و خروج آنها از غشای پلاسمایی بازولاترال (بخش پایین) به خون می‌باشد. به منظور محقق ساختن این انتقال جهت‌دار، غشاهای پلاسمایی راسی و بازولاترال سلول‌های اپی‌تلیال باید دارای ترکیب پروتئینی متفاوتی باشند. سلول‌های اپی‌تلیال توسط اتصالات سلولی به یکدیگر متصل شده‌اند (فصل ۱۹)، بطوریکه هم‌چنین این اتصالات سلولی نواحی راسی و بازولاترال را نیز تفکیک کرده است. این نوع تفکیک به سلول اجازه می‌دهد که پروتئین‌های انتقال‌دهنده مربوطه را در غشاهای پلاسمایی دو سطح قرار دهد. به علاوه، غشاء راسی دارای مورفولوژی

بی‌نظیر و اشکال شبه انگشتی به نام **میکروویلی** می‌باشد که سطح غشا پلاسمایی را در جذب افزایش می‌دهد. برای رسیدن به این سازمان‌دهی، سلول‌های اپی‌تلیال بایستی دارای بعضی از ساختارهای داخلی باشند تا به آنها شکل داده و پروتئین‌های مناسب را در سطح غشایی مناسب قرار دهد.

هم‌چنین به ماکروفاژها، که یک نوع سلول سفید خونی می‌باشد و نقش آن جستجوی عوامل عفونی و تخریب آنها توسط فاگوستیوز می‌باشد، توجه شود. باکتری‌ها مواد شیمیایی آزاد می‌کنند که ماکروفاژها را جذب می‌کند و آنها را به محل آلودگی راهنمایی می‌کند. زمانی که ماکروفاژ در جهت شیب شیمیایی می‌خزد تا به باکتری برسد و آن را فاگوستیوز کند، باید به‌طور ثابتی ماشین حرکت سلولی خود را مجدداً سازمان‌دهی کند. همان‌طور که مشاهده خواهیم کرد، باید در زمان خزیدن ماشین حرکتی داخل سلولی آن در یک جهت آرایش یابد (شکل ۱ـ۱۷ c, d)

تنها دو مثال درباره **قطبیت سلولی** یعنی توانایی سلول‌ها در ایجاد نواحی با فعالیت مشخص و متفاوت وجود دارد. در واقع وقتی شما درباره تمامی انواع سلول‌ها فکر می‌کنید درمی‌یابید که بیشتر آنها بعضی از اشکال قطبیت سلولی را دارا هستند. مثال دیگر و اساسی از قطبیت سلول توانایی سلول‌ها در تقسیم آنها می‌باشد: آنها بایستی ابتدا یک محور تقسیم سلولی انتخاب کرده و سپس ماشین تقسیم سلولی را طوری تنظیم کنند که اندامک‌ها را در راستای آن محور جدا و تقسیم کنند.

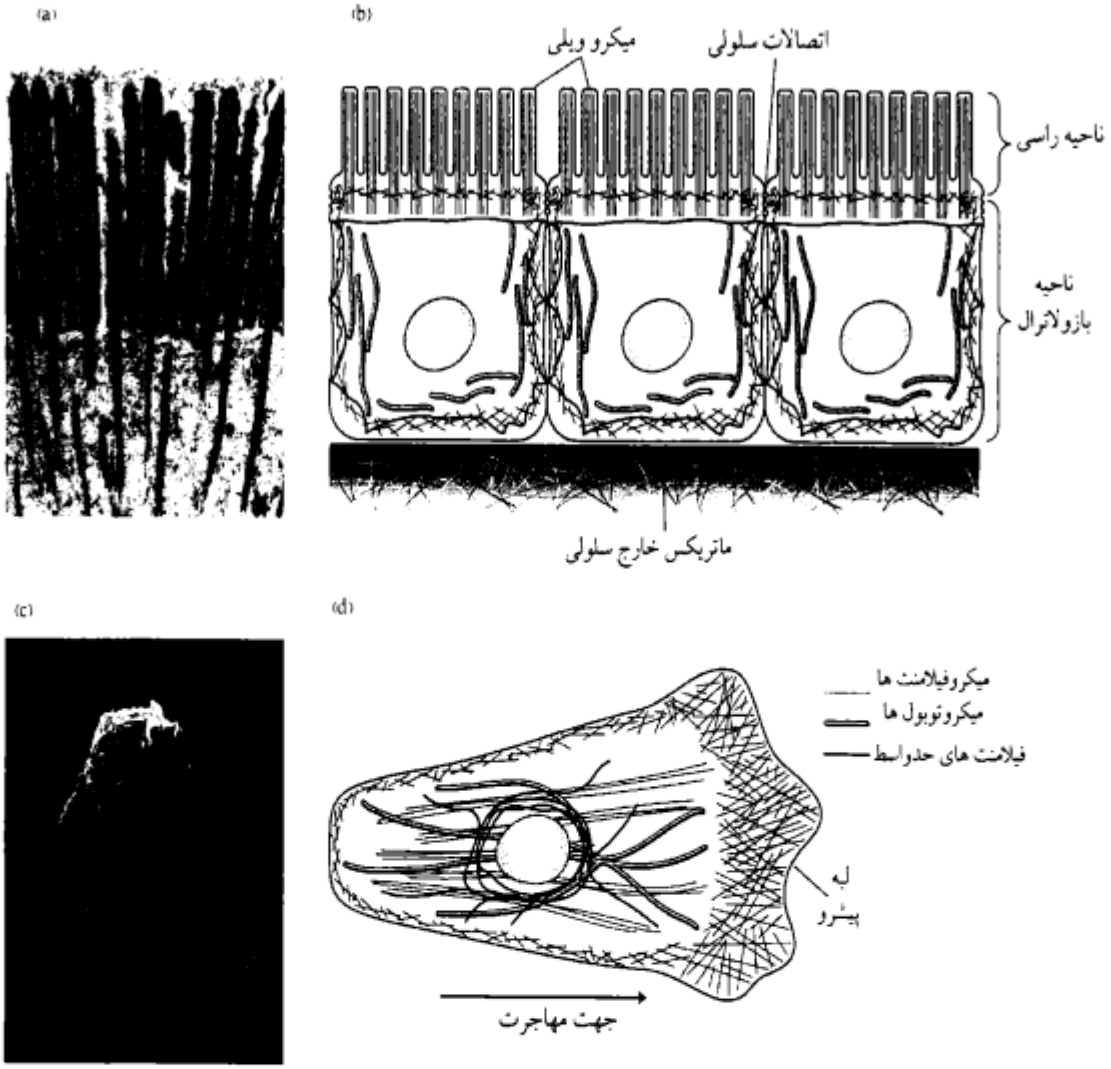
شکل سلول و قطبیت عملکردی آن توسط یک شبکه پروتئینی رشته‌ای سه‌بُعدی به نام **اسکلت سلولی**[1] تعیین می‌گردد. اسکلت سلولی در کل سلول پخش شده است و به غشای پلاسمایی و اندامک‌های درونی متصل شده است. بنابراین یک چارچوب برای سازمان‌دهی سلولی تأمین می‌کند. واژه اسکلت سلولی یک ساختار ثابت مثل اسکلت نمی‌باشد. در واقع اسکلت سلولی بسیار دینامیک است و اجزاء آن توانایی سازمان‌دهی مجدد در کمتر از یک دقیقه را داراست و یا این‌که آن می‌تواند به مدت چندین ساعت کاملاً پایدار بماند. در نتیجه طول و دینامیک فیلامنت‌ها می‌تواند بسیار متنوع باشد و به صورت انواع ساختارهای متنوع آرایش یابند و به‌طور موضعی در سلول تنظیم گردند.

اسکلت سلولی از سه سیستم فیلامنتی اصلی تشکیل شده است (شکل ۲ـ۱۷)، تمامی آنها در زمان و مکان مشخص بصورت سازمان یافته و تنظیم شده درمی‌آیند. هر سیستم فیلامنتی پلیمری از زیرواحدهای آرایش یافته می‌باشد. زیرواحدهایی که فیلامنت‌ها را می‌سازند متحمل تشکیل[2] و تجزیه[3] تنظیم شده می‌گردند که باعث می‌شود که سلول انعطاف‌پذیری خود را از دست بدهد و یا این که در موقع نیاز انواع ساختارهای متفاوت خود را تجزیه کند. **میکروفیلامنت‌ها** پلیمرهایی از پروتئین اکتین می‌باشند که توسط پروتئین‌های متصل به اکتین بصورت دسته‌ها و شبکه‌های عملکردی سازمان می‌یابند. میکروفیلامنت‌ها در سازمان‌دهی غشای پلاسمایی، شامل ساختارهای سطحی مثل میکروویلی‌ها نقش بسیار مهمی دارند. میکروفیلامنت‌ها به تنهایی می‌توانند دارای فعالیت باشند یا این‌که به **پروتئین‌های حرکتی**[4] میوزین فعال شده با ATP، کمک کنند. این پروتئین‌ها دارای نقش انقباضی (مثلاً در عضله) یا حمل محموله در طول میکروفیلامنت‌ها می‌باشند. **میکروتوبول‌ها** لوله‌های بلندی هستند که توسط پروتئین توبولین ساخته شده‌اند و توسط پروتئین متصل‌شونده به میکروتوبول سازمان یافته‌اند. آنها اغلب در کل سلول توزیع شده‌اند و یک چارچوب سازمان‌یافته برای اندامک‌های متصل به خود و بستر ساختاری برای مژک‌ها و تاژک‌ها فراهم می‌کنند. آنها هم‌چنین ساختار دوک‌میتوزی، ماشین تفکیک کروموزوم‌ها در میتوز، را تشکیل می‌دهند. موتورهای مولکولی به نام‌های کینزین و داینئین با صرف ATP محموله را در طول میکروتوبول‌ها جابه‌جا می‌کنند. **فیلامنت‌های حد واسط** ساختارهای رشته‌ای ویژه بافتی می‌باشند که دارای نقش‌های مختلف شامل بستر ساختاری برای غشای هسته‌ای، یک‌پارچگی ساختاری سلولی در بافت‌ها و عملکردهای ساختاری و حفاظتی در پوست، مو و ناخن می‌باشند. تا کنون هیچ موتور مولکولی شناخته نشده است که از فیلامنت‌های حد واسط استفاده کند.

همان‌طور که در شکل ۱ـ۱۷ مشاهده می‌کنیم، سلول‌ها می‌توانند آرایش‌های بسیار متفاوتی از اسکلت سلولی خودشان ایجاد کنند. به منظور ایجاد این آرایش‌ها، سلول‌ها باید پیام‌هایی را - خواه فاکتورهای محلول که سلول را در بر گرفته‌اند، سلول‌های دیگر، و خواه ماتریکس خارج سلولی - حس کنند و آنها را تفسیر کنند (شکل ۳ـ۱۷). این پیام‌ها ابتدا توسط گیرنده‌های سطح سلولی تشخیص داده می‌شوند، سپس گیرنده‌ها مسیرهایی را فعال می‌کنند که آنها نیز به نوبه خود به واسطه فاکتورهایی، سازمان‌دهی اسکلت سلولی را تنظیم می‌کنند.

اهمیت اسکلت سلولی در عملکرد و حرکت سلول زمانی آشکار

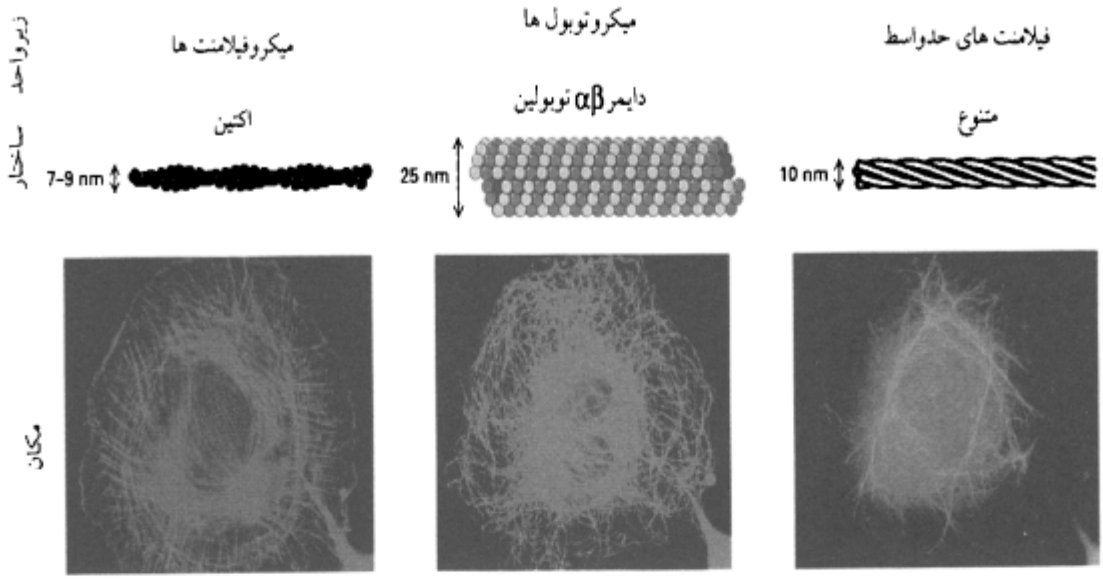
1- Cytoskeleton
2- Assembly
3- Disassembly
4- Motor protein



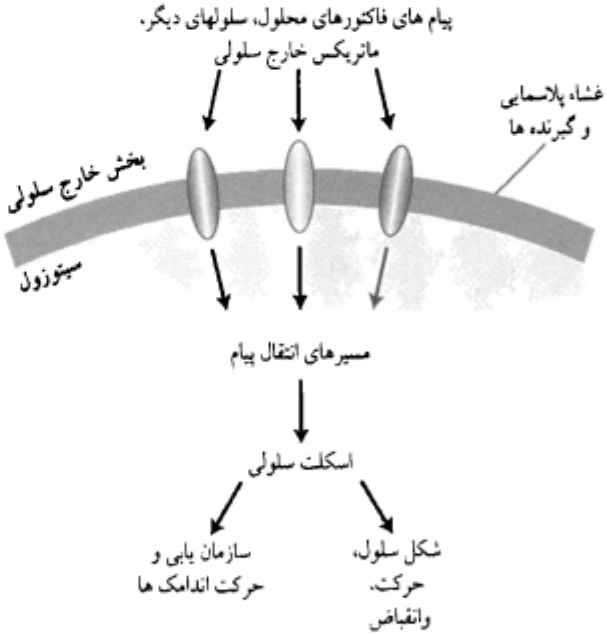
▲ **شکل ۱-۱۷ (شکل رنگی) مرور کلی بر اسکلت سلولی یک سلول اپی‌تلیال و یک سلول در حال مهاجرت.** (a) میکروگراف الکترونی گذاره از مقطع نازک سلول اپی‌تلیال روده کوچک. (b) سلول‌های اپی‌تلیال شدیداً قطبی هستند و نواحی راسی و بازولاترال آنها مشخص است. سلول اپی‌تلیال روده‌ای از طریق ناحیه راسی مواد غذایی را به داخل سلول و از طریق ناحیه بازولاترال به بیرون سلول انتقال می‌دهد. (c) میکروگراف الکترونی نگاره از یک سلول در حال مهاجرت. لبه پیشرو (هم‌چنین معروف به لاملی‌پودیوم) در جلو و تنه اصلی سلول پشت آن مشاهده می‌شود. (d) یک سلول مهاجر مثل فیبروبلاست یا ماکروفاژ از نظر مورفولوژیکی دارای نواحی معینی می‌باشد و در بخش جلویی دارای یک لبه پیشرو نیز می‌باشد. میکروفیلامنت‌ها به رنگ قرمز، میکروتوبول‌ها به رنگ سبز و فیلامنت‌های حد واسط به رنگ سیاه دیده می‌شود. موقعیت هسته (بیضی با رنگ آبی روشن) نیز مشخص است.

می‌شود که نقص در یکی از اجزاء آن ـ یا در تنظیم آن ـ باعث ایجاد بیماری شود. برای مثال، تقریباً به ازای هر ۵۰۰ نفر یک نفر دارای نقصی می‌باشد که دستگاه حرکتی قلب را مختل می‌کند. این عمل منجر به کاردیومیوپاتی‌هایی با شدت‌های مختلف می‌گردد. بسیاری از بیماری‌های سلول قرمز خون، ناشی از نقص در اجزا اسکلت سلولی درگیر در حفظ غشای سلولی آن می‌باشد. سلول‌های سرطانی متاستاز یافته، حرکت تنظیم نشده‌ای از خود نشان می‌دهند و از بافت اصلی خودشان جدا شده و به مکان‌های جدیدی مهاجرت می‌کند تا تشکیل کلونی‌های جدیدی با رشد غیر قابل کنترل بکنند.

در این فصل و فصل بعدی، ساختار، عملکرد و تنظیم اسکلت سلولی را بررسی می‌کنیم. خواهیم دید که چگونه یک سلول اسکلت سلولی خود را طوری آرایش می‌دهد که باعث کسب شکل و قطبیت سلولی، ایجاد سازمان‌دهی و حرکت اندامک‌های آن، و چارچوب ساختاری برای فرایندهای مثل شناوری و خزش سلولی می‌گردد. ما بررسی خواهیم کرد که چگونه سلول‌ها سه سیستم رشته‌ای متفاوت را تشکیل می‌دهد و چگونه مسیرهای انتقال پیام، این



▲ **شکل ۲ـ۱۷: اجزای اسکلت سلولی.** هر نوع فیلامنت طی فرایند برگشت‌پذیر از زیرواحدهای ویژه‌ای تشکیل شده است. بنابراین سلول‌ها بر حسب نیاز می‌توانند آنها را تشکیل دهند یا تجزیه کنند. در بخش پایین توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسانس مکان سه سیستم فیلامنتی به ترتیب اکتین، توبولین و پروتئین فیلامنت حد واسط نشان داده شده است.

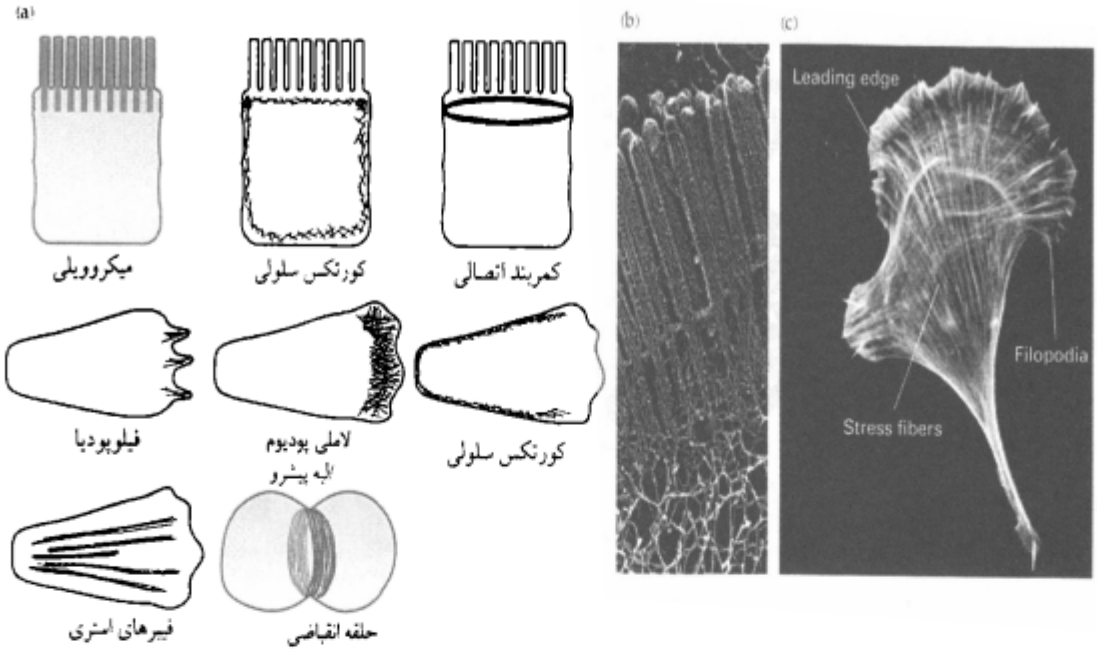


▶ **شکل ۳ـ۱۷: پیام‌رسانی سلولی عملکرد اسکلت سلولی را تنظیم می‌کند.** سلول‌ها به منظور دریافت پیام‌های خارجی از ماتریکس خارج سلولی، سایر سلول‌ها، یا فاکتورهای محلول از گیرنده‌های سطح خودشان استفاده می‌کنند. این پیام‌ها از غشای پلاسمایی عبور کرده و مسیرهای پیام‌رسان سیتوزولی ویژه‌ای را فعال می‌سازند. پیام‌ها ـ که اغلب توسط بیشتر از یک گیرنده دریافت می‌شوند ـ موجب سازمان‌یابی اسکلت سلولی شده و باعث شکل‌دهی به سلول و نیز توزیع و حرکت اندامک‌های داخل آن می‌گردد. در عدم حضور پیام‌های خارجی، سلول‌ها می‌توانند ساختار داخلی خودشان را سازمان‌دهی کنند، اما این کار را به روش قطبی انجام نمی‌دهند.

ساختارها را هم به‌طور موضعی و هم به‌طور سراسری تنظیم می‌کند. در این فصل ما بر روی میکروفیلامنت‌ها و ساختارهای مبتنی بر اکتین متمرکز می‌شویم. اگرچه ما ابتدا سیستم اسکلت سلولی را به‌طور جداگانه بررسی می‌کنیم، ولی در فصل بعد مشاهده خواهیم کرد که میکروفیلامنت‌ها با میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط در فعالیت طبیعی سلول همکاری می‌کنند.

۱ـ۱۷ میکروفیلامنت‌ها و ساختارهای اکتینی

میکروفیلامنت‌ها می‌توانند بصورت انواع ساختارهای متفاوت در سلول آرایش یابند (شکل ۴ـ۱۷). هر کدام از این ساختارها دارای نقش‌های ویژه‌ای در سلول می‌باشند. میکروفیلامنت‌ها می‌توانند به صورت دستجات محکمی از فیلامنت‌ها در سلول یافت شوند که این دستجات محکم باعث تشکیل هستهٔ اشکال باریک و شبه‌انگشتی سطح سلول به نام **میکروویلی‌ها** می‌گردند. هم‌چنین این دسته‌های محکم می‌توانند به صورت شبکه‌ای با نظم نسبتاً کمتر، به نام



▲ **شکل ۴-۱۷ (شکل رنگی) مثال‌هایی از ساختارهایی که اساس آنها میکروفیلامنت‌ها می‌باشد.** (a) در بخش‌های مختلف شکل. میکروفیلامنت‌ها با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند (b) در میکروگراف الکترونی ناحیه راسی یک سلول اپی‌تلیال قطبی، دستجات فیلامنت‌های اکتین، هسته میکروویلی‌ها را تشکیل می‌دهد. (c) سلولی که به سمت بالا حرکت می‌کند با رنگ فلورسنت فالوئیدین رنگ‌آمیزی شده است. این دارو به‌طور ویژه به F-اکتین متصل می‌شود. توجه گردد که سازمان‌یابی‌های متنوعی می‌توان در یک سلول مشاهده کرد.

کورتکس سلولی، در زیر غشای پلاسمایی قرار بگیرند و سازمان‌دهی آن را حفظ کنند. در سلول‌های اپی‌تلیال، میکروفیلامنت‌ها یک نوار منقبض‌شونده به نام **کمربند اتصالی** در اطراف سلول تشکیل می‌دهند که به اتصالات چسبنده متصل می‌شود (فصل ۱۹) و باعث محکم‌تر شدن اپی‌تلیوم می‌گردد. در سلول‌های مهاجر، شبکه میکروفیلامنتی در بخش جلویی سلول در **لبه پیشرو**[1] یا **لاملی‌پودیوم** قرار دارد و می‌تواند به صورت برآمدگی‌هایی به نام **فیلوپودیا** در سلول ظاهر شوند. بسیاری از سلول‌ها دارای میکروفیلامنت‌های انقباضی به نام **فیبرهای استرسی** می‌باشند که از طریق نواحی تخصص یافته‌ای به نام **چسبندگی‌های کانونی**[2] یا تماس‌های کانونی به سطح پایه متصل شده‌اند. در مرحله آخر تقسیم سلولی، بعد از این‌که تمامی اندامک‌ها دو برابر و تفکیک شدند، **حلقه انقباضی** تشکیل شده و با انقباض خود طی فرایندی به نام سیتوکینز باعث ایجاد دو سلول دختری می‌کند. میکروگراف الکترونی شکل ۴b-۱۷ میکروفیلامنت‌های موجود در میکروویلی‌ها را نشان می‌دهد. آرایش‌های متفاوتی از میکروفیلامنت‌ها می‌تواند در یک سلول، مثلاً در شکل ۴c-۱۷ در سلول فیبروبلاستی در حال مهاجرت، یافت شوند.

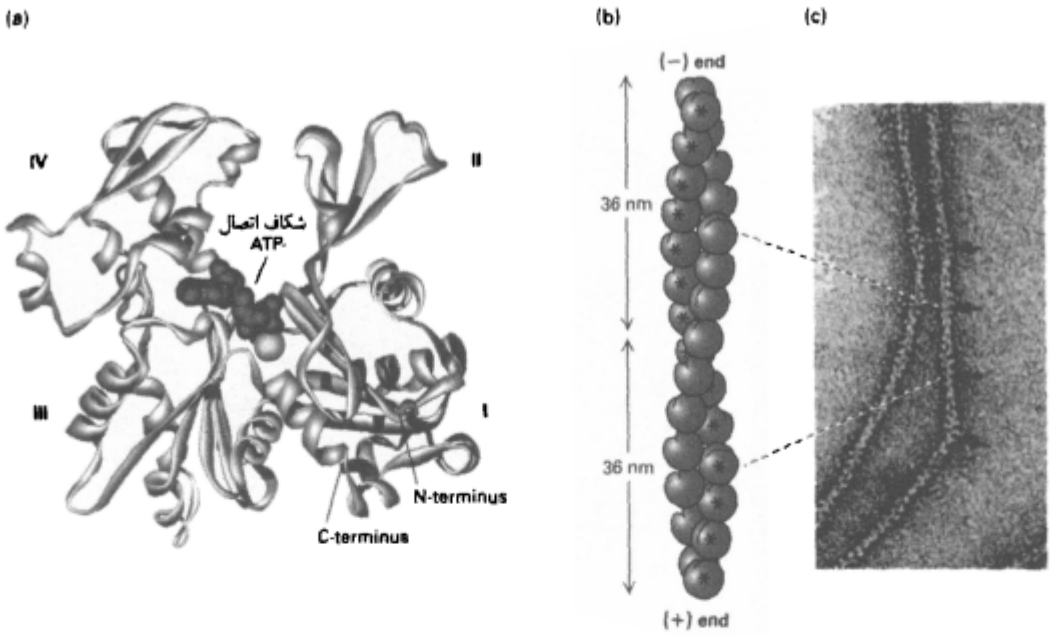
واحد اصلی سازنده میکروفیلامنت‌ها **اکتین** می‌باشد. اکتین پروتئینی است که دارای ویژگی‌های قابل توجهی از نظر توانایی آرایش برگشت‌پذیر آن به صورت یک فیلامنت قطبی که دو انتهای آن متمایز از یکدیگر است، می‌باشد. سپس این فیلامنت‌ها می‌توانند توسط پروتئین‌های اتصالی اکتین ساختارهای مختلفی به خود بگیرند. سلول‌ها فیلامنت‌های اکتین را به طرق مختلف استفاده می‌کنند: در نقش ساختاری، با استفاده از قدرت پلیمریزاسیون اکتین در انجام کار، یا به عنوان مسیری برای موتورهای میوزینی. در این بخش ما به بررسی پروتئین اکتین و فیلامنت‌های تشکیل شده از آن می‌پردازیم.

اکتین یک پروتئین اجدادی، فراوان و شدیداً حفاظت شده می‌باشد

اکتین یک پروتئین داخل سلولی است که به‌طور فراوان در سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود. برای مثال در سلول‌های

1- Leading edge

2- Focal aidhesion



▲ **شکل ۵ـ۱۷ (شکل رنگی) ساختار G-اکتین مونومر و فیلامنت‌های F-اکتین.** (a) مدل مونومر اکتین (با اندازه‌های ۳/۵×۵/۵×۵/۵nm) نشان می‌دهد که شکاف مرکزی، آن را به دو لوپ مساوی و چهار زیردُمین با شماره‌های I-IV تقسیم می‌کند. ATP (قرمز) به بخش پایین شکاف متصل می‌شود و با دو لوپ در تماس است (گوه زرد Mg^{2+} را نشان می‌دهد). پایانه‌های N و C در زیر دُمین I قرار گرفته است. (b) یک فیلامنت اکتین دو رشته‌ای از زیرواحدها می‌باشد. هر واحد تکرارشونده ۲۸ زیرواحد دارد (در هر رشته ۱۴ تا که با * نشان داده شده است) و طول آن ۷۲nm می‌باشد. شکاف اتصالی به ATP در همه زیرواحدهای فیلانت اکتین در یک جهت (بالا) قرار گرفته است. انتهای فیلامنت که در آن شکاف اتصالی آشکار است، به انتهای (-) و انتهای مخالف آن به انتهای (+) معروف است. (c) در میکروسکوپ الکترونی، فیلامنت‌های اکتین که به صورت منفی رنگ‌آمیزی شده است، به صورت طویل، انعطاف‌پذیر و رشته‌های پیچ‌خورده‌ای از زیرواحدهای دانه‌مانند دیده می‌شوند. به دلیل پیچ‌خوردگی، فیلامنت اکتین بصورت متوالی نازک‌تر (قطر ۷nm) و ضخیم‌تر (قطر ۹mn) دیده می‌شود (فلش‌ها)

عضلانی، اکتین ۱۰ درصد وزن کل پروتئین‌های سلول را تشکیل می‌دهد؛ حتی در سلول‌های غیر عضلانی این پروتئین ۵ـ۱ درصد از پروتئین‌های داخل سلولی را تشکیل می‌دهد. غلظت سیتوزولی اکتین در سلول‌های غیر عضلانی بین ۰/۱ تا ۰/۵mM متغیر است؛ در ساختارهای ویژه‌ای مثل میکروویلی‌ها غلظت اکتین به ۵mM هم می‌رسد. به منظور درک مقدار اکتین، در سلول‌ها، یک سلول کبدی را تصور کنید که دارای $۲×۱۰^{۴}$ مولکول گیرنده انسولین اما دارای تقریباً $۵×۱۰^{۸}$ یا نیم بیلیون مولکول اکتین می‌باشد. به دلیل این‌که پروتئین‌های اسکلت سلولی باعث تشکیل ساختارهایی می‌شوند که در بخش‌های بزرگ داخل سلولی امتداد می‌یابند از فراوان‌ترین پروتئین‌های سلول محسوب می‌شوند.

یک مولکول متوسط اکتین، دارای وزن مولکولی ۴۳۰۰۰ می‌باشد و توسط یک خانواده ژنی بزرگ و شدیداً حفاظت شده کد می‌شود. اکتین از یک ژن اجدادی باکتریایی به وجود آمده است و سپس با تخصصی‌شدن سلول یوکاریوتی تکامل یافت. برخی از موجودات تک‌سلولی مثل باکتری‌های میله‌ای‌شکل، مخمرها و آمیب‌ها دارای یک یا دو ژن اجدادی اکتین می‌باشند، در حالی که موجودات پُرسلولی اغلب چندین ژن اکتین دارند. برای مثال انسان دارای شش ژن اکتین می‌باشد که ایزوفرم‌های متفاوتی از پروتئین را کد می‌کنند و بسیاری از گیاهان بیشتر از ۶۰ ژن اکتین دارند ولی بسیاری از این ژن‌ها **ژن‌های کاذب** هستند و پروتئین‌های فعال اکتین را کد نمی‌کنند. در مهره‌داران چهار ایزوفرم در سلول‌های عضلانی و دو ایزوفرم به نام‌های β-اکتین و γ-اکتین در سلول‌های غیر عضلانی یافت می‌شود. این شش ایزوفرم تنها در ۲۵ اسید آمینه از ۳۷۵ اسید آمینه اختلاف دارند. اگرچه این اختلافات در ایزوفرم‌ها به نظر کوچک می‌رسد، اما ایزوفرم‌ها نقش‌های متفاوتی دارند: α-اکتین به ساختارهای انقباضی متصل می‌شود، γ-اکتین مسئول ساختار فیلامنت‌های فیبرهای استرسی می‌باشد، و β-اکتین در کورتکس سلولی و لبه پیشرو سلول‌های متحرک به‌طور فراوان یافت می‌شود. تعیین توالی اکتین‌های منابع مختلف نشان داده است که آنها از

حفاظت شده‌ترین پروتئین‌های موجود در سلول می‌باشند بطوریکه می‌توان آنها را با هیستون‌ها، پروتئین‌های ساختاری کروماتین، مقایسه کرد (فصل ۶). توالی پروتئینی اکتین آمیب و جانوران علی‌رغم یک بیلیون سال تکامل، در ۸۰ درصد ترکیب اسید آمینه‌ای خود یکسان می‌باشد.

مونومرهای G-اکتین پلیمرهای F-اکتین طویل و مارپیچی تشکیل می‌دهند

اکتین به صورت مونومرهای کروی به نام **G-اکتین** و پلیمرهای رشته‌ای به نام **F-اکتین** که زنجیره خطی زیرواحدهای G-اکتین می‌باشد، یافت می‌شود. (میکروفیلامنت‌هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی در سلول مشاهده می‌شود، رشته‌های F-اکتین و پروتئین‌های متصل‌شونده به آن می‌باشد). هر مولکول اکتین دارای یک یون Mg^{2+} است که با ATP یا ADP کمپلکس تشکیل می‌دهد. اهمیت تبدیل اشکال دارای ATP و ADP مولکول اکتین به یکدیگر بعداً در تشکیل اسکلت سلولی بحث خواهد شد.

اگرچه در بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی G-اکتین کروی به نظر می‌رسد، ولی آنالیز کریستالوگرافی اشعه X نشان می‌دهد که آن توسط یک شکاف عمیق به دو لوپ تقسیم می‌شود (شکل ۱۷-۵a). لوپ‌ها و شکاف یک **تاخوردگی ATPase**[1] تشکیل می‌دهند که محلی برای اتصال ATP و Mg^{2+} می‌باشد. در اکتین، کف شکاف به عنوان لولا عمل می‌کند و به لوپ‌ها اجازه می‌دهد که نسبت به یکدیگر انعطاف‌پذیری باشند. زمانی که ATP یا ADP به G-اکتین متصل شد، نوکلئوتید باعث تغییر ساختمان فضایی مولکول می‌شود؛ در واقع بدون نوکلئوتید، G-اکتین خیلی سریع دناتوره می‌شود. افزودن کاتیون‌هایی مثل Mg^{2+}، K^+ یا Na^+ به محلول G-اکتین باعث پلیمریزاسیون G-اکتین به رشته‌های F-اکتین می‌شود. این فرایند برگشت‌پذیر است: دپلیمریزاسیون F-اکتین به G-اکتین زمانی که قدرت یونی محلول کم می‌شود، صورت می‌گیرد. رشته‌های F-اکتین که در *In Vitro* تشکیل می‌شود، از میکروفیلامنت‌های استخراج شده از سلول‌ها غیر قابل متمایز است که نشان می‌دهد اکتین به تنهایی باعث تشکیل ساختارهای رشته‌ای میکروفیلامنت‌ها می‌شود.

وقتی که F-اکتین به‌طور منفی با اورانیل استات رنگ‌آمیزی می‌شود، در زیر میکروسکوپ الکترونی به صورت یک رشته پیچ‌خورده‌ای مشاهده می‌شود که قطر آن بین ۷ و ۹nm می‌باشد (شکل ۱۷-۵c). با کمک یافته‌های حاصله از مطالعات تفرق اشعه X رشته‌های اکتین و ساختار مونومر اکتین، که در شکل ۱۷-۵a نشان داده شده است، محققان مدلی از رشته اکتین ارائه کرده‌اند که در آن زیرواحدها در یک ساختار مارپیچی سازمان می‌یابند (شکل ۱۷-۵b). در این نوع آرایش، رشته به صورت دو زنجیره مارپیچی در نظر گرفته می‌شود که به دور یکدیگر پیچ خورده‌اند. هر زیرواحد رشته اکتین با زیرواحد بالایی، زیرواحد پایینی و دو زیرواحد موجود در رشته دیگر در تماس می‌باشد. زیرواحدهای هر رشته از پشت به دو رشته دیگر پیچ می‌خورند و بعد از هر ۷۲nm یا ۱۴ زیرواحد اکتین تکرار می‌شود. از آنجایی که دو زنجیره وجود دارد، به نظر می‌رسد که رشته اکتین در هر ۳۶nm تکرار می‌شود (شکل ۱۷-۵b).

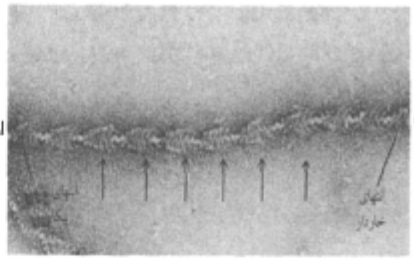
F-اکتین دارای قطبیت ساختاری و عملکردی می‌باشد

تمامی زیرواحدهای موجود در یک رشته اکتین در یک جهت مشابهی قرار می‌گیرند. در نتیجه، یک رشته اکتین دارای قطبیت می‌باشد؛ به این معنی که یک انتهای آن از انتهای دیگر متفاوت خواهد بود. همان‌گونه که مشاهده خواهیم کرد، در یک انتهای رشته، زیرواحدهای اکتین اضافه می‌شود و با (+) نشان داده می‌شود در حالی که در انتهای دیگر زیرواحدها جدا می‌شوند و با (-) نمایش داده می‌شود. در انتهای (+) شکاف اتصالی به ATP زیرواحد انتهایی اکتین با زیرواحد مجاور در تماس است در حالی که در انتهای (-) شکاف در مجاورت محلول است (شکل ۱۷-۵b).

بدون تفکیک اتمی کریستالوگرافی اشعه X، نمی‌توان شکاف موجود در یک زیرواحد اکتین و بنابراین قطبیت رشته را تشخیص داد. با وجود این، قطبیت رشته‌های اکتین را می‌توان توسط میکروسکوپ الکترونی طی آزمایشات «آذین‌بندی[2]»، که در آن از توانایی اتصال پروتئین میوزین به رشته اکتین استفاده می‌شود، اثبات کرد. در این نوع آزمایش، S1 میوزین ، دمین کروی سر متصل‌شونده به اکتینِ میوزین، با رشته‌های اکتین مخلوط می‌گردد و به آن اجازه داده می‌شود تا به اکتین متصل شود. میوزین با خمیدگی ملایم به کناره‌های رشته اکتین متصل می‌گردد. زمانی که میوزین به تمام زیرواحدهای اکتین متصل شد، رشته اکتین به صورت پوشیده (آذین‌بندی شده) با سر پیکان به نظر می‌رسد به‌طوری که نوک تمامی آنها به سمت یک انتهای رشته می‌باشد (شکل ۱۷-۶).

توانایی سر S1 میوزین در اتصال و آذین‌بندی F-اکتین از نظر تجربی بسیار مفید می‌باشد - زیرا به محققان اجازه می‌دهد که قطبیت

1- ATPase fold 2- Decoration



▲ **شکل تجربی ۶ـ۱۷: آذین‌بندی، قطبیت رشته اکتین را اثبات می‌کند.** سر S1 میوزین با آرایش ویژه‌ای به زیرواحدهای اکتین متصل می‌شود. وقتی که S1 به تمامی زیرواحدهای رشته اکتین متصل شد، به صورت مارپیچی در اطراف رشته مشاهده می‌شود. این پوشش سرهای میوزین باعث ایجاد یک دسته آذین‌بندی‌های شبیه به سر پیکان (فلش‌ها) در رشته اکتین می‌شود که به آسانی قابل مشاهده است. قطبیت موجود در آذین‌بندی باعث به وجود آمدن یک انتهای نوک پیکانی (-) و یک انتهای خاردار (+) می‌شود که انتهای (-) آن معادل با بخش بالایی مدل موجود در شکل ۵ـ۱۷ می‌باشد.

رشته‌های اکتین را هم در in vitro و هم در سلول اثبات کنند. نوک پیکان‌ها که به سمت انتهای (-) می‌باشد، اغلب انتهای «نوک پیکانی[1]» رشته اکتین نامیده می‌شود و انتهای (+) آن به انتهای «خاردار[2]» معروف است. به دلیل این‌که میوزین تنها به رشته‌های اکتین متصل می‌شود و توانایی اتصال به میکروتوبول‌ها و فیلامانت‌های حد واسط را ندارد، آذین‌بندی سر پیکانی یکی از معیارهایی است که رشته‌های اکتین را در میکروگراف‌های الکترونی به‌طور متفاوتی از سایر فیبرهای اسکلت سلولی مشخص می‌سازد.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۷

میکروفیلامنت‌ها و ساختارهای اکتین

- میکروفیلامنت‌ها می‌توانند ساختار متنوعی تشکیل دهند که بسیاری از آنها به غشای پلاسمایی متصل می‌شود (شکل ۴-۱۷ را ملاحظه کنید).
- اکتین، بلوک اصلی میکروفیلامنت‌ها، مهمترین پروتئین موجود در سلولهای یوکاریوتی است و شدیداً محافظت شده است.
- اکتین بطور برگشت‌پذیر تشکیل رشته اکتین می‌دهد که از دو هلیکس زیرواحدهای اکتین تشکیل شده است.
- همه زیرواحدهای اکتین موجود در یک رشته در یک جهت آرایش یافته‌اند و مکان اتصال نوکلئوتید در آنها به سمت انتهای (-) می‌باشد (شکل ۵-۱۷ را ملاحظه کنید).

۲ـ۱۷ دینامیک رشته‌های اکتین

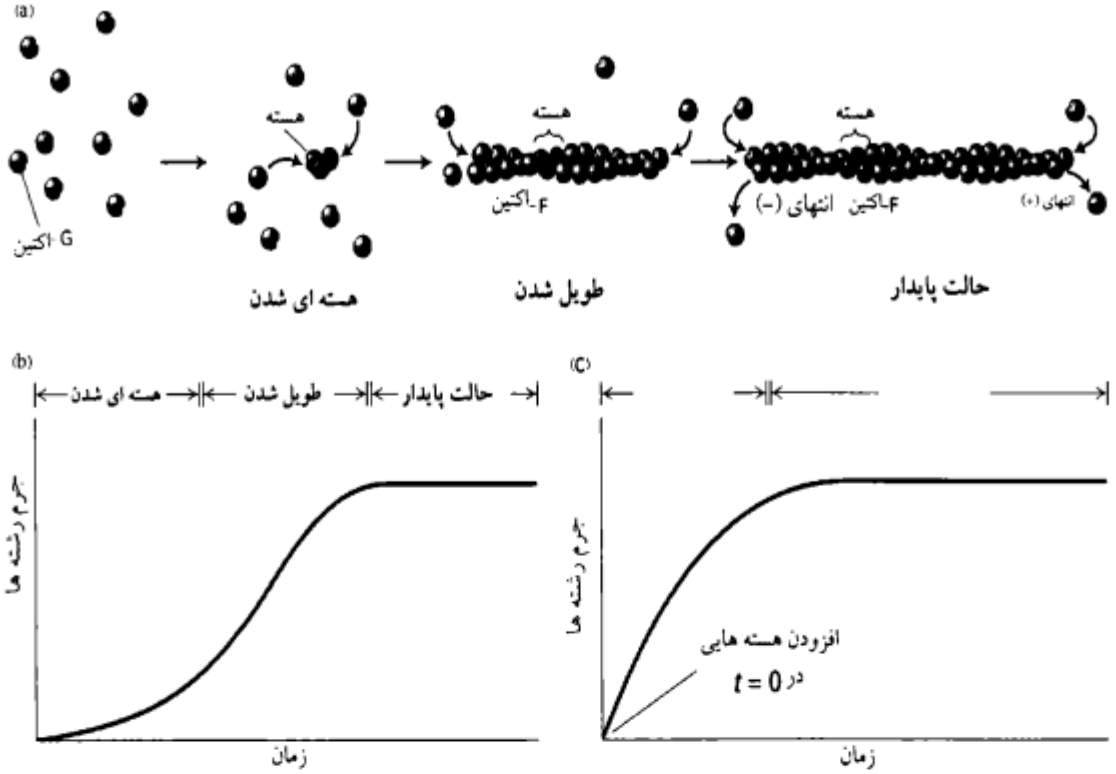
اسکلت سلولی اکتین یک ساختار استاتیک و تغییرناپذیر نیست و از یک سری دستجات و شبکه‌های رشته‌ای تشکیل شده است. اگرچه میکروفیلامنت‌ها ممکن است در بعضی از ساختارها استاتیک باشند، اما در ساختارهای دیگر از نظر طولی می‌توانند کوتاه یا طویل باشند. این تغییرات سازمان‌دهی رشته‌های اکتین، باعث ایجاد نیروهایی می‌شود که موجب تغییرات در شکل سلول یا حرکات داخل سلولی می‌گردد. در این بخش، ما مکانیسم و تنظیم پلیمریزاسیون اکتین را بررسی می‌کنیم، که به طور قابل توجهی مسئول طبیعت دینامیکی اسکلت سلولی می‌باشد.

پلیمریزاسیون اکتین در In vitro طی سه مرحله انجام می‌شود

پلیمریزاسیون G- اکتین (اکتین مونومر یا کروی) و تشکیل رشته‌های F-اکتین در *In Vitro* را می‌توان به وسیله ویسکومتری، رسوب‌دهی، اسپکتروسکوپی فلورسانس یا میکروسکوپ فلورسانس نشان داد (فصل ۹). زمانی که رشته‌های اکتین به اندازه کافی طویل و پیچیده می‌شوند، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد و وقتی با ویسکومتر اندازه‌گیری می‌شود، سرعت حرکت آن در ویسکومتر کاهش می‌یابد. اساس سنجش رسوب‌دهی توانایی اولتراسانتریفیوژ (۱۰۰/۰۰۰g در ۳۰ دقیقه) در رسوب‌دهی F-اکتین و نه G-اکتین می‌باشد. در سنجش سوم، از G-اکتین که به‌طور کوالان با یک رنگ فلورسنت نشان‌دار شده است، استفاده می‌شود؛ طیف فلورسانس مونومر G-اکتین در زمان پلیمراسیون آن به F-اکتین تغییر می‌یابد. سرانجام رشد رشته‌های نشاندار با فلورسنت را می‌توان با میکروسکوپی ویدئو فلورسانس تصویربرداری کرد. این سنجش‌ها در مطالعه کینتیک پلیمریزاسیون اکتین و شناسایی پروتئین‌های اتصالی به اکتین مفید می‌باشد. با شناسایی پروتئین‌های اتصالی به اکتین می‌توان دینامیک اکتین با اتصال رشته‌های اکتین به یکدیگر را تعیین کرد.

مکانیسم تجمع اکتین به‌طور وسیع مورد مطاله قرار گرفته است. به‌طور قابل ملاحظه‌ای، می‌توان G-اکتین را بدون تشکیل رشته در غلظت‌های بالاتر تخلیص کرد. این عمل نشان می‌دهد G-اکتین در

1- Pointed 2- Barded

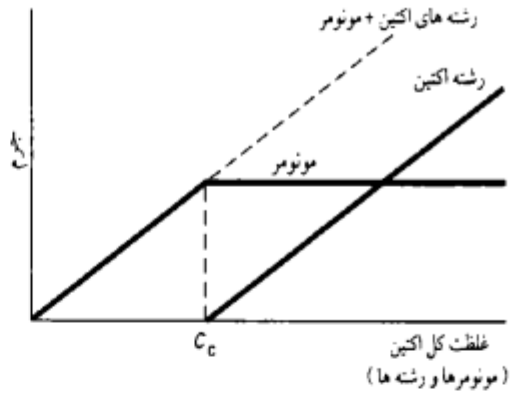


▲ **شکل ۱۷-۷ (شکل رنگی) پلیمریزاسیون G-اکتین در *In Vitro* طی سه فاز رخ می‌دهد.** (a) در فاز آغازین هسته‌ای شدن، مونومرهای G-ATP اکتین (رنگ قرمز) به آهستگی کمپلکس‌های پایدار اکتین تشکیل می‌دهند (ارغوانی). در فاز ثانویه هسته‌ها سریعاً با اضافه‌شدن زیرواحدها به هر دو انتهای رشته طویل می‌گردد. در فاز سوم، دو انتهای رشته‌های اکتین با مونومر G- اکتین در حالت پایدار می‌باشد. (b) نمودار زمانی واکنش پلیمریزاسیون در *In Vitro* زمان تأخیری اولیه در هسته‌ای شدن، فاز طویل شدن و حالت پایدار را نشان می‌دهد. (c) هر گاه چند قطعه کوتاه از رشته اکتین پایدار در مرحله آغاز واکنش اضافه گردد تا به عنوان هسته عمل کند، مرحله طویل‌سازی بدون زمان تأخیری پیش می‌رود.

اکتین خواهد بود. پلیمریزاسیون G-اکتین خالص در *In Vitro* طی بافر دارای ATP و سطح پایین کاتیون‌ها حفظ می‌شود. با وجود این، همان‌طور که در بالا مشاهده کردیم، هر گاه سطح کاتیونی افزایش یابد (به عنوان مثال $100mM\ K^+$ و $2mM\ Mg^{2+}$)، G- اکتین پلیمریزه خواهد شد و کینتیک واکنش بستگی به غلظت آغازین G-سه فاز متوالی انجام می‌گیرد (شکل ۱۷-۷a). فاز اول، **فاز هسته‌ای شدن**[1] به وسیله یک زمان تأخیری مشخص می‌شود که طی آن زیرواحدهای G- اکتین به الیگومرهای کوتاه و ناپایداری تبدیل می‌شوند. زمانی که الیگومر از نظر طولی به سه زیرواحد رسید، به صورت یک دانه یا هسته پایدار درمی‌آید که در فاز دوم، **فاز طویل شدن**، سریعاً از نظر طولی با اضافه شدن مونومرهای اکتین به هر دو انتهای آن، رشته‌ای می‌شوند. وقتی که رشته‌های F- اکتین رشد می‌کنند غلظت مونومرهای G- اکتین تا زمانی که بین رشته‌های اکتین و مونومرهای اکتین تعادل برقرار گردد، کاهش می‌یابد. در فاز سوم، **فاز حالت پایدار**[2]، مونومرهای G-اکتین در دو انتهای رشته اکتین با زیرواحدها مبادله می‌گردند اما در جرم کلی رشته‌های اکتین هیچ تغییر خالصی به وجود نمی‌آید. منحنی‌های کینتیکی شکل ۱۷-۷c نشان می‌دهد که زمان تأخیری به دلیل وجود فاز هسته‌ای شدن می‌باشد و آن را می‌توان با اضافه کردن مقدار کمتری از هسته‌های F- اکتین به محلول G- اکتین حذف کرد.

چه مقدار G- اکتین به منظور تشکیل خودبه‌خودی یک رشته اکتین مورد نیاز است؟ هر گاه G-ATP-اکتین در غلظت‌های متفاوتی تحت شرایط پلیمریزاسیون قرار گیرد، در پایین‌تر از غلظت مشخصی هیچ رشته‌ای تشکیل نمی‌گردد (شکل ۱۷-۸). رشته‌ها در بالاتر از این غلظت تشکیل می‌گردند و وقتی به حالت پایدار رسید افزودن زیرواحدهای آزاد با تفکیک زیرواحدهایی از انتهاهای رشته اکتین به تعادل می‌رسد و مخلوطی از رشته‌ها و مونومرها را خواهیم داشت. غلظتی را که در آن رشته‌ها تشکیل می‌گردد، به **غلظت**

1- Nucleation phase 2- Steady state

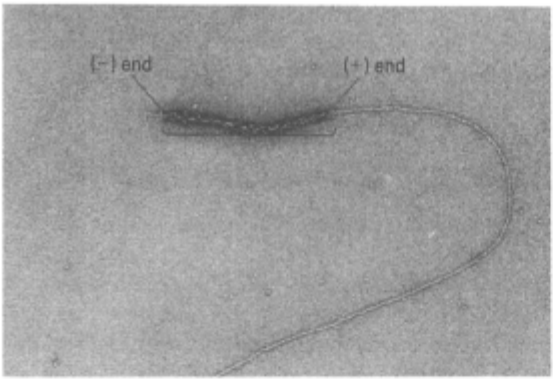


▲ **شکل ۸ـ۱۷ غلظت اکتین، تشکیل رشته را تعیین می‌کند.** غلظت بحرانی (C_c) غلظتی است که در آن مونومرهای G- اکتین با رشته‌های اکتین در تعادل است. در غلظت‌های مونومری پایین‌تر از C_c هیچ‌گونه پلیمریزاسیونی اتفاق نمی‌افتد. وقتی که پلیمریزاسیون در غلظت‌های مونومری بیشتر از C_c تحریک شود، رشته‌های اکتین تا رسیدن به حالت پایدار تشکیل می‌شود و غلظت مونومری C_c افت می‌کند.

بحرانی[1] کلی، C_c معروف است. در پایین‌تر از C_c، رشته‌ها تشکیل نمی‌گردند در حالی که در بالاتر از C_c رشته‌ها تشکیل می‌گردند. در حالت پایدار، غلظت اکتین مونومر به اندازه غلظت بحرانی می‌باشد (شکل ۸ـ۱۷).

رشته‌های اکتین در انتهای (+) سریع‌تر از انتهای (-) رشد می‌کنند

پیش‌تر مشاهده کردیم که آزمایشات آذین‌بندی سر S1 میوزین یک قطبیت ساختاری ذاتی در F- اکتین نشان داد (شکل ۶ـ۱۷ را ملاحظه کنید). هر گاه G-ATP- اکتین به رشته آذین‌بندی‌شده با میوزین اضافه شود، دو انتهای رشته با سرعت‌های متفاوتی رشد می‌کنند (شکل ۹ـ۱۷). در واقع در یک غلظت مشخصی از G-ATP-اکتین آزاد، سرعت اضافه شدن G-ATP-اکتین تقریباً در انتهای (+)، ۱۰ برابر بیشتر از انتهای (-) می‌باشد. سرعت اضافه شدن توسط غلظت آزاد G-ATP- اکتین تعیین می‌شود. آزمایشات کینتیکی نشان داده است که سرعت اضافه شدن در انتهای (+) تقریباً $۱۲\mu M^{-1}s^{-1}$ و در انتهای (-) تقریباً $۱/۳\mu M^{-1}s^{-1}$ می‌باشد (شکل ۱۰ـ۱۷a). به این معنا که هر گاه $۱\mu M$ G -ATP- اکتین آزاد به رشته‌های اکتین اضافه گردد، به‌طور متوسط در هر ثانیه ۱۲ زیرواحد به انتهای (+) اضافه می‌شود در حالی که تنها ۱/۳ زیرواحد در هر ثانیه به انتهای (-) اضافه می‌گردد. سرعت جدا شدن زیرواحدها از هر انتها چگونه می‌باشد؟ بر خلاف سرعت اضافه شدن، سرعت



▲ **شکل تجربی ۹ـ۱۷ دو انتهای رشته اکتین آذین‌بندی شده با میوزین به صورت نابرابر رشد می‌کنند.** وقتی که رشته‌های کوتاه اکتین با سر S1 میوزین آذین‌بندی شدند و سپس به منظور هسته‌ای کردن پلیمریزاسیون اکتین مورد استفاده قرار گرفت، زیرواحدهای اکتین به انتهای (+) رشته هسته‌ای شده با کارآیی بیشتری نسبت به انتهای (-) آن اضافه می‌گردد. این نتایج نشان می‌دهد که مونومرهای G- اکتین به انتهای (+) سریع‌تر از انتهای (-) اضافه می‌گردند.

تفکیک زیرواحدهای G-ATP- اکتین از دو انتها کاملاً مشابه است،به طوری که $۱/۴s^{-1}$ از انتهای مثبت و $۸s^{-1}$ از انتهای (-) می‌باشد. بدلیل این که جدا شدن، سرعتی است که در آن زیرواحدها دو انتها را ترک می‌کنند، آن بستگی به غلظت G-ATP- اکتین ندارد.

این فرایند چه تأثیری بر دینامیک اکتین دارد؟ ابتدا اجازه دهید که فقط انتهای (+) را بررسی کنیم. همان‌گونه که در بالا اشاره شد، سرعت اضافه شدن به غلظت G-ATP- اکتین وابسته است، در حالی که سرعت جداشدن زیرواحدها مستقل از آن می‌باشد. بنابراین در غلظت‌های بالای G-ATP- اکتین آزاد، زیرواحدها اضافه می‌گردند، اما وقتی که غلظت کاهش می‌یابد، به نقطه‌ای می‌رسد که در آن سرعت اضافه شدن با سرعت جدا شدن متعادل می‌شود و هیچ‌گونه رشد خالصی در آن انتها رخ نمی‌دهد. این غلظت به غلظت بحرانی C^+_c انتهای (+) معروف است و ما می‌توانیم آن را با تنظیم سرعت تجمع و سرعت تفکیک محاسبه کنیم. بنابراین در غلظت بحرانی، سرعت تجمع، C^+_c برابر سرعت افزوده شدن $۱۲\mu M^{-1}s^{-1}$ می‌باشد در حالی که سرعت تفکیک مستقل از غلظت اکتین آزاد است و $۱/۴s^{-1}$ می‌باشد. با مقایسه این معادله‌ها با یکدیگر C^+_c برای انتهای (+) $۰/۱۲\mu Ms^{-1}$ می‌شود. در بالاتر از این غلظت

1- Critical concentration

G-ATP- اکتین، زیرواحدها به انتهای (+) اضافه می‌شود و عمل رشد اتفاق می‌افتد، در حالی که در پایین‌تر از این غلظت تفکیک زیرواحدها مشاهده می‌گردد و در نتیجه رشته کوتاه خواهد شد.

حال اجازه دهید به بررسی انتهای (-) بپردازیم. به دلیل این‌که سرعت اضافه شدن بسیار پایین است، $۱/۳\mu M^{-1}s^{-1}$ و سرعت تجزیه تقریباً مشابه است، $۰/۸s^{-1}$، غلظت بحرانی C^-_c در انتهای (-) تقریباً $۱/۳\mu M^{-1}s^{-1}$ / $۰/۸s^{-1}$ یعنی $۰/۶\mu M$ می‌باشد. بنابراین در غلظت G-ATP- اکتین کمتر از $۰/۶\mu M$، مثلاً $۰/۳\mu M$، زیرواحدها از انتهای (-) جدا خواهند شد. اما در این غلظت چون $۰/۳\mu M$ بیشتر C^+_c است، در انتهای (+) رشد را خواهیم داشت. به دلیل این‌که غلظت‌های بحرانی متفاوت می‌باشد، در حالت پایدار، G-ATP- اکتین آزاد حد واسط بین C^+_c و C^-_c خواهد بود و بنابراین انتهای (+) رشد خواهد کرد و در انتهای (-) جدا شدن زیرواحدها وجود خواهد داشت. این پدیده به **تریدمیلینگ**[1] معروف است (شکل ۱۷ـ۱۰b را ملاحظه کنید).

توانایی رشته‌های اکتین در تریدمیلینگ ناشی از هیدرولیز ATP می‌باشد. زمانی که G-ATP- اکتین به انتهای (+) متصل می‌شود، ATP به ADP و Pi هیدرولیز می‌گردد. Pi به آهستگی از زیرواحد موجود در رشته اکتین آزاد می‌شود، به‌طوری که رشته نامتقارن می‌شود. به این معنی که زیرواحدهای ATP- اکتین در انتهای (+) رشته قرار می‌گیرد و در ادامه نواحی دارای زیرواحدهای P_i-ADP- اکتین و ADP- اکتین در سمت انتهای (-) قرار می‌گیرند (شکل ۱۷ـ۱۰a). در هنگام هیدرولیز ATP و در نتیجه آزاد شدن P_i از زیرواحدهای رشته اکتین، اکتین متحمل تغییر ساختمان فضایی می‌گردد بطوری که این تغییر مسئول سرعت‌های متفاوت اتصال و تفکیک در دو انتها می‌باشد. در اینجا، ما تنها کینتیک G-ATP- اکتین را بررسی کردیم، اما در واقع آن چیزی که از انتهای (-) جدا می‌شود، G-ADP- اکتین است. مبنای تجزیه و تحلیل‌های ما وجود مقدار فراوان G-ATP- اکتین می‌باشد که همان‌طور که خواهیم دید، در *In Vitro* نیز صادق است. بنابراین به منظور تریدمیلینگ، اکتین از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP استفاده می‌کند و همان‌طور که بعداً خواهیم دید رشته‌های در حال تریدمیلینگ در *In Vivo* توانایی انجام کار دارند.

تریدمیلینگ رشته اکتین توسط پروفیلین و کوفیلین تسریع می‌گردد

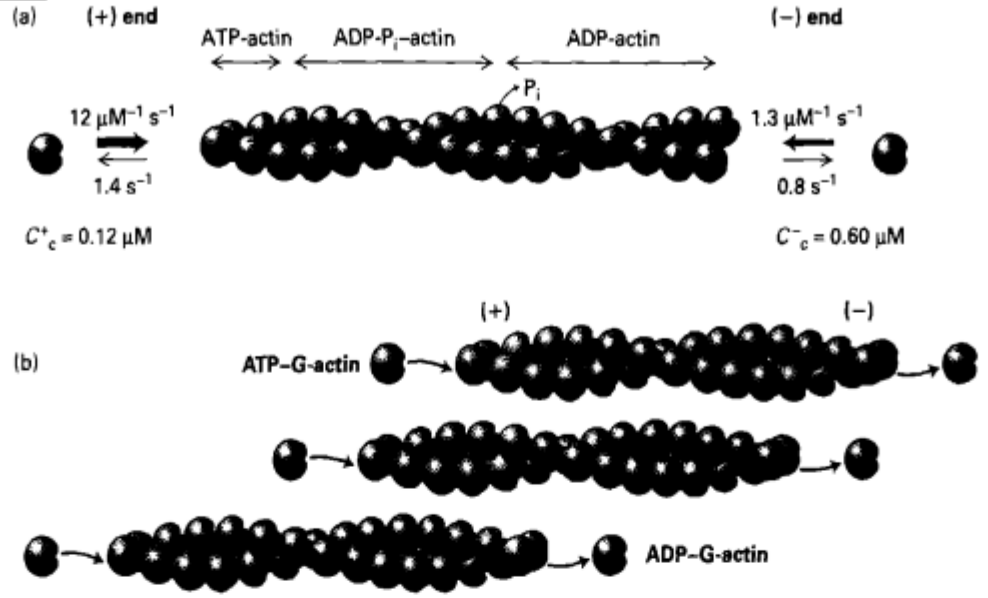
اندازه‌گیری سرعت تریدمیلینگ در *In Vivo* نشان می‌دهد که آن چند برابر سریع‌تر از تریدمیلینگ اکتین خالص در *In Vitro* می‌باشد. طبق مدل تریدمیلینگ، رشد رشته‌های اکتین در *In Vitro* تنها در انتهای (+) اتفاق می‌افتد. چگونه تریدمیلینگ افزایش می‌یابد و چگونه سلول ADP- اکتین جدا شده از انتهای (-) را به ATP- اکتین تبدیل می‌کند تا در انتهای (+) تجمع یابد؟ دو پروتئین متصل‌شونده به اکتین سهم مهمی در این فرایندها دارند.

پروتئین اول **پروفیلین**[2] می‌باشد. پروفیلین پروتئین کوچکی می‌باشد که به G- اکتین در سمت مخالف شکاف اتصالی به نوکلئوتید، متصل می‌شود. وقتی پروفیلین به ADP-اکتین متصل شده، باعث باز شدن شکاف شده و آزاد شدن ADP را افزایش می‌دهد. آزاد شدن ADP باعث جایگزینی ATP می‌گردد و باعث تولید کمپلکس پروفیلین-ATP- اکتین می‌گردد. این کمپلکس به دلیل این‌که پروفیلین جایگاه ضروری برای اتصال به انتهای (-) را در G- اکتین مسدود کرده است، نمی‌تواند به انتهای (-) متصل شود. با وجود این، کمپلکس پروفیلین-ATP- اکتین می‌تواند به‌طور کارآیی به انتهای (+) متصل شود و سپس بعد از این‌که زیرواحد جدید اکتین کاملاً متصل شد، پروفیلین جدا می‌شود (شکل ۱۷ـ۱۱). این عمل تریدمیلینگ را تسریع نمی‌کند، بلکه باعث تأمین ATP- اکتین از ADP- اکتین می‌شود؛ در نتیجه تمامی G- اکتین موجود در سلول اساساً به ATP متصل هستند.

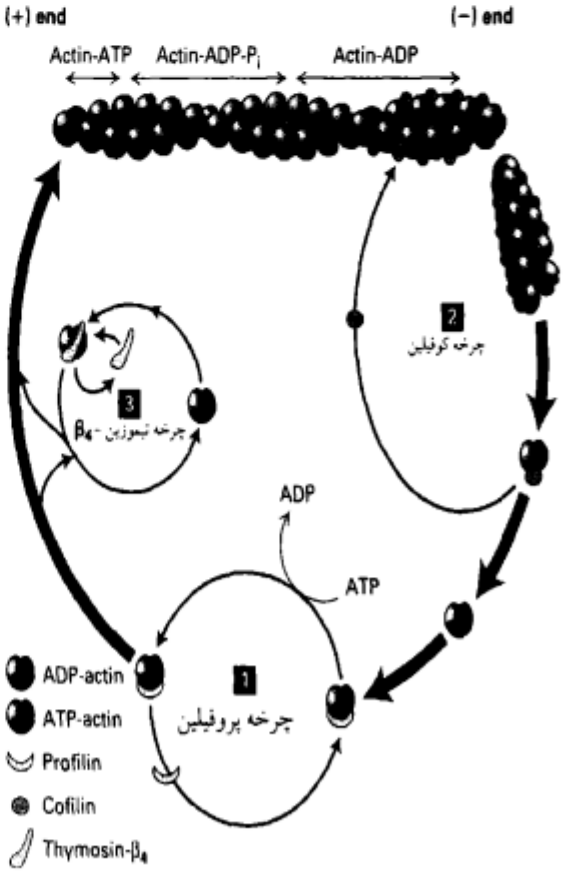
پروفیلین یک ویژگی مهم دیگری نیز دارد: این پروتئین می‌تواند همزمان با اتصال به اکتین به پروتئین‌های دارای توالی غنی از اسید آمینه پرولین نیز متصل شود. ما بعداً خواهیم دید که چگونه این ویژگی در تجمع رشته اکتین مهم می‌باشد (شکل ۱۷ـ۱۴).

کوفیلین[3] نیز یک پروتئین کوچکی می‌باشد، اما به‌طور ویژه به F- اکتین که در آن زیرواحدها دارای ADP می‌باشد، متصل می‌شود. اگر به سمت انتهای (-) حرکت کنیم، این زیرواحدها قدیمی‌ترین زیرواحدها خواهند بود. کوفیلین به طریقه پل زدن به دو مونومر اکتین متصل می‌شود و باعث القا یک تغییر کوچک در پیچ‌خوردگی رشته می‌شود. این پیچ‌خوردگی رشته اکتین را ناپایدار کرده و آن را به قطعات کوتاه‌تر تجزیه می‌کند. به این طریق با شکستن رشته اکتین به این طریق، کوفیلین باعث تولید تعداد زیادی انتهای (-) آزاد می‌گردد و بنابراین شدیداً باعث تسریع تفکیک در انتهای (-) رشته می‌گردد (شکل ۱۷ـ۱۱ را ملاحظه کنید). سپس

1- Treadmilling
2- Profilin
3- Cofilin



▲ **شکل ۱۰-۱۷ زیرواحدهای ATP- اکتین به انتهای (+) سریع‌تر از انتهای (−) اضافه می‌شود و باعث ایجاد کمترین غلظت بحرانی و تریدمیلینگ در حالت پایدار می‌شوند.** (a) سرعت اضافه شدن G-ATP- اکتین در انتهای (+) سریع‌تر از انتهای (−) است در حالی که سرعت تفکیک G- اکتین در دو انتها مشابه می‌باشد. این اختلاف منجر به حداقل غلظت بحرانی در انتهای (−) می‌شود. در حالت پایدار، ATP- اکتین ترجیحاً به انتهای (+) اضافه می‌شود، و باعث می‌شود ناحیه کوتاهی از رشته اکتین دارای ATP- اکتین و ناحیه بزرگی در سمت انتهای (−) دارای ADP- Pi- اکتین و ADP- اکتین گردد. (b) در حالت پایدار زیرواحدهای ATP- G- اکتین ترجیحاً به انتهای (+) اضافه می‌گردد، در حالی که زیرواحدهای ADP- اکتین از انتهای (−) جدا می‌شود که باعث تریدمیلینگ زیرواحدها می‌گردد.



▶ **شکل ۱۱-۱۷ پروتئین‌های اتصالی به اکتین سرعت تشکیل و تجزیه به علاوه در دسترس بودن G- اکتین به منظور پلیمریزاسیون را تنظیم می‌کنند.** در چرخه پروفیلین ❶، پروفیلین به G-ADP-اکتین متصل شده و باعث جایگزینی ADP با ATP می‌گردد. کمپلکس G-ATP-اکتین-پروفیلین می‌تواند به سمت انتهای مثبت حرکت و یا اینکه جدا شود. در چرخه کوفیلین ❷، کوفیلین ترجیحاً به رشته‌های دارای ADP- اکتین متصل‌شده و باعث قطعه قطعه شدن آنها می‌شود و بنابراین، پلیمریزاسیون را با تولید انتهاهای بیشتر تسریع می‌کند. در چرخه تیموزین ـ $\beta 4$ ❸، تیموزین ـ $\beta 4$ به G- اکتین متصل می‌شود و مانع از پلیمریزاسیون آن می‌شود. وقتی که به دلیل پلیمریزاسیون غلظت G- اکتین آزاد کاهش یافت، G- اکتین ـ تیموزین تجزیه می‌شود تا G- اکتین آزاد کافی برای پلیمریزاسیون در دسترس باشد.

زیرواحدهای ADP- اکتین آزاد شده مجدداً توسط پروفیلین شارژ می‌شود و همان‌طور که در بالا اشاره شد، به انتهای (+) اضافه می‌گردد. با این روش، پروفیلین و کوفیلین تریدمیلینگ را در *In Vivo* به میزان بیشتر از ده برابر آن در *In Vitro* تسریع می‌کنند.

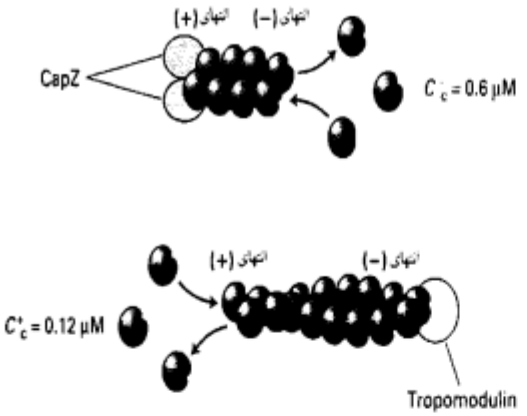
تیموزین β_4 منبع اکتین برای پلیمریزاسیون را تأمین می‌کند

مدت‌هاست که مشخص شده است که سلول‌ها اغلب دارای ذخیره عظیمی از اکتین پلیمریزه نشده می‌باشد، به‌طوری که این نوع اکتین برخی اوقات نصف اکتین موجود در سلول را تشکیل می‌دهد. اگر سطح اکتین سلولی ۱۰۰-۴۰۰μM باشد، مقدار اکتین پلیمریزه نشده ۵۰-۲۰۰μM خواهد بود. از آنجایی که غلظت بحرانی در *In Vitro* تقریباً ۰/۲μM است، چرا تمام این اکتین‌ها پلیمریزه نمی‌شود؟ جواب به این سئوال، حداقل بخشی از جواب، به حضور پروتئین‌های حبس‌کننده مونومر اکتین برمی‌گردد. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین کوچک تیموزین - β_4 می‌باشد که به G-ATP-اکتین متصل می‌شود و از اضافه شدن زیرواحد اکتین به هر یک از انتهاهای رشته اکتین ممانعت می‌کند. تیموزین - β_4 به میزان خیلی فراوان برای مثال در پلاکت‌های خونی انسانی یافت می‌شود. این تکه‌های سلولی دیسکی شکل[1] در خون بسیار فراوان هستند و زمانی که در هنگام لخته شدن خون فعال می‌گردد متحمل انفجار تشکیل اکتین می‌گردند. پلاکت‌ها غنی از اکتین هستند: تخمین زده می‌شود که غلظت کلی اکتین آنها ۵۵۰μM باشد و ۲۲۰μM آن به صورت پلیمریزه نشده باشد. آنها هم‌چنین تقریباً دارای ۵۰۰μM تیموزین - β_4 هستند که بیشتر اکتین‌های آزاد را حبس می‌کند. با وجود این، مانند هر میانکش پروتئین - پروتئین، اکتین آزاد و تیموزین - β_4 آزاد با کمپلکس اکتین - تیموزین - β_4 در تعادل پویا می‌باشد. هر گاه مقداری از اکتین آزاد در پلیمراسیون مورد استفاده قرار گیرد به همان مقدار اکتین - تیموزین - β_4 تجزیه می‌شود تا باعث تأمین اکتین آزاد برای پلیمریزاسیون گردد (شکل ۱۱-۱۷ را ملاحظه کنید). بنابراین تیموزین β_4 به عنوان بافر اکتین پلیمریزه نشده، عمل می‌کند.

پروتئین‌های کلاهکی تشکیل و تجزیه رشته‌های اکتین را در انتهای آنها مسدود می‌کند

در سلول‌ها تریدمیلینگ و دینامیک رشته‌های اکتین توسط **پروتئین‌های کلاهکی**[2]، که به‌طور اختصاصی به دو انتهای رشته‌ها متصل می‌شود، تنظیم می‌گردد. هر گاه چنین تنظیمی وجود نداشت رشته‌های اکتین به صورت غیر قابل کنترل رشد و تجزیه می‌شدند. دو گروه پروتئین کشف شده است: یک گروه به انتهای (+) و گروه دیگر به انتهای (-) متصل می‌شوند (شکل ۱۲-۱۷).

پروتئینی به نام **CapZ** که از دو زیرواحد تشکیل شده است، با تمایل بسیار بالایی (۰/۱nM) به انتهای (+) رشته‌های اکتین متصل شده و از اضافه شدن و آزاد شدن زیرواحدها در آن ناحیه ممانعت



▲ **شکل ۱۲-۱۷ پروتئین‌های کلاهکی تشکیل و تجزیه انتهای رشته‌های اکتین را مهار می‌کنند.** CapZ انتهای (+) را مسدود می‌کند. این انتها محل رشد طبیعی رشته‌های اکتین می‌باشد، بنابراین نقش آن مهار رشد اکتین در انتهای (+) است. پروتئین کلاهکی مثل تروپومدولین انتهای (-) را مسدود می‌کند، این انتها محل تجزیه طبیعی رشته اکتین می‌باشد، بنابراین نقش آن پایدارسازی رشته‌های اکتین می‌باشد.

می‌کند. در سلول‌ها غلظت CapZ به اندازه کافی است و سریعاً انتهای (+) هر رشته تازه تشکیل شده را پوشش می‌دهد. پس چگونه رشته‌ها می‌توانند از انتها (+) خودشان رشد کنند؟ حداقل دو مکانیسم فعالیت CapZ را تنظیم می‌کند. اول، فعالیت کلاهکی CapZ توسط لیپید تنظیمی PI(4,5)P2 موجود در غشای پلاسمایی مهار می‌گردد (فصل ۱۶). دوم، مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین‌های تنظیمی ویژه‌ای می‌توانند به انتهای (+) متصل شوند و به‌طور خودبه‌خودی از اتصال CapZ ممانعت کنند، ولی مانع تشکیل رشته نشوند. بنابراین وقتی در سلول‌ها نیاز به تشکیل رشته اکتین وجود ندارد، مکانیسم دقیقی برای ممانعت از تشکیل رشته‌های اکتین در انتهای (+) آنها به وجود آمده است.

پروتئین دیگری به نام **تروپومدولین**[3] به انتهای (-) رشته‌های اکتین متصل می‌شود و از تشکیل و تجزیه رشته اکتین جلوگیری می‌کند. این پروتئین غالباً در سلول‌هایی یافت می‌شود که در آن بایستی رشته‌های اکتین شدیداً به صورت پایدار وجود داشته باشد. دو مورد از این نوع رشته‌ها که در ادامه این فصل خواهیم دید، شامل رشته‌های کوتاه اکتین در کورتکس سلول‌های قرمز خونی و

1- Discoid-shaped
2- Capping proteins
3- Tropomodulin

رشته‌های اکتین موجود در عضلات می‌باشد. همان‌طور که خواهیم دید، در هر دو مورد تروپومدولین با پروتئین دیگری به نام، تروپومیوزین همکاری می‌کند. تروپومیوزین در طول رشته اکتین قرار می‌گیرد و آن را پایدار می‌کند. تروپومدولین هم به تروپومیوزین و هم به انتهای (-) اکتین متصل می‌شود و شدیداً باعث پایداری رشته اکتین می‌شود.

علاوه بر CapZ، گروه دیگری از پروتئین‌ها نیز می‌توانند به انتهای (+) رشته‌های اکتین متصل شوند. این پروتئین‌ها هم‌چنین می‌توانند رشته‌های اکتین را به دو بخش تقسیم کنند. یک عضو این خانواده، **ژل‌سولین**[1] است که با افزایش Ca^{2+} تنظیم می‌گردد. هنگام اتصال Ca^{2+}، ژل سولین متحمل تغییر کنفورمانسیون می‌گردد بطوری که این تغییر باعث می‌شود ژل‌سولین به بخشی از رشته اکتین متصل شود و بین زیرواحدهای هلیکس قرار گیرد و بنابراین به این طریق باعث شکستن رشته اکتین گردد. سپس ژل‌سولین در انتهای (+) باقی می‌ماند و یک انتهای (-) جدید ایجاد می‌کند که می‌تواند تجزیه شود. پروتئین‌هایی که بین رشته‌های اکتین ارتباط عرضی برقرار می‌کنند باعث تبدیل محلولی از رشته‌ها به ژل می‌شوند و تحت شرایطی که Ca^{2+} افزایش یافته است، ژل سولین رشته‌های اکتین را می‌شکند و باعث تبدیل آن به سول می‌گردد؛ نام ژل سولین به دلیل حالت تبدیل ژل و سول به یکدیگر می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۷

دینامیک رشته‌های اکتین

- مرحله محدودکننده سرعت تجمع اکتین تشکیل الیگومرهای کوتاه اکتین (هسته) می‌باشد که سپس طویل شده و تشکیل رشته‌های اکتین می‌کند.
- غلظت بحرانی (C_c)، غلظتی از G-اکتین است که در آن تشکیل و تجزیه در انتهای رشته اکتین متعادل باشد.
- وقتی که غلظت G-اکتین بیشتر از C_c باشد رشته رشد می‌کند وقتی که غلظت آن کمتر از C_c باشد رشته کوتاه خواهد شد (شکل ۸-۱۷ را ملاحظه کنید)
- G-ATP-اکتین به انتهای (+) سریعتر از انتهای (-) اضافه می‌شود، در نتیجه باعث می‌شود در انتهای (+) غلظت بحرانی کمتر از انتهای (-) باشد.
- در حالت پایدار، زیرواحدهای اکتین در رشته اکتین تریدمیل می‌کنند. ATP ـ اکتین به انتهای (+) اضافه می‌شود، سپس ATP به ADP و P_i هیدرولیز شده و ADP - اکتین از انتهای (-) جا جدا می‌شود.
- طول و سرعت نو شدن رشته‌های اکتین توسط پروتئین‌های اتصالی به اکتین تنظیم می‌گردد. پروفیلن باعث جایگزینی ADP با ATP در G - اکتین می‌گردد؛ کوفیلین سرعت جداشدن ADP - اکتین از انتهای (-) رشته اکتین می‌گردد، و تیموزین - β_4 به G - اکتین متصل می‌شود و آنرا تا موقع نیاز ذخیره می‌کند. پروتئین‌های کلاهکی به انتهای رشته اکتین اضافه می‌شوند وتشکیل و تجزیه آن را مهار می‌کنند.

۳ـ۱۷ مکانیسم‌های تشکیل رشته اکتین

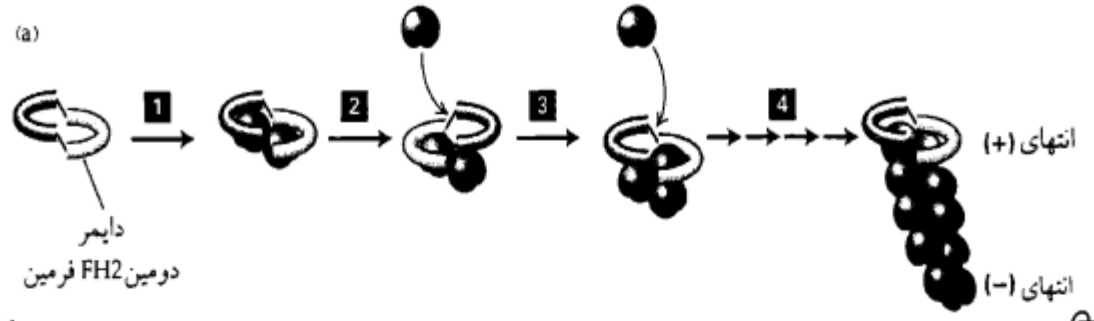
مرحله محدودکننده پلیمریزاسیون اکتین در *In Vitro* تشکیل هسته اولیه اکتین است که از آن رشته اکتین شروع به رشد می‌کنند (مثل ۷a-۱۷ را ملاحظه کنید). در سلول‌ها از این خاصیت ذاتی اکتین به عنوان یک نقطه کنترلی در تعیین مکان تشکیل رشته‌های اکتین استفاده می‌شود. به همین دلیل است که در یک سلول تشکیلات متفاوت اکتین تشکیل می‌گردد (شکل ۱-۱۷ و ۴-۱۷ را ملاحظه کنید). دوگروه پروتئین هسته‌ای کننده اکتین[2]، خانواده پروتئینی **فرمین** و کمپلکس *Arp2/3*، تشکیل هسته اکتین را تحت کنترل مسیرهای انتقال پیام هدایت می‌کند. هم‌چنین آنها باعث تشکیل هسته تشکیلات مختلف اکتین می‌گردند: فرمین‌ها باعث تشکیل رشته‌های طویل اکتین می‌گردند، در حالی که کمپلکس Arp2/3 باعث تشکیل شبکه‌های اکتین شاخه‌دار می‌گردد. ما هر کدام از آنها را به‌طور جداگانه بحث خواهیم کرد و مشاهده خواهیم کرد که قدرت پلیمریزاسیون اکتین می‌تواند باعث انرژی بخشی به فرایندهای حرکتی سلول گردد.

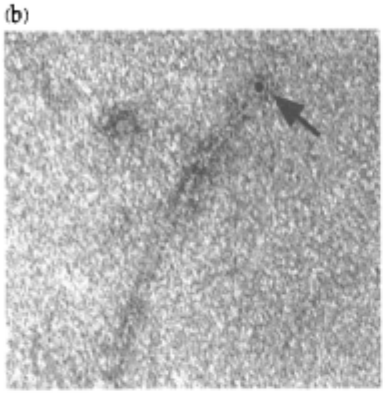
فرمین‌ها باعث تشکیل رشته‌های غیر شاخه‌دار می‌گردند

فرمین‌ها اساساً در همه سلول‌های یوکاریوتی به صورت یک خانواده پروتئینی متنوع یافت می‌شوند: هفت گروه مختلف از آنها در مهره‌داران وجود دارد. اگرچه فرمین‌ها متنوع هستند، تمامی اعضای خانواده‌های آنها دارای دو دُمین مجاور می‌باشند. این دُمین‌ها FH1 و FH2 (دُمین‌های همولوژی فرمین 1 و2) نامیده می‌شوند. دو دُمین FH2، که دارای نقش مهم در تشکیل هسته می‌باشد، به یکدیگر متصل می‌شوند و یک کمپلکس حلقه‌ای شکل تشکیل می‌دهند

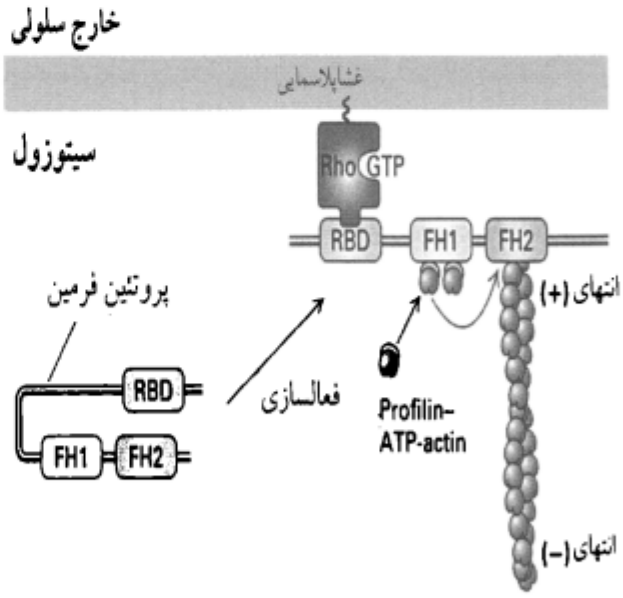
1- Gelsolin

2- Actin nucleating proteins



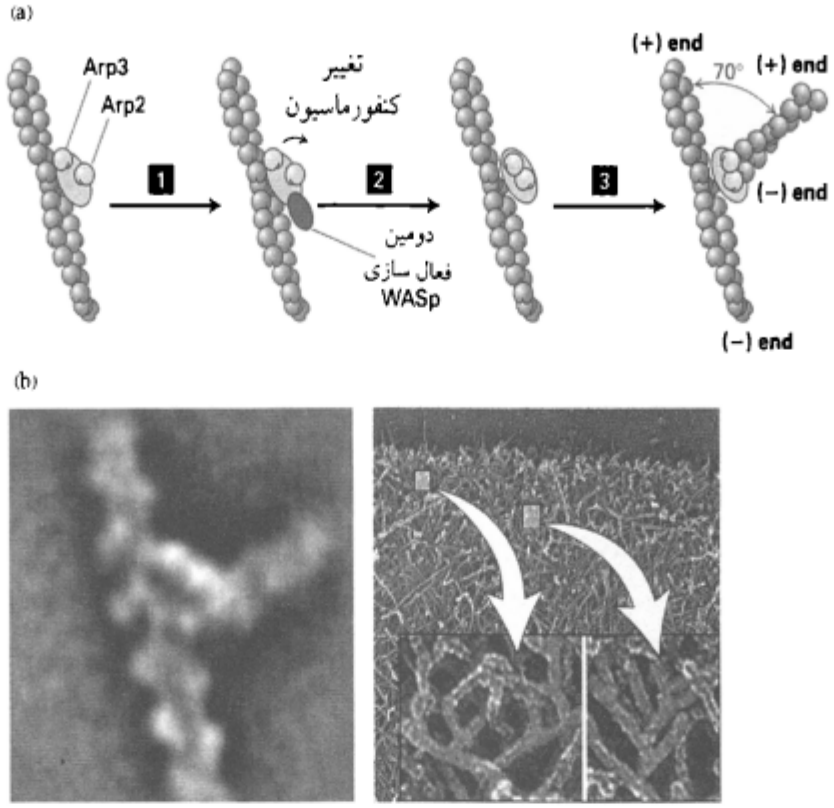


◀ شکل ۱۳-۱۷ هسته‌ای شدن اکتین توسط دُمین FH2 فرمین. (a) فرمین‌ها دارای دُمینی به نام FH2 هستند که می‌تواند تشکیل دایمر داده و باعث تشکیل هسته اکتین گردد. دایمر به دو زیرواحد اکتین متصل می‌شود ❶ و با نوسان به جلو و عقب (❹ ❷) دو زیرواحد دیگر بین دُمین FH2 و انتهای (+) رشته در حال رشد وارد می‌کند. دُمین FH2 فرمین انتهای (+) را از پروتئین‌های کلاهکی محافظت می‌کند. (b) دُمین FH2 فرمین توسط طلای کلوئیدی (نقطه‌های سیاه) نشان‌دار شده است و در تشکیل هسته رشته اکتین مورد استفاده قرار می‌گیرد. رشته حاصل، بعد از رنگ‌آمیزی توسط اورانیل‌استات توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. فرمین‌ها باعث تشکیل رشته‌های غیر منشعب طویل می‌شوند.



◀ شکل ۱۴-۱۷ تنظیم فرمین توسط یک میانکش داخل مولکولی. حداقل یکی از ۷ گروه فرمین موجود در مهره‌داران توسط یک میانکش داخل مولکولی تنظیم می‌گردد. فرمین غیر فعال با اتصال Rho-GTP فعال متصل به غشاء به دُمین اتصالی Rho (RBD) آن فعال می‌گردد. این اتصال باعث ظهور دُمین FH2 می‌شود که سپس به نوبه خود باعث تشکیل هسته رشته جدید اکتین می‌گردد. همه فرمین‌ها دارای یک دُمین FH1 مجاور با دُمین FH2 می‌باشند: دُمین FH1 غنی از پرولین، مکان اتصال کمپلکس‌های پروفیلین -G-ATP-اکتین می‌باشد. سپس پروفیلین -G-GTP-اکتین در انتهای (+) در حال رشد قرار می‌گیرد. در این شکل به منظور سادگی، یک پروتئین واحد فرمین نشان داده شده است، اما همان‌طور که در شکل ۱۳-۱۷ نشان داده شده است، پروتئین بایستی به صورت دایمر باشد تا باعث تشکیل هسته اکتین گردد.

(شکل ۱۳a-۱۷). این کمپلکس به دو زیرواحد اکتین متصل شده و باعث هسته‌ای‌شدن اکتین می‌گردد، به‌طوری که انتهای (+) در سمت دُمین‌های FH2 قرار می‌گیرد. رشته اکتین تشکیل شده، در حالی که دایمر دُمین FH2 هنوز به صورت متصل باقی مانده است، رشد می‌کند. چگونه این عمل امکان‌پذیر است؟ همان‌گونه که در قبل مشاهده کردیم، یک رشته اکتین به صورت دو رشته درهم‌بافته‌ای از زیرواحدها می‌باشد. دیمر FH2 به دو زیرواحد انتهایی متصل می‌شود. احتمالاً آن بین زیرواحدهای دو انتها نوسان می‌کند و باعث



▲**شکل ۱۵ـ۱۷ تشکیل هسته اکتین توسط کمپلکس Arp2/3.** (a) برای این‌که هسته اکتین باکارآیی بالاتر تشکیل گردد، کمپلکس Arp2/3 به کنار رشته اکتین ❶ و به یک فعال‌کننده‌ای مثل دُمین C- ترمینال پروتئین WASp متصل می‌شود ❷. این عمل باعث القا تغییر ساختمان فضایی Arp2/3 می‌گردد، به‌طوری که کمپلکس می‌تواند به دو زیرواحد اکتین که دارای ساختمان فضایی شبیه اُنتهای (+) است، متصل شود ❸ و تجمع اکتینی صورت می‌گیرد. شاخه Arp2/3 یک زاویه °۷۰ مشخصی بین رشته‌ها ایجاد می‌کند. (b) تصویری از چندین میکروگراف الکترونی Arp2/3 در محل شاخه اکتینی نشان داده شده است. (c) در اینتصویر رشته‌های اکتین در لبه پیشرو، و رشته‌های شاخه‌دار به صورت رنگ‌آمیزی شده و بزرگ‌نمایی نشان داده شده است.

می‌شود که یک زیرواحد جدا شود و زیرواحد جدید اضافه شود. با اضافه‌شدن زیرواحد جدید فضایی برای اضافه شدن یک زیرواحد جدید دیگر به رشته دیگر مهیا می‌گردد. با این روش، یعنی نوسان بین دو زیرواحد انتهایی، در حالی که انتهای (+) رشد می‌کند دایمر دُمین FH2 هم به صورت متصل باقی می‌ماند (شکل ۱۳a ـ۱۷ را ملاحظه کنید).

دُمین FH1 مجاور دُمین FH2 نیز همکاری مهمی در رشد رشته اکتین دارد (شکل ۱۴ـ۱۷). این دُمین غنی از اسیدهای آمینه پرولین است بطوری که چند مولکول پروفیلین به این مکان متصل می‌شوند. ما قبلاً بحث کردیم که چگونه پروفیلین می‌تواند نوکلئوتید ATP موجود در روی G- اکتین را تعویض کند و تولید پروفیلین-ATP- اکتین بکند. دُمین FH1 به عنوان یک جایگاه نشستن عمل می‌کند تا غلظت موضعی کمپلکس‌های پروفیلین-G-اکتین ـ ATP را افزایش دهد. به طریقی که هنوز کاملاً مشخص نشده است، این کمپلکس‌ها به دُمین FH2 کمک می‌کنند تا اکتین به انتهای (+) رشته اضافه شود، بنابراین باعث می‌شوند که بین دایمر دُمین FH2 موجود بر روی رشته در حال رشد تشکیل اکتین سریع‌تر رخ دهد. از آنجایی که فرمین باعث اضافه‌شدن زیرواحدهای اکتین به انتهای (+) می‌گردد، رشته‌های طویل اکتین تولید می‌شود بطوریکه در انتهای (+) آنها فرمین وجود دارد (شکل ۱۷ـ۳b را ملاحظه کنید). به این طریق فرمین‌ها باعث هسته‌ای شدن تشکیل اکتین می‌شود و با وجودی که به صورت متصل به انتهای (+) رشته باقی می‌مانند ولی باعث تشکیل سریع اکتین در آنجا می‌شود. به منظور تضمین رشد مداوم رشته اکتین، فرمین‌ها به انتهای (+) طوری متصل می‌شوند که از اتصال پروتئین‌های کلاهکی انتهای (+) مثل CapZ ممانعت شود. پروتئین‌های کلاهکی به‌طور طبیعی باعث اتمام تشکیل اکتین می‌شوند.

فعالیت فرمین بایستی تنظیم گردد. حداقل تعدادی از فرمین‌ها به دلیل میانکنش بین نیمه اول پروتئین و C ـ ترمینال به صورت ساختمان فضایی غیر فعال خودشان در سلول یافت می‌شوند. این

فرمین‌ها توسط Rho-GTP متصل به غشاء، GTPase کوچک منسوب به Ras، فعال می‌گردند (شکل ۱۴ـ۱۷). بنابراین زمانی که Rho از شکل غیر فعال Rho-GDP به شکل فعال خود Rho-GTP تبدیل شد، می‌تواند به فرمین متصل گردد و آن را فعال کند.

مطالعات اخیر نشان داده است که فرمین‌ها برای تشکیل رشته‌های طویل اکتین مثل رشته‌های اکتین موجود در فیبرهای استرسی و حلقه انقباضی در زمان سیتوکینز، ضروری است (شکل ۴ـ۱۷ را ملاحظه کنید). نقش هسته‌ای‌کننده پروتئین فرمین اخیراً کشف شده است، بنابراین نقش‌های این خانواده پروتئینی متنوع امروزه در حال کشف شدن می‌باشد. از آنجایی که گروه‌های متفاوت فرمین در جانوران وجود دارد، به نظر می‌رسد که فرمین‌ها در تشکیل دیگر ساختارهای مبتنی بر اکتین نقش داشته باشند.

کمپلکس Arp2/3 باعث هسته‌ای شدن رشته شاخه‌دار می‌گردد

کمپلکس Arp2/3 یک ماشین پروتئینی می‌باشد که از هفت زیرواحد تشکیل شده است. دو تا از آنها پروتئین‌های منسوب به اکتین[1] (Arp) هستند و اسم خود را از آن اخذ کرده‌اند. آن در تمام یوکاریوت‌ها از جمله گیاهان، مخمرها و سلول‌های جانوری یافت می‌شود. کمپلکس Arp2/3 وقتی که در آزمایش تشکیل اکتین اضافه می‌شود، به تنهایی یک هسته‌ای کننده خیلی ضعیفی می‌باشد. برای این‌که Arp2/3 فعال شود، لازم است به یک پروتئین تنظیمی، مثل WASp (پروتئین سندرم ویسکوت ـ آدریچ[2]) و یک رشته اکتین از قبل تشکیل شده، متصل گردد (شکل ۱۵ـ۱۷). بنابراین هر گاه شما Arp2/3 را در آزمایشی که دارای WASp و رشته‌های اکتین از قبل تشکیل شده می‌باشد، اضافه کنید، آن به عنوان هسته‌ای کننده عمل می‌کند. چگونه کمپلکس Arp2/3 باعث هسته‌ای شدن رشته اکتین می‌گردد؟ وقتی که این کمپلکس در حضور یک فعال‌کننده به کنار F- اکتین متصل شد، ساختمان فضایی خود را طوری تغییر می‌دهد که دو پروتئین مربوط به اکتین Arp3, Arp2، مانند انتهای (+) رشته اکتین عمل می‌کنند (شکل ۱۶aـ۱۷). سپس انتهای (+) تا زمانی که G-ATP- اکتین وجود داشته باشد یا تا زمانی که توسط یک پروتئین کلاهکی انتهای (+) مثل CapZ کلاهک‌دار شود، رشد می‌کند. زاویه بین رشته قدیمی و رشته جدید °۷۰ می‌باشد (شکل ۱۵bـ۱۷). هم‌چنین این زاویه به‌طور تجربی نیز در رشته‌های شاخه‌دار موجود در لبه پیشرو سلول‌های حرکتی که اعتقاد بر این است که توسط عملکرد کمپلکس Arp2/3 فعال شده، تشکیل می‌گردد نیز مشاهده شده است (شکل ۱۵cـ۱۷). همان‌طور که در بخش بعد خواهیم دید، کمپلکس Arp2/3 باعث پیش بردن پلیمریزاسیون اکتین می‌گردد و باعث حرکت داخل سلولی می‌گردد.

هسته‌ای شدن اکتین توسط کمپلکس Arp2/3 به دقت کنترل می‌شود و پروتئین WASp جزیی از این فرایند تنظیمی می‌باشد. WASp تا زمانی که دُمین فعال‌سازی Arp2/3 در انتهای کربوکسی پروتئین حاضر نباشد، به صورت ساختمان فضایی غیر فعال فولد می‌گردد (شکل ۱۶ـ۱۷). در یکی از مکانیسم‌های فعال‌سازی پروتئین، یک پروتئین کوچک متصل‌شونده به GTP منسوب به Ras (Cdc42)، دخالت می‌کند (شکل ۱۶ـ۱۷؛ بخش ۷ـ۱۷). این پروتئین در حالت GTP به WASp متصل گردیده و آن را باز می‌کند و باعث می‌شود دُمین فعالسازی اسیدی دردسترس Arp2/3 قرار گیرد. هم‌چنین WASp دارای یک مکان اتصالی به مونومر اکتین می‌باشد که مجاور دُمین فعال‌سازی C- ترمینال Arp2/3 می‌باشد و مراحل اولیه در تشکیل هسته یک رشته جدید اکتینی را تسهیل می‌کند.

پلیمریزاسیون اکتین می‌تواند باعث پیش بردن حرکات داخل سلولی گردد

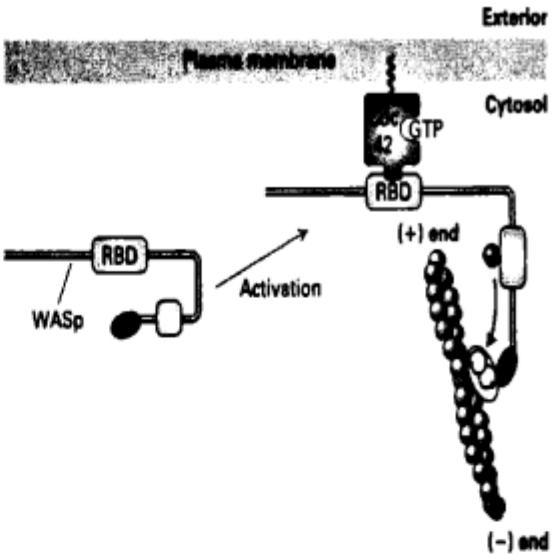
چگونه می‌توان از پلیمریزاسیون اکتین به منظور انجام کاری کمک گرفت؟ همان‌گونه که مشاهده کردیم، در پلیمریزاسیون اکتین هیدرولیز ATP- اکتین به اکتین-ADP صورت می‌گیرد که باعث می‌شود اکتین ترجیحاً در انتهای (+) رشد بکند و در انتهای (-) تجزیه گردد. هر گاه فرض شود که رشته اکتین در شبکه اسکلت سلولی ثابت باشد و چیزی بتواند به انتهای (+) در حال تشکیل بچسبد و سوار شود، توانایی حرکت در سلول را کسب کرده است. تنها به این طریق است که انگل باکتریایی داخل سلولی **لیستریا مونوسیتوژن** عمل می‌کند. در واقع در مطالعه حرکت **لیستریا** بود که عملکرد پروتئین Arp2/3 کشف گردید.

لیستریا یک پاتوژن غذایی است که باعث علایم معده‌ای ـ روده‌ای ملایمی در بیشتر بالغین شده و در افراد پیر یا افرادی که سیستم ایمنی سازش‌پذیری[3] دارند، می‌تواند کشنده باشد. این

1- Actin related protein (arp)

2- Wiskott-Aldrich syndrome protein

3- Immunocompromis



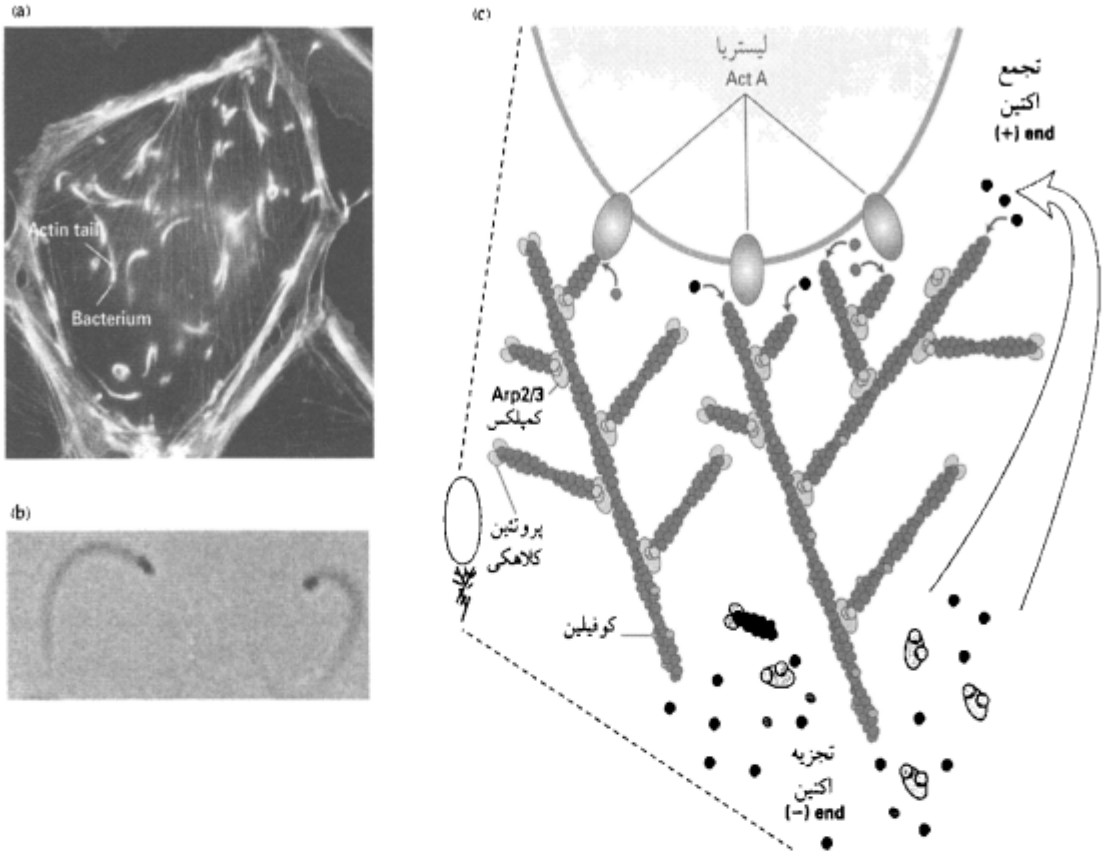
▲ **شکل ۱۶ـ۱۷ (شکل رنگی) تنظیم کمپلکس Arp2/3 به وسیله WASp.** WASp به دلیل میانکش داخل مولکولی غیر فعال است، بنابراین دُمین فعال‌سازی پوشانده شده است. طی اتصال G- پروتئین کوچک و فعال متصل‌شونده به غشا Cdc42-GTP (عضوی از خانواده Rho) از طریق دُمین اتصالی Rho (RBD)، میانکش داخل مولکولی از بین می‌رود و دُمین اسیدی (ارغوانی) ظاهر می‌گردد تا کمپلکس Arp2/3 را فعال کند. WASp هم‌چنین دارای یک ناحیه متصل‌شونده به G- اکتین (قهوه‌ای) است که به کمپلس Arp2/3 فعال شده در تشکیل هسته اکتین کمک می‌کند.

انگل وارد سلول‌های جانوری می‌شود و در سیتوپلاسم تقسیم‌می‌گردد. **لیستریا** برای این‌که بتواند از سلولی به سلول دیگر حرکت کند، اکتین را به صورت دم ستاره دنباله‌دار[1] شبیه دم یک موشک پرتابی پلیمریزه می‌کند تا به حاشیه سلول حرکت کند (شکل ۱۷ـ۱۷a,b) و زمانی که به غشای پلاسمایی رسید، راه خود را به سلول مجاور باز می‌کند و آن را نیز آلوده می‌کند. چگونه لیستریا از اکتین سلول میزبان به منظور حرکت به حاشیه سلول بهره‌مند می‌شود؟ **لیستریا** در سطح خود پروتئینی به نام ActA دارد که می‌تواند به پروتئین ArP2/3 متصل شده و آن را فعال سازد. پروتئین ActA همچنین می‌تواند به پروتئینی بنام VASP متصل شود. VASP سه ویژگی مهم دارد. VASP دارای یک ناحیه غنی از پرولین می‌باشد که به پروفیلین ـ ATP ـ اکتین متصل می‌گردد تا تجمع ATP- اکتین را در انتهای جدید خاردار[2] تولید شده توسط کمپلکس Arp2/3 افزایش دهد. ثانیاً آن به انتهای رشته تازه سنتز شده متصل می‌شود. ثالثاً آن انتهای (+) رشته در حال رشد را از کلاهک‌دار شدن توسط CapZ محافظت می‌کند. سپس رشته تشکیل شده به طرف باکتری هل داده می‌شود. از آنجایی که رشته در ماتریکس اسکلت سلولی سلول به‌طور محکم قرار دارد، ثابت می‌باشد و بنابراین سلول باکتریایی به سمت آن (سر اکتین در حال پلیمریزاسیون) حرکت می‌کند. محققان حرکت **لیستریا** را در حضور پروتئین‌های تخلیص شده در لوله آزمایش بازسازی کرده‌اند تا حداقل احتیاجات برای حرکت **لیستریا** را درک کنند. به طور قابل‌توجهی مشخص شد که باکتری زمانی که تنها چهار پروتئین اضافه شد، حرکت کرد: G-ATP- اکتین، کمپلکس Arp2/3، CapZ و کوفیلین (شکل ۱۷ـ۱۷b,c). ما نقش اکتین و Arp2/3 را بررسی کردیم، اما چرا CapZ و کوفیلین نیز ضروری است؟ همان‌طور که قبلاً دیدیم، CapZ سریعاً انتهای (+) آزاد رشته‌های اکتین را کلاهک‌دار می‌کند، بنابراین زمانی که رشته در حال رشد در حرکت باکتری شرکت نمی‌کند، سریعاً کلاهک‌دار می‌شود و از طویل شدن بیشتر ممانعت می‌شود. به این طریق، تشکیل رشته اکتین تنها در مجاورت باکتری، در جایی که ActA کمپلکس Arp2/3 را تحریک می‌کند، رخ می‌دهد. به این منظور کوفیلین ضروری است تا تجزیه انتهای (-) رشته اکتین تسریع شود و مجدداً اکتین تولید کند تا چرخه پلیمریزاسیون را حفظ کند (شکل ۱۱ـ۱۷ را ملاحظه کنید). این حداقل سرعت تحرک باکتری در حضور پروتئین‌های دیگری مثل VASP و پروفیلین، همان‌طور که در بالا اشاره شده، افزایش می‌یابد.

به منظور حرکت به داخل سلول، باکتری **لیستریا** و سایر پاتوژن‌های فرصت‌طلب مثل گونه‌های **شیگلا** که عامل اسهال می‌باشد، از فرایند طبیعی و تنظیم شده سلولی که در حرکت سلولی نقش دارد، بهره‌مند می‌شوند. همان‌طور که بعداً با جزئیات بیشتری بحث خواهد شد (بخش ۷ـ۱۷)، سلول‌های متحرک یک صفحه باریک سیتوپلاسمی دارند که در جلو سلول برآمده است و لبه پیشرو نامیده می‌شود (شکل ۴ـ۱۷ و ۱۵c ـ۱۷ را ملاحظه کنید). این صفحه باریک سیتوپلاسمی که از شبکه متراکم رشته‌های اکتین تشکیل شده است به‌طور مداوم در جلو سلول طویل می‌شوند و غشاء پلاسمایی را به جلو هل می‌دهند. فاکتورهای موجود در لبه پیشرو کمپلکس Arp2/3 را فعال می‌کنند تا این رشته‌ها را در آنجا انباشته کنند. بنابراین قدرت تجمع اکتین غشا را به جلو هل می‌دهد تا حرکت سلولی رخ بدهد.

قدرت تجمع اکتین همچنین در اندوسیتوز نیز نقش دارد.

1- Comet tail like 2- Barbed end



▲ **شکل تجربی ۱۷-۱۷ (شکل رنگی) لیستریا از قدرت پلیمریزاسیون اکتین به منظور حرکت داخل سلولی استفاده می‌کند.** (a) نمای میکروسکوپ فلورسانس از سلول رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی ضد پروتئین سطحی باکتری (قرمز) و فالوئیدین فلورسنت که نشان‌دهنده جایگاه F-اکتین باکتری می‌باشد. وقتی که باکتری به سمت غشا پلاسمایی حرکت می‌کند، غشا را به خارج هل داده و ساختار فیلوپودیومی تشکیل می‌دهد که به سمت سلول مجاور برآمده می‌گردد. (b) حرکت لیستریا را می‌توان در *In Vitro* به وسیله باکتری و چهار پروتئین شامل G-ATP-اکتین، کمپلکس Arp2/3، CapZ, و کوفیلین بازسازی کرد. در میکروگراف فاز باکتری (سیاه) را که در پشت آن دم اکتینی متراکم قرار دارد نشان داده شده است. (c) مدلی که نشان می‌دهد لیستریا چگونه به کمک چهار پروتئین حرکت می‌کند. پروتئین ActA موجود در سطح سلول، کمپلکس Arp2/3 را فعال می‌کند تا از رشته‌های موجود، رشته اکتین جدید تشکیل دهد. رشته‌های اکتین تا زمان کلاهک‌دار شدن با CapZ در انتهای (+) خود، رشد می‌کنند. اکتین به واسطه عمل کوفیلین که دپلیمریزاسیون انتهای (−) رشته‌ها را افزایش می‌دهد، بازیافت می‌شود. به این طریق پلمیریزاسیون در سمت عقب باکتری رخ می‌دهد و آن را به جلو هل می‌دهد.

همان‌طور که در فصل ۱۴ بحث شد، در **اندوسیتوز** بخشی از غشای پلاسمایی برداشته می‌شود تا وزیکول اندوسیتوزی تشکیل گردد و به داخل سلول انتقال داده شود. مطالعات اخیر نشان داده است بعد از این‌که وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین از غشا کنده شدند، آنها به داخل سیتوپلاسم حرکت می‌کنند. این حرکت سلولی توسط انفجار بسیار کوتاه‌مدت و سریع (چند ثانیه) پلیمریزاسیون اکتین مشابه آنچه که در حرکت **لیستریا** رخ می‌دهد، صورت می‌پذیرد.

سمومی که مخزن مونومرهای اکتین را آشفته می‌سازند، در مطالعه دینامیک اکتین مفید هستند

بعضی از قارچ‌ها و اسفنج‌ها سمومی تولید می‌کنند که چرخه پلیمریزاسیون اکتین را مورد هدف قرار می‌دهند و بنابراین برای سلول‌های جانوری سمی هستند. دو نوع سم مشخص شده است. دسته اول دو سم غیر مربوط به یکدیگر هستند، سیتوکالازین D و لاترونکولین[1] که باعث دپلیمریزاسیون رشته‌ها می‌گردد ولی عمل خود را با مکانیسم‌های متفاوتی انجام می‌دهند. سیتوکالازین D، آلکالوئید قارچی، با اتصال به انتهای (+) F-اکتین مانع از اضافه شدن زیرواحدهای دیگر می‌شود و به این طریق باعث دپلیمریزاسیون رشته اکتین می‌گردد. لاترونکولین، سمی که توسط اسفنج‌ها ترشح می‌شود،به G-اکتین متصل شده و آن را حبس می‌کند، در نتیجه از

1- Latrunculin

اتصال آن به انتهای رشته اکتین جلوگیری می‌کند. وجود هر کدام از سموم فوق باعث افزایش مخزن مونومری می‌گردد. زمانی که سیتوکالازین یا لاترونکولین به سلول‌های زنده اضافه می‌گردد، اسکلت سلولی اکتینی تجزیه می‌گردد و حرکات سلولی از قبیل جنبش سلولی و سیتوکینز مهار می‌گردد. این مشاهدات اولین موارد از دخالت رشته‌های اکتین در حرکت سلولی بود. لاترونکولین از این نظر بسیار مفید است که به مونومرهای اکتین متصل می‌شود و از تجمع رشته جدید اکتین ممانعت می‌کند. بنابراین وقتی که شما لاترونکولین را به سلول اضافه کنید، سرعت ناپدید شدن ساختارهای اکتین منعکس‌کننده سرعت نوسازی طبیعی آنها خواهد بود. این عمل نشان می‌دهد که بعضی از ساختارها دارای نیمه عمری کمتر از یک دقیقه هستند، در حالی که بعضی از آنها بسیار پایدار هستند. برای مثال، مشخص شده است که لبه پیشرو سلول‌های متحرک هر ۱۸۰ـ۳۰ ثانیه نوسازی می‌گردد در حالی که فیبرهای استرسی هر ۱۰ـ۵ دقیقه نوسازی می‌شود.

علی‌رغم این، مشخص شده است که تعادل مونومر ـ پلیمر توسط جاسپلاکینولید[1]، سم اسفنجی، و توسط فالوئیدین که از آمانیتا فالوئید (قارچ فرشته مرگ) استخراج می‌شود، به سمت رشته‌های اکتین تغییر می‌کند. جاسپلاکینولید با اتصال به دیمرهای اکتین و پایدار کردن آنها باعث افزایش هسته‌ای شدن اکتین می‌گردد و بنابراین باعث کاهش غلظت بحرانی می‌گردد. فالوئیدین با اتصال به فضای بین زیرواحدهای F-اکتین، باعث قفل شدن زیرواحدهای مجاور به یکدیگر می‌شود و از دپلیمریزاسیون رشته‌های اکتین جلوگیری می‌کند، به این طریق باعث مسموم شدن سلول می‌گردد، حتی اگر اکتین به میزان کمتر از غلظت بحرانی رقیق گردد. رشته‌های پایدار شده توسط فالوئیدین دپلیمریزه نخواهند شد. در رنگ‌آمیزی رشته‌های اکتین برای مشاهده توسط میکروسکوپ نوری، از فالوئیدین نشاندار با فلورسنت که تنها به F-اکتین متصل می‌شود، استفاده می‌گردد.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۷

مکانیسم تشکیل رشته اکتین

- تشکیل رشته اکتین توسط دو گروه پروتئین هسته‌ای می‌شود: فرمین‌ها تشکیل رشته‌های غیرشاخه‌دار (شکل ۳-۱۷ را ملاحظه کنید) و کمپلکس Arp2/3 تشکیل شبکه شاخه‌دار اکتین را هسته‌ای می‌کنند (شکل ۱۵-۱۷ را ملاحظه کنید). فعالیت فرمین‌ها و Arp2/3 توسط مسیرهای انتقال پیام تنظیم می‌گردد.
- ساختارهای متنوع مبتنی به اکتین توسط فرمین‌ها و Arp2/3 تشکیل می‌گردد. فرمین‌ها باعث تشکیل فیبرهای استرسی و حلقه انقباضی می‌گردند در حالیکه Arp2/3 باعث تشکیل رشته‌های شاخه‌دار اکتین موجود در لبه پیشرو و سلولهای متحرک می‌شود.
- قدرت پلیمریزاسیون اکتین در انجام کارهایی مثل حرکت داخل سلولی وابسته به Arp2/3 باکتری‌های پاتوژن (شکل ۱۷-۱۷ را ملاحظه کنید) و حرکت وزیکول‌های اندوسیتوزی به داخل سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- سموم زیادی باعث تغییر دینامیک پلیمریزاسیون اکتین می‌گردند. بعضی از سموم مثل لاترونکولین به مونومرهای اکتین متصل می‌شوند و آنها را بدام می‌اندازد. از فالوئیدین نشاندار با فلورسنت در رنگ‌آمیزی رشته‌های اکتین استفاده می‌شود.

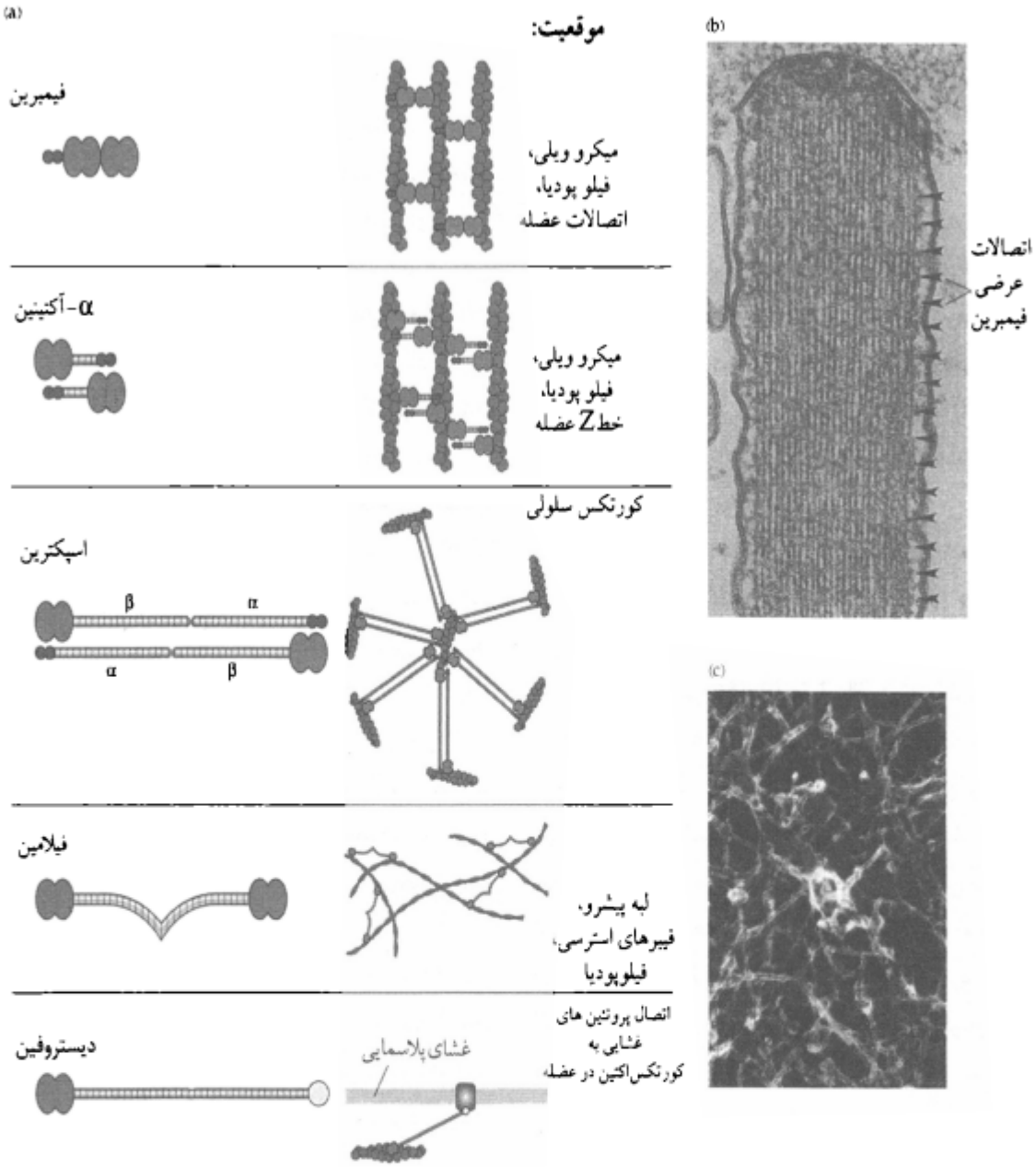
۴ـ۱۷ سازمان‌دهی ساختارهای سلولی که اساس آنها اکتین می‌باشد

در این فصل مشاهده کردیم که رشته‌های اکتین می‌توانند به صورت انواع وسیع و متنوعی از ساختارها آرایش یابند و این‌که چگونه بسیاری از پروتئین‌ها باعث تشکیل و هسته‌ای شدن اکتین می‌شوند و نوسازی آن را تنظیم می‌کنند. در سلول‌های مهره‌داران، پروتئین‌های زیادی باعث سازمان‌دهی رشته‌های اکتین به انواع متنوعی از ساختارهای عملکردی می‌شوند. در اینجا ما فقط تعداد کمی از این پروتئین‌ها را بعنوان نمونه‌ای از انواع پروتئین‌های برقرارکننده ارتباط عرضی بین اکتین در سلول و پروتئین‌هایی که باعث ارتباط عملکردی میان اکتین و پروتئین‌های غشایی می‌شوند را مورد بحث قرار می‌دهیم. یک سوال جالب که هنوز درباره آن کمتر شناخته شده است، این است که چگونه سلول‌ها ساختارهای متفاوت مبتنی بر اکتین در یک سیتوپلاسم تشکیل می‌دهند. بعضی از این سازمان‌دهی‌ها به دلیل تنظیم موضعی تشکیل می‌گردد که در آخر این فصل مورد بحث قرار می‌گیرد.

پروتئین‌های برقرارکننده ارتباط عرضی باعث تشکیل دستجات یا شبکه‌های اکتین از رشته‌های اکتین می‌گردند

زمانی که رشته‌های اکتین در لوله آزمایش تجمع می‌یابند، شبکه درهم و پیچیده‌ای تشکیل می‌گردد. با وجود این، در سلول‌ها

1- Jasplakinolide



▲ **شکل ۱۸-۱۷ (شکل رنگی) پروتئین‌های برقرارکننده اتصال عرضی اکتین باعث شکل‌گیری ساختارهای متنوع از رشته‌های F- اکتین می‌شوند.** (a) مثالی از چهار پروتئین متصل‌شونده به F-اکتین، که تمامی آنها دارای دو دُمین (آبی‌رنگ) هستند که به F-اکتین متصل می‌شود. بعضی از این پروتئین‌ها دارای مکان اتصال به Ca^{2+} (ارغوانی‌رنگ) می‌باشند که فعالیت آنها را در سطوح بالای Ca^{2+} آزاد مهار می‌کند. پروتئین دیستروفین نیز نشان داده شده است، این پروتئین دارای یک مکان اتصال به اکتین در انتهای N- ترمینال و یک دُمین در C- ترمینال که به پروتئین غشایی دیستروگلیکان متصل می‌شود. (b) میکروگراف الکترونی عبوری از برش نازک استروسیلیوم (میکروویلی بزرگ) سلول حساس مویی در گوش داخلی. این ساختار دارای یک دسته رشته اکتین می‌باشد که به وسیله فیمبرین ارتباط عرضی دارند. (c) پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات عرضی مانند فیلامین‌ها دارای انعطاف‌پذیری زیادی هستند و بنابراین می‌توانند رشته‌های اکتین را در شبکه حفظ کنند.

رشته‌های اکتین به صورت ساختارهای متنوعی مانند دستجات‌رشته‌ای بسیار منظم در میکروویلی‌ها یا شبکه ویژه در لبه پیشرو یافت می‌شوند (شکل ۱۷-۴a را ملاحظه کنید). این نوع سازمان‌دهی‌های متفاوت توسط **پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات**

عرضی[1] به وجود می‌آیند. برای این‌که یک پروتئین برقرارکننده اتصالات عرضی بتواند اکتین را سازمان‌دهی کند، باید دارای دو مکان برای اتصال F- اکتین باشد (شکل ۱۸ـ۱۷).

اتصال عرضی بین رشته‌های F- اکتین توسط یک پلی‌پپتید واحد، مثل **فیمبرین**[2] که در میکروویلی‌ها یافت می‌گردد، میسر می‌گردد. این پروتئین باعث تشکیل دستجات رشته‌های اکتین می‌گردد که تمامی آنها دارای قطبیت یکسان هستند و دارای دو مکان اتصال به اکتین می‌باشد. سایر پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات عرضی دارای یک مکان اتصال به اکتین هستند و تشکیل دایمر می‌دهند تا دو مکان اتصال به اکتین در مجاورت یکدیگر قرار گیرند. این پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات عرضی به صورت میله سختی دو مکان اتصالی را به یکدیگر وصل می‌کند، برای مثال **αـ آکتینین**، دو رشته موازی اکتین را در جایگاهی دورتر از فیمبرین به یکدیگر متصل می‌کند. پروتئین دیگری به نام **اسپکترین** یک پروتئین تترامری است که دارای دو جایگاه اتصال به اکتین می‌باشد. اسپکترین در فاصله‌ای دورتر بین رشته‌های اکتین قرار می‌گیرد و باعث تشکیل شبکه‌ای زیر غشای پلاسمایی می‌گردد (شکل ۱۹ـ۱۷ را ملاحظه کنید). انواع دیگری از پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات عرضی، مانند **فلامین** دارای یک ناحیه شدیداً انعطاف‌پذیر بین دو جایگاه اتصالی می‌باشد، مثل یک فنرتیغه‌ای[3] مولکولی عمل می‌کند، بنابراین باعث تثبیت و پایداری ارتباطات عرضی رشته‌های یک شبکه مثل لبه پیشرو سلول‌های متحرک می‌گردد (شکل ۱۸ـ۱۷). کمپلکس Arp2/3 که توانایی تشکیل رشته اکتین را دارند، نیز یک پروتئین مهم برقرارکننده اتصالات عرضی می‌باشد که باعث اتصال انتهای (-) یک رشته به بخش جانبی رشته دیگر می‌گردد (شکل ۱۵ـ۱۷ را ملاحظه کنید).

پروتئین‌های سازش‌دهنده[4] رشته‌های اکتین را به غشا متصل می‌کنند

به منظور حفظ ساختار سلولی و هم‌چنین کنترل قدرت پلیمریزاسیون اکتین، رشته‌های اکتین به غشاها یا به ساختارهای داخل سلولی متصل می‌شوند. رشته‌های اکتین به‌طور ویژه در کورتکس غشای پلاسمایی به وفور یافت می‌شود و باعث پشتیبانی آن می‌شود. رشته‌های اکتین می‌توانند با غشاها خواه به صورت جانبی،خواه از انتهای خودشان متصل شوند.

اولین مثال از اتصال رشته‌های اکتین به غشاها، اریتروسیت‌های انسانی ـ سلول‌های قرمز خونی می‌باشد. اریتروسیت اساساً از یک غشای پلاسمایی تشکیل شده است که غلظت بالایی از پروتئین هموگلوبین را احاطه کرده است تا اکسیژن را از شُش به بافت‌ها انتقال دهد و دی‌اکسید کربن را از بافت‌ها به شُش‌ها برگرداند. تمامی این اعمال توسط عضله قوی به نام قلب انجام می‌گردد. اریتروسیت‌ها باید قادر باشند در مقابل جریان شدید خون در قلب حفظ شوند و سپس به سمت سرخرگ‌ها جریان یابند و در نهایت قبل از این‌که در شُش‌ها گردش کنند در حین خروج از مویرگ‌های باریک زنده بمانند.

برای این‌که اریتروسیت‌ها از این فرایند فرسایشی که هزاران بار اتفاق می‌افتد در امان بمانند، آنها در زیر غشا پلاسمایی خود دارای یک شبکه میکروفیلامنتی می‌باشند که به آنها هم قدرت کشسانی و هم انعطاف‌پذیری که لازمه سفرشان می‌باشد، می‌دهد. این شبکه دارای رشته‌های کوتاه اکتین تقریباً به طول ۱۴ زیرواحد می‌باشند که در حاشیه خود توسط تروپومیوزین (با جزئیات بیشتر در بخش ۶ـ۱۷ بحث شده است) و در انتهای (-) خود توسط پروتئین کلاهکی تروپومودولین پایدار شده است. این رشته‌های کوتاه به عنوان قطب‌های اتصالی حدود شش مولکول انعطاف‌پذیر اسپکترین عمل می‌کنند و یک نوع ساختار شبیه به تور ماهی‌گیری ایجاد می‌کنند (شکل ۱۹a ـ۱۷). این شبکه هم قدرت و هم انعطاف‌پذیری به اریتروسیت می‌بخشد. اسپکترین از طریق دو مکانیسم به پروتئین‌های غشایی متصل می‌گردد ـ از طریق پروتئینی به نام **انکرین**[5] به انتقال‌دهنده بیکربنات (پروتئین سراسری و معروف به **باند ۳**) و از طریق یک پروتئین متصل‌شونده به اسپکترین و F- اکتین به نام **باند ۴/۱** به پروتئین غشایی دیگر به نام گلیکوفورین C متصل می‌شود (شکل ۱۹b ـ۱۷). اگرچه این نوع اتصالات شدیداً در اریتروسیت‌ها وجود دارد، ولی اتصالات مشابهی در بسیاری از انواع سلول‌ها نیز یافت می‌شود. به عنوان مثال می‌توان به یک نوع اتصال انکرین ـ اسپکترین اشاره کرد که Na^+/K^+ATPase را به اسکلت سلولی اکتینی غشای بازولاترال سلول‌های اپی‌تلیال متصل می‌کند.

وجود نقص ژنتیکی در پروتئین‌های اسکلت سلولی سلول قرمز خون باعث می‌شود سلول‌ها شکننده باشند و بیماری‌هایی به نام آنمی اسفروتیک ارثی ایجاد شود (**اسفروتیک**

1- Cross - linking proteins
2- Fimberin
3- Leaf spring
4- Adaptor
5- Ankyrin

به این دلیل که سلول‌ها گرد هستند و آنمی به این دلیل که کمبود سلول‌های قرمز خون وجود دارد) و بنابراین طول عمر آنها کمتر گردد. در بیماران، جهش‌هایی که در اسپکترین، باند ۴/۱ و انکرین رخ می‌دهد می‌تواند باعث این بیماری گردد.

علاوه بر بستر اسپکترینی موجود در کورتکس سلولی، میکروفیلامنت‌ها بستری برای ساختارهای سطح سلولی مثل میکروویلی‌ها و برآمدگی‌های سطحی نیز فراهم می‌کند. هر گاه ما یک میکروویلی را در نظر بگیریم، واضح است که آن باید یک تکیه‌گاه انتهایی در انتها و یک تکیه‌گاه جانبی در طول خود داشته باشد. آرایش رشته‌های اکتین در میکروویلی‌ها چگونه است؟ وجود قطعه S1 میوزین در رشته‌های میکروویلی نشان می‌دهد که در انتهای آن، انتهای (+) اکتین وجود دارد (شکل ۱۹c-۱۷). مضافاً این‌که، زمانی که اکتین فلورسنت به سلول اضافه می‌شود، اکتین‌ها در انتهای میکروویلی وارد می‌شوند که نشانگر این است نه تنها انتهای (+) اکتین در انتهای میکروویلی قرار دارد، بلکه در آنجا رشته اکتین نیز تجمع نیز می‌یابد. در حال حاضر مشخص نشده است که چگونه رشته‌های اکتین به صورت متصل در انتهای میکروویلی باقی مانده‌اند، اما یک احتمال این است که پروتئین فُرمین این عمل را انجام می‌دهد. این نوع آرایش انتهای (+) به‌طور عمومی نه تنها در میکروویلی‌ها یافت می‌شود، بلکه در لبه پیشرو سلول‌های متحرک نیز وجود دارد. عقیده بر این است که اتصالات جانبی با غشای‌پلاسمایی، حداقل بخشی از آن، به واسطه خانواده پروتئینی ERM (ازرین - رادیکسین - میوزین) صورت می‌گیرد. این پروتئین‌های تنظیمی به صورت فولدشده و غیر فعال یافت می‌شوند. زمانی که این پروتئین‌ها توسط لیپید PIP_2 (فسفاتیدیل کولین (5,4) P_2) متصل به غشا فعال شوند، فسفریله می‌گردند و جایگاه‌های متصل‌شونده به F-اکتین غشا در آنها ظاهر شده و باعث اتصالات جانبی آنها با رشته‌های اکتین می‌گردد (شکل ۱۹d-۱۷). در غشای پلاسمایی، پروتئین‌های ERM می‌توانند رشته‌های اکتین را به طور مستقیم یا غیر مستقیم به واسطه پروتئین‌های داربست[1] به دومین سیتوپلاسمیک پروتئین‌های غشایی متصل کنند.

دو نوع اتصالات غشایی اکتین که بحث کردیم، در نواحی از غشای پلاسمایی که به سایر سلول‌ها یا ماتریکس خارج سلولی متصل شده است، درگیر نیستند. علی‌رغم این، نواحی بسیار تخصص یافته غشای پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیال به نام اتصالات چسبنده وجود دارد که باعث تماس بین سلول‌ها می‌گردد (شکل ۱b-۱۷). نواحی تخصص یافته دیگری به نام اتصالات موضعی نیز وجود دارند که باعث اتصال سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی می‌گردد. این نوع اتصالات تخصص یافته به نوبه خود به اسکلت سلولی متصل می‌شوند و با جزئیات بیشتر در مبحث مهاجرت سلولی (بخش ۷-۱۷) و بافت‌ها (فصل ۱۹) شرح داده خواهد شد.

دیستروفی‌های عضلانی بیماری‌های ژنتیکی هستند که اغلب با تضعیف پیشرونده عضلات اسکلتی همراه است. در یکی از این بیماری‌های ژنتیکی، دیستروفی عضلانی دوشن، پروتئین دیستروفین تغییر می‌کند، چون ژن این پروتئین بر روی کروموزوم -X قرار گرفته است، بنابراین در افراد مذکر غالب است. **دیستروفین** یک پروتئین چندبخشی[2] می‌باشد و نقش آن اتصال شبکه اکتین کورتیکال سلول‌های عضلانی به کمپلکس پروتئین‌های غشایی متصل به ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. بنابراین دیستروفین دارای یک دُمین N- ترمینال متصل به اکتین، تکرارهای شبه اسپکترینی و در نهایت دُمینی که کمپلکس دیستروگلیکان غشایی را به پروتئین لامینین ماتریکس خارج سلولی متصل می‌کند، می‌باشد (شکل ۱۸a-۱۷ را ملاحظه کنید). در غیاب دیستروفین، غشای پلاسمایی سلول‌های عضلانی با ادامه انقباض عضلانی تضعیف می‌شود و در نهایت می‌شکند و منجر به مرگ میوفیبریل عضلانی می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۷

سازمان‌دهی ساختارهای سلولی مبتنی بر به اکتین

- رشته‌های اکتین توسط پروتئین‌های برقرار کننده ارتباط عرضی سازمان‌دهی می‌شوند. این پروتئین‌ها دارای دو مکان اتصالی به F- اکتین می‌باشد. پروتئین‌های برقرار کننده ارتباط عرضی بر حسب نوع ساختاری که سازمان‌دهی می‌کنند طویل یا کوتاه، سفت یا انعطاف‌پذیر هستند (شکل ۱۸-۱۷ را ملاحظه کنید).
- رشته‌های اکتین توسط پروتئین‌های ویژه‌ای بطور جانبی به غشاء پلاسمایی متصل می‌شوند. این نوع ساختارها را می‌توان در سلول‌های قرمز خونی و یا در ساختارهای سطح سلول مثل میکروویلی‌ها مشاهده کرد (شکل ۱۹-۱۷ را ملاحظه کنید)
- انتهای (+) رشته‌های اکتین همچنین توانایی اتصال به غشاهای پلاسمایی دارند. این نوع آرایش بین انتهای رشته و غشاء پلاسمایی تنظیم می‌گردد.

1- Scaffolding proteins 2- Modular

■ بیماری‌های زیادی وجود دارند که ناشی از نقص در اسکلت سلولی وابسته به اکتین حاشیه غشاهای پلاسمایی می‌باشند.

۵ـ۱۷ میوزین‌ها: پروتئین‌های حرکتی مبتنی بر اکتین

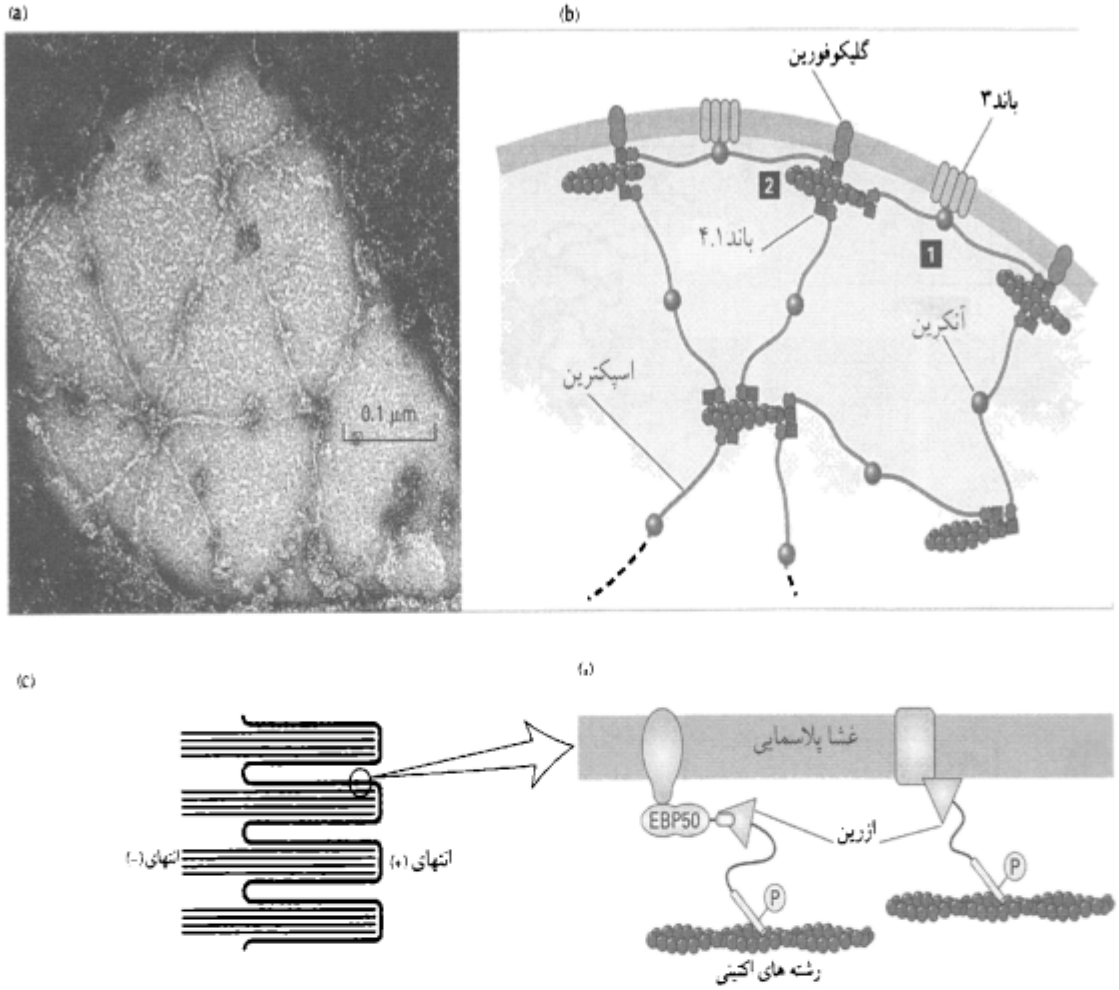
ما بحث کردیم چگونه پلیمریزاسیون اکتین توسط کمپلکس Arp2/3، توانایی انجام کار را دارد. علاوه بر این‌که سلول‌ها توسط پلیمریزاسیون اکتین متحرک می‌شوند آنها دارای خانواده بزرگی از پروتئین‌های حرکتی هستند که **میوزین** نامیده می‌شود و با هیدرولیز ATP در طول رشته‌های اکتین حرکت می‌کنند. اولین میوزین کشف شده، میوزین II بود که از عضله اسکلتی استخراج گردید. مدت‌ها زیست‌شناسان فکر می‌کردند که این میوزین تنها میوزین موجود در طبیعت است. با وجود این، آنها سپس انواع دیگری از میوزین‌ها را کشف کردند و به این فکر افتادند که چند گروه عملکردی متفاوت از میوزین‌ها ممکن است وجود داشته باشد. امروزه ما می‌دانیم که علاوه بر میوزین II عضله اسکلتی چندین گروه متفاوت میوزین وجود دارد که دارای نقش‌های حرکتی هستند. گروه‌های دیگر میوزین دارای انواع نقش‌های متفاوت از جمله حرکت اندامک‌ها و ساختارهای دیگر اطراف سلول به علاوه مشارکت در مهاجرت سلولی می‌باشند. در واقع با کشف و آنالیز تمام این موتورهای مبتنی بر اکتین و موتورهای مربوطه مبتنی بر میکروتوبول که در فصل بعد آورده شده است، دیدگاهی که قبلاً سلول را نسبتاً ثابت تصور می‌کرد تغییر کرد و امروزه سلول فوق‌العاده پویا در نظر می‌گیرند ـ شبیه به یک آزادراه سازمان یافته اما بسیار شلوغ که در آن موتورهای حرکتی به آسانی ترکیبات را حمل می‌کند.

برای این‌که میوزین‌ها را بشناسیم ابتدا سازمان‌دهی عمومی دُمین آنها بررسی می‌شود. سپس تنوع میوزین‌ها را در موجودات مختلف بررسی می‌کنیم و بعضی از آنها را که در یوکاریوت‌ها هستند، با جزئیات بیشتری مورد بحث و بررسی قرار می‌دهیم. میوزین‌ها توانایی بسیار بالایی در تبدیل انرژی آزاد شده از ATP به کار مکانیکی دارند. همه میوزین‌ها توانایی تبدیل هیدرولیز ATP به کار را دارند اما میوزین‌ها متفاوت دارای انواع عملکردهای مختلف هستند. به عنوان مثال، بسیاری از مولکول‌های میوزین II بر روی رشته‌های اکتین به سمت یکدیگر کشیده می‌شود تا باعث انقباض عضلانی گردند، در حالی که میوزین V با اتصال به محموله وزیکولی آن را در طول اکتین حمل می‌کند. به منظور درک این‌که چگونه چنین نقش‌های متنوع توسط یک نوع مکانیسم حرکتی انجام می‌گردد، ما مکانیسم پایه چگونگی تبدیل انرژی آزاد شده از هیدرولیز ATP به کار را بررسی خواهیم کرد و خواهیم دید که چگونه این مکانیسم متحمل تغییراتی می‌گردد تا گروه‌های ویژه میوزینی را برای نقش‌های ویژه آماده کند.

میوزین‌ها دارای دُمین‌های سر، گردن و دم می‌باشند که هر کدام دارای وظایف متفاوتی می‌باشند

بسیاری از اطلاعات ما درباره میوزین‌ها از مطالعه بر روی میوزین II عضله اسکلتی به وجود آمده است. در عضله اسکلتی، میوزین II در رشته‌های ضخیم دوقطبی که دارای صدها پروتئین میوزین II می‌باشند، آرایش یافته‌اند (شکل ۲۰a ـ۱۷) و در هر نیمه از رشته دوقطبی، آنها (میوزین‌ها) دارای آرایش‌های مخالف هم هستند. این رشته‌های میوزین با رشته‌های نازک اکتین تداخل می‌کنند تا باعث انقباض عضلانی شوند. در اینجا خصوصیات میوزین را بحث می‌کنیم، ولی چگونگی عملکرد این سیستم را به بخش بعد واگذار می‌کنیم.

می‌توان رشته ضخیم میوزین را در محلولی از ATP و نمک بالا حل کرد. پروتئین میوزین II حل شده از شش پلی‌پپتید ـ دو تا زنجیر سنگین متصل به هم و چهار تا زنجیر سبک ـ تشکیل شده است. دو زنجیر سبک به ناحیه «گردن» هر زنجیر سنگین متصل شده است (شکل ۲۰b ـ۱۷). میوزین محلول دارای فعالیت ATPase می‌باشد که نشان‌دهنده توانایی آن در استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای حرکت می‌باشد. اما کدام دُمین میوزین مسئول این فعالیت است؟ برای تعیین دُمین‌های وظیفه‌دار در یک پروتئین، یک روش استاندارد این است که آن را توسط پروتئازهای ویژه‌ای به قطعاتی تجزیه کنیم و فعالیت هر قطعه را بررسی کنیم. میوزین II محلول را می‌توان با تیمار ملایم توسط پروتئاز کیموتریپسین به دو قطعه تجزیه کرد، یکی از این قطعات مرو-میوزین سنگین (mero،HMM به معنی «بخشی از» می‌باشد) و دیگری مرومیوزین سبک (LMM) نامیده می‌شود (شکل ۲۰b ـ۱۷). مرومیوزین سنگین را می‌توان توسط پروتئاز پاپائین به دو زیر قطعه (S1)1 و زیرقطعه (S2)2 تجزیه کرد. با آنالیز ویژگی‌های قطعات مختلف S1 ,S2 و LMM ـ مشخص شده است که فعالیت ذاتی ATPase در قطعه S1 قرار دارد و مکان اتصال به F-اکتین نیز در این قطعه قرار دارد. مضافاً، مشخص شده است که فعالیت ATPase قطعه S1 در حضور اکتین رشته‌ای به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد، بنابراین به این نوع فعال شدن، **فعالیت ATPse فعال شده**

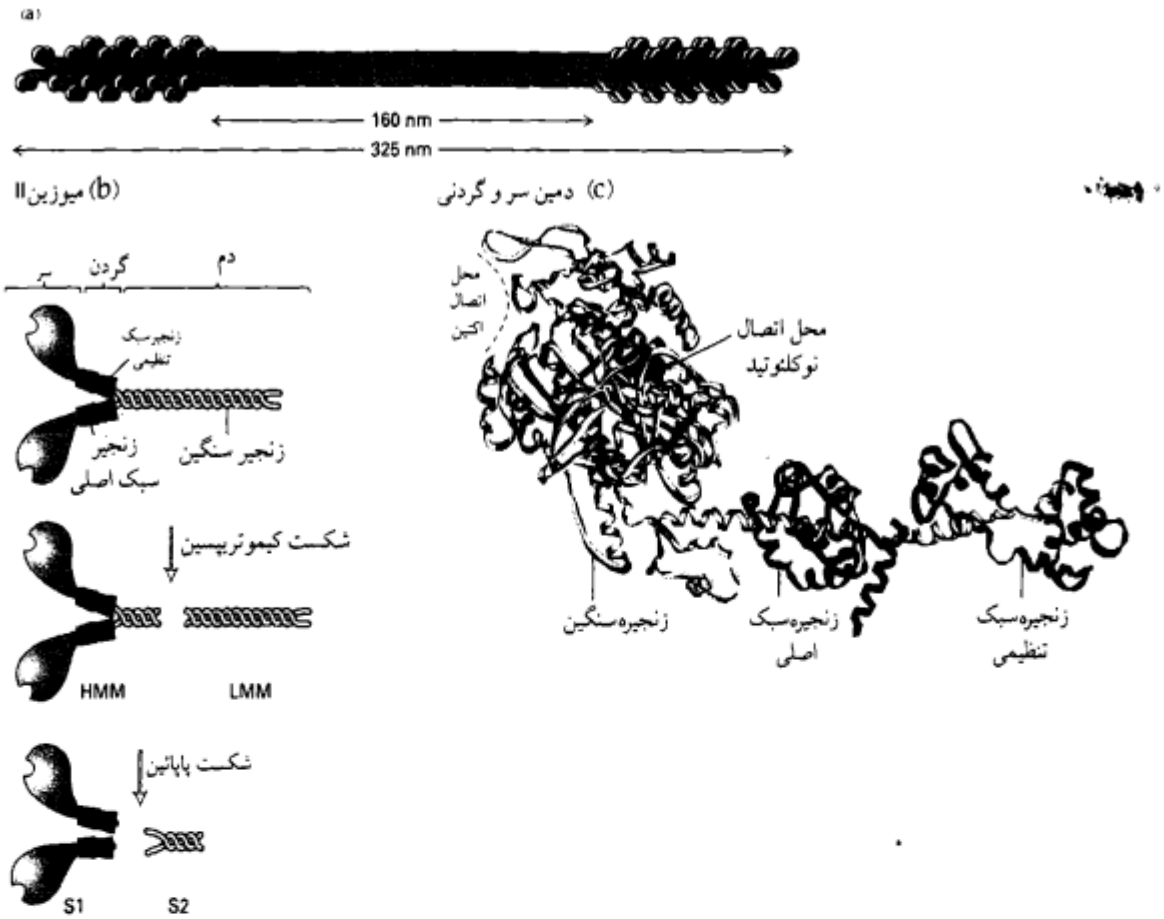


▲ **شکل ۱۹-۱۷ اتصال جانبی میکروفیلامنت‌ها به غشاها.** (a) میکروگراف الکترونی غشای اریتروسیت نشان می‌دهد که سازمان‌یابی چرخ-پره‌مانند[1] اسکلت سلولی کورتیکال، باعث حفظ غشای پلاسمایی اریتروسیت‌های انسانی می‌شود. میله‌های طویل اساساً از اسپکترین تشکیل شده‌اند و مشاهده می‌شود که از محور یا مکان‌های اتصالی به غشاء به خارج کشیده شده‌اند. لکه‌های تاریک موجود در روی میله‌ها مولکول‌های آنکرین می‌باشند که اسپکترین را به پروتئین‌های سراسری غشاء متصل می‌کند. (b) در نمودار اسکلت سلولی اریتروسیت دو نوع اتصال مهم مشخص است: ❶ انکرین و ❷ باند ۴/۱. (c) میکروویلی‌های موجود در بخش راسی سلول اپی‌تلیال قطبیت رشته‌های اکتین را نشان می‌دهد. (d) ازرین، یکی از پروتئین‌های خانواده ازرین - رادیکسین - میوزین (ERM) می‌باشد که رشته‌های اکتین را به صورت جانبی مستقیماً یا بطور غیرمستقیم به غشای پلاسمایی ساختارهای سطحی مثل میکروویلی متصل می‌کند. ازرین که با فسفریلاسیون (P) فعال می‌گردد، به‌طور مستقیم به ناحیه سیتوپلاسمی پروتئین‌های غشایی (راست) یا به طور غیر مستقیم از طریق یک پروتئین داربستی مثل EBP50 (سمت چپ) به آنها متصل می‌گردد.

توسط اکتین[2] گفته می‌شود که مشخصه همه میوزین‌ها می‌باشد. قطعه S1 میوزین II از دُمین‌های **سر و گردن** تشکیل شده است، در حالی که نواحی S2 و LMM دُمین **دم** را تشکیل می‌دهند (شکل ۲۰-۱۷b). با آنالیز کریستالوگرافی اشعه X دُمین‌های سر و گردن، شکل، موقعیت زنجیرهای سبک و موقعیت مکان‌های اتصالی به ATP و اکتین آنها تعیین گردد. سر طویل میوزین در یک انتها به گردن α - هلیکسی متصل شده است (شکل ۲۰-۱۷). دو مولکول زنجیره سبک که در پایه دُمین سر قرار دارد، گردن را مثل گیره C[3] می‌پوشاند. در این موقعیت زنجیره‌های سبک ناحیه گردن را سفت می‌کنند.

چه میزان میوزین II برای فعالیت «حرکتی» ضروری و کافی می‌باشد؟ برای پاسخ دادن به این سؤال به یک آزمایش ساده

1- Spoke-and-hub
2- Actin - actijated ATPase actibity
3- C - champs

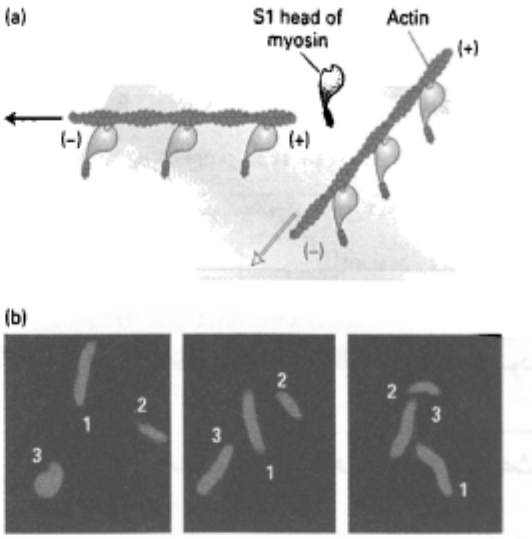


▲ **شکل ۲۰ـ۱۷(شکل رنگی) ساختار میوزین II.** (a) سازمان‌دهی میوزین II در رشته‌های تخلیص شده از عضله اسکلتی. میوزین II به صورت رشته‌های دوقطبی آرایش می‌یابد، به‌طوری که دم‌های آن دسته رشته را تشکیل می‌دهد و سرها در انتهای آن قرار گرفته‌اند. استخراج رشته‌های دوقطبی با غلظت نمکی بالا و ATP باعث می‌شود که رشته به مولکول‌های میوزین II تجزیه شود. (b) مولکول‌های میوزین II از دو زنجیر سنگین (آبی روشن) و چهار زنجیر سبک (سبز و آبی) تشکیل شده‌اند. دم زنجیره‌های سنگین فنر فنری شده و تشکیل دیمر می‌دهند؛ به ناحیه گردن زنجیره‌های سنگین دو زنجیره سبک متصل شده است. تجزیه پروتئولیتیکی محدود میوزین II تولید قطعات دمی-LMM و S2 ـ و دُمین حرکتی S1 می‌کند. (c) مدل سه بُعدی دُمین سر S1 نشان می‌دهد که S1 آن به صورت موجی‌شکل و طویل است و توسط یک شکافی به دو قسمت تفکیک می‌شود. پاکت اتصالی نوکلئوتیدی در یک بخش این شکاف قرار دارد و بخش دیگر آن نزدیک به انتهای سری محل اتصال اکتین می‌باشد. اطراف ناحیه گردن α ـ هلیکسی رشته میوزین توسط دو زنجیره سبک پوشانده شده است. این زنجیره‌ها باعث محکم‌تر شدن گردن می‌شوند به‌طوری که آن می‌تواند به صورت یک بازوی اهرم برای سر عمل می‌کند. در اینجا ساختمان فضایی دارای ATP نشان داده شده است.

In Vitro لازم است. در یک آزمایش، **آزمایش رشته-لغزنده**[1] مولکول‌های میوزین در یک لامل به‌طور محکم قرار داده می‌شود و سپس به آن رشته‌های اکتین نشاندار با فلورسانس اضافه می‌شود. به دلیل این‌که مولکول‌های میوزین به‌طور محکم به لامل چسبیده‌اندآنها نمی‌توانند بلغزند؛ بنابراین نیروی ایجاد شده توسط میانکنش سرهای میوزین با رشته‌های اکتین موجب حرکت رشته‌ها نسبت به میوزین می‌گردد (شکل ۲۱ـ۱۷a). وقتی که ATP موجود باشد، مشاهده می‌شود که رشته‌های اکتین اضافه شده در سطح لامل حرکت می‌کنند؛ ولی هر گاه ATP نباشد، هیچ حرکتی مشاهده نمی‌شود. به کمک این آزمایش می‌توان نشان داد که سر S1 میوزین II به منظور حرکت رشته‌های اکتین کافی می‌باشد. این حرکت توسط قطعات S1 میوزین (ثابت شده در لامل) که تلاش می‌کند به سمت انتهای (+) رشته اکتین «حرکت کند»، صورت می‌گیرد؛ بنابراین رشته‌های اکتین از انتهای (-) خود حرکت می‌کنند. سرعت حرکت رشته اکتین توسط میوزین را می‌توان از ثبت‌های ویدئویی آزمایشات رشته ـ لغزنده محاسبه کرد (شکل ۲۱ـ۱۷b).

همه میوزین‌ها دارای یک دُمین شبیه به دُمین S1 میوزین II هستند که مسئول فعالیت حرکتی می‌باشد. دُمین دم در حرکت نقش

1- Assay sliding-filament



▲ **شکل تجربی ۲۱ـ۱۷ از آزمایش رشته ـ لغزنده به منظور تشخیص حرکت ناشی از میوزین استفاده می‌شود.** (a) بعد از این‌که مولکول‌های میوزین به سطح یک لامل شیشه‌ای جذب شدند، میوزین‌های متصل نشده برداشته می‌شوند؛ سپس لامل‌ها بر روی یک لام شیشه‌ای به صورت سروته قرار گرفتند تا تشکیل یک اتاقک بدهند که از میان آن محلول‌ها بتوانند جریان یابند. محلول رشته‌های اکتین، که توسط رنگ‌آمیزی با فالوئیدین نشاندار شده یا رودامین مشاهده و پایدار شده است، به از داخل اتاقک جریان می‌یابد. (لامل نشان داده شده در نمودار به صورت معکوس می‌باشد تا موقعیت‌های مولکول‌ها به سادگی قابل مشاهده باشد). در حضور ATP، سرهای میوزین با مکانیسمی که در شکل ۲۴ـ۱۷ آورده شده است، به سمت انتهای (+) رشته‌ها گام برمی‌دارند. به دلیل این‌که دم‌های میوزین بی‌حرکت هستند، گام زدن سرها موجب لغزیدن رشته‌ها می‌گردد. حرکت رشته‌های واحد در میکروسکوپ نوری فلورسانس قابل مشاهده می‌باشد. (b) این عکس‌ها موقعیت سه رشته اکتین (شماره‌های 3, 2, 1) را که در بازه‌های زمانی ۳۰ ثانیه‌ای توسط میکروسکوپی ویدئویی ثبت شده است، به نمایش می‌گذارد. سرعت حرکت رشته را می‌توان از روی این ثبت‌ها تعیین کرد.

ندارد، اما تعیین می‌کند که چه چیزی توسط دُمین‌های منسوب به S1 حرکت داده شود. بنابراین همان‌گونه که انتظار می‌رود، دُمین‌های دمی باید خیلی متنوع باشند و به منظور اتصال به محموله‌های ویژه‌ای به وجود آمده‌اند.

میوزین‌ها خانواده بزرگی از پروتئین‌های حرکتی مکانیکی-شیمیایی را تشکیل می‌دهند

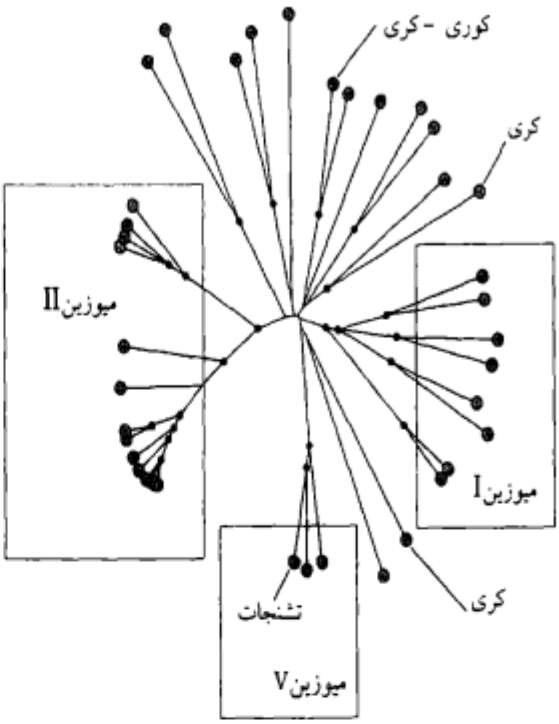
اگرچه همه میوزین‌ها در دُمین حرکتی S1 خودشان از نظر توالی اسید آمینه دارای تشابهات قابل ملاحظه‌ای هستند، اما می‌توان تعداد ژن‌ها و تعداد گروه‌های میوزینی موجود در ژنوم تعیین توالی شده را تعیین نمود. حدود ۴۰ ژن برای میوزین در ژنوم انسانی (شکل ۲۲ـ۱۷)، ۹ ژن در دروزوفیلا و ۵ ژن در مخمر جوانه‌زن[1] وجود دارد. آنالیزهای رایانه‌ای روابط توالی‌ها در بین دُمین‌های سر میوزین نشان داده است که در یوکاریوت‌ها ۲۰ گروه مشخص میوزین به وجود آمده است و در داخل یک گروه از نظر توالی تشابهات بیشتری نسبت به بین گروه‌ها وجود دارد. همان‌گونه که در شکل ۲۲ـ۱۷ نشان داده شده است، پایه ژنتیکی بعضی از بیماریها ناشی از ژن‌های کدکننده میوزین‌ها می‌باشد. دُمین سری همه میوزین‌ها با استفاده از مکانیسم مشابهی از هیدرولیز ATP، کار مکانیکی تولید می‌کند. با وجود این، همان‌گونه که خواهیم دید، اختلافات جزیی در این مکانیسم اثرات ژرفی بر ویژگی‌های عملکردی می‌تواند داشته باشد. گروه‌های مختلف میوزین از نظر دُمین دمی دارای چه رابطه‌ای هستند؟ به‌طور شگفت‌انگیزی، هر گاه دُمین‌های دم میوزینها را تعیین توالی کنیم و آنها را بر اساس این اطلاعات طبقه‌بندی کنیم، آنها مانند گروه‌های دُمین‌های حرکتی در گروه‌های مشابهی قرار می‌گیرند. این نشان می‌دهد که دُمین‌های حرکتی با گروه‌های دُمین‌های دمی هم‌زمان تکامل یافته‌اند[2]. این نتیجه خیلی مهم است و نشان می‌دهد که هر گروه میوزین برای انجام یک وظیفه مشخصی به وجود آمده است.

در مواردی که تا کنون آزمایش شده‌اند، همه میوزین‌ها به جز **میوزین VI** به سمت انتهای (+) رشته اکتین حرکت می‌کنند. میوزین VI در دُمین سر خود دارای یک توالی اضافه است که باعث می‌شود در جهت مخالف کار کنند و بنابراین حرکت آن به سمت انتهای (−) رشته اکتین صورت گیرد. عقیده بر این است که در سلول‌های جانوری میوزین VI در انتقال وزیکول اندوسیتوزی در طول رشته اکتین از غشای پلاسمایی به داخل سیتوزول مشارکت می‌کند. به خاطر بیاورید که رشته‌های اکتین متصل به غشاء از سمت انتهای (+) خود در غشاء هستند، بنابراین موتوری که به سمت (−) آنها جهت‌دهی شده است، آنها را از غشا به مرکز سلول هدایت خواهد کرد.

از میان گروه‌های مختلف میوزین سه تا از آنها بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در جانوران و قارچ‌ها عموماً یافت می‌شوند: خانواده **میوزین I، میوزین II و میوزین V** (شکل ۲۳ـ۱۷). در انسان، هشت ژن زنجیره‌های سنگین خانواده میوزین I، ۱۴ ژن خانواده میوزین II و سه ژن خانواده میوزین V را کد می‌کند.

گروه میوزین II به صورت رشته‌های دوقطبی آرایش می‌یابد بطوری که این نوع آرایش برای وظایف انقباضی آن مهم می‌باشد؛ در

1- Budding yeast 2- Co-evolved



▲ **شکل ۲۲ـ۱۷ فوق خانواده میوزین در انسان.** آنالیز رایانه‌ای روابط دُمین‌های سر S1 همه ۴۰ میوزین کد شده توسط ژنوم انسانی. هر میوزین توسط خطی نشان داده شده است و طول هر خط نشان‌دهنده رابطه فاصله فیلوژنی می‌باشد. بنابراین میوزین‌هایی که با خطوط کوتاه به یکدیگر وصل شده‌اند دارای رابطه نزدیک هستند. در حالی که آن دسته از میوزین‌هایی که با خط طویل از هم جدا شده‌اند فاصله زیاد از هم دارند. از میان این میوزین‌ها سه گروه میوزین I،II و V به‌طور وسیعی در میان یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند و سایر گروه‌ها دارای عملکردهای (وظایف) بسیار تخصصی دارند. بیماری‌های نشان داده شده در اثر از دست دادن یک میوزین خاص ایجاد شده‌اند.

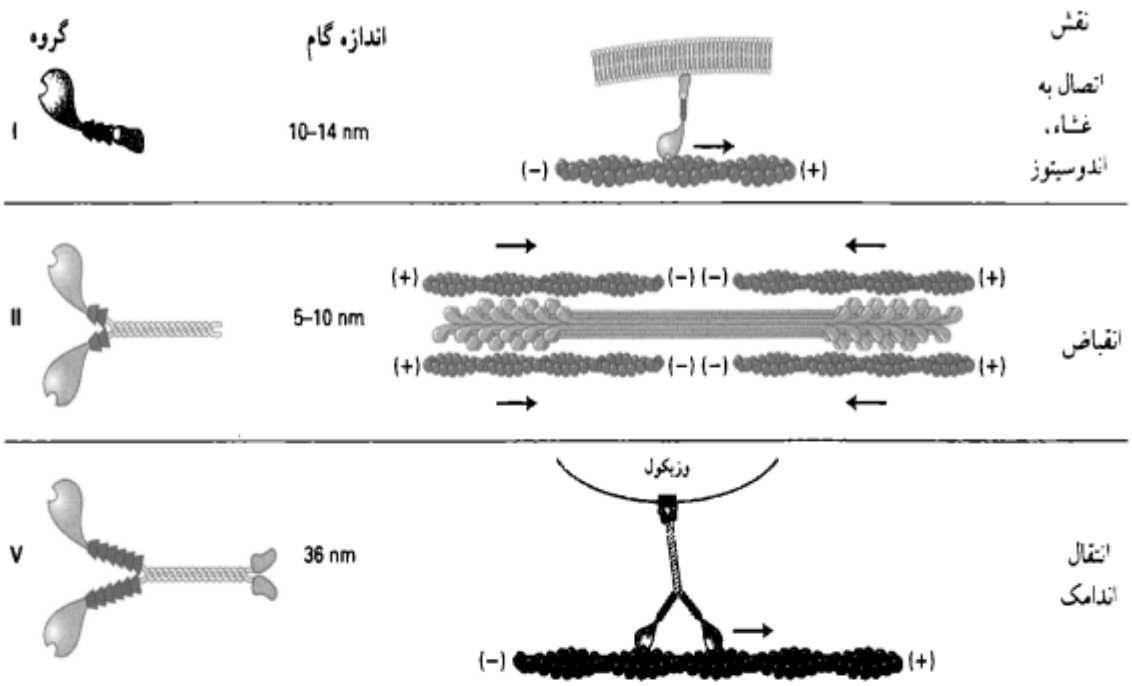
واقع این گروه تنها گروه میوزین‌ها می‌باشد که دارای وظایف انقباضی می‌باشد. تعداد زیاد اعضای این گروه ضرورت وجود گروه میوزین IIها را در عضلات مختلف (مثل، اسکلتی، قلبی و انواع مختلف عضلات صاف) به علاوه سلول‌های غیر عضلانی نشان می‌دهد.

گروه میوزین II تنها گروهی است که به صورت رشته‌های دوقطبی آرایش می‌یابد. تمامی اعضای گروه دُمین گردنی نسبتاً کوتاه و دو زنجیر سبک به ازای هر زنجیر سنگین دارند. گروه میوزین I کاملاً بزرگ می‌باشد، دارای تعداد متنوعی زنجیره سبک متصل به ناحیه گردن می‌باشد و تنها گروهی است که در آن زنجیره‌های سنگین از طریق دُمین‌های دمی خودشان متصل نشده‌اند و بنابراین تک ـ سری[1] هستند. اندازه بزرگ و تنوع گروه میوزین I نشان‌دهنده این است که این میوزین‌ها دارای وظایف زیادی هستند که بسیاری از آنها هنوز کشف نشده است، ولی بعضی از اعضای این خانواده در اتصال رشته‌های اکتین به غشاها و سایر اعضای آن در اندوسیتوز نقش دارند. اعضای گروه میوزین V دارای دو زنجیره سنگین هستند که باعث می‌شود موتور دارای دو سر، نواحی گردنی طویل دارای شش زنجیر سبک در هر کدام و نواحی دمی باشد که دایمریزه می‌شود. این گروه در انتهای خود دارای دُمین‌هایی هستند که به اندامک‌های ویژه‌ای که قرار است منتقل شوند، متصل می‌شود.

تغییرات ساختمان فضایی سر میوزین با هیدرولیز ATP باعث حرکت می‌شود

اولین مدارک از این‌که سرهای میوزین در طول رشته‌های اکتین می‌لغزند یا گام برمی‌دارد، از نتایج مطالعات انجام شده بر روی انقباض عضلانی ناشی شده است. کشف مکانیسم انقباض عضلانی با ابداع سنجش‌های حرکتی در *In Vitro* و سنجش‌های تک مولکولی مسیر شده است. بر اساس اطلاعات کسب شده از این تکنیک‌ها و ساختار سه بُعدی سر میوزین، محققان یک مدل کلی از چگونگی استفاده از انرژی هیدرولیز شده از ATP و حرکت میوزین بر روی رشته اکتین ارائه کرده‌اند (شکل ۲۴ـ۱۷ صفحه ۲۳). عقیده بر این است به دلیل این‌که همه میوزین‌ها از یک مکانیسم مشابهی در حرکت استفاده می‌کنند ما از اینکه آیا دم میوزین به وزیکول می‌شود یا این‌که دم میوزین بخشی از رشته‌های ضخیم، مثلاً در عضله است، چشم‌پوشی خواهیم کرد. یک ویژگی مهم این مدل این است که با هیدرولیز یک مولکول واحد ATP، مولکول میوزین بر روی رشته اکتین یک گام برمی‌دارد. سوالی که برای زیست‌شناسان جالب بود این بود که چگونه میوزین می‌تواند انرژی شیمیایی آزاد شده از هیدرولیز ATP را به کار مکانیکی تبدیل می‌کند. مدت‌هاست که مشخص شده سر S1 میوزین یک ATPase است و توانایی هیدرولیز ATP به ADP و Pi را دارد. آنالیز شیمیایی چگونگی انجام این کار را آشکار کرد (شکل ۲۴a ـ۱۷). در عدم حضور ATP، سر میوزین به‌طور خیلی محکم به F-اکتین متصل شده است. زمانی که ATP متصل می‌شود، تمایل سر به F- اکتین شدیداً کاهش یافته و از اکتین آزاد می‌شود. سپس سر میوزین ATP را هیدرولیز می‌کند، محصولات هیدرولیز ADP و Pi به صورت متصل باقی می‌مانند. انرژی حاصل از هیدرولیز ATP باعث تغییر ساختمان فضایی در سر می‌شود که آن

1- Single-headed



▲ **شکل ۱۷ـ۲۳ (شکل رنگی) سه گروه معمول میوزین.** میوزین I از یک دُمین سر و تعداد متنوعی زنجیره سبک که به دُمین گردن وصل شده‌اند، تشکیل شده است. اعضای گروه میوزین I تنها میوزین‌هایی هستند که دارای یک دُمین سر می‌باشد. اعتقاد بر این است که بعضی از این میوزین‌ها از طریق میانکش‌های لیپیدی به غشاها متصل می‌شود. میوزین‌های II دارای دو دُمین سر و دو زنجیره سبک به ازای هر گردن می‌باشند و تنها گروهی می‌باشند که می‌توانند به صورت رشته‌های دوقطبی آرایش یابند. اعضای میوزین V دارای دو دُمین سر و شش زنجیره سبک به ازای هر گردن می‌باشند. آنها به گیرنده‌های ویژه‌ای (مستطیل قهوه‌ای) در اندامک‌هایی که قرار است منتقل شوند، متصل می‌شود. همه میوزین‌های این سه گروه به سمت انتهای (+) رشته‌های اکتین حرکت می‌کنند.

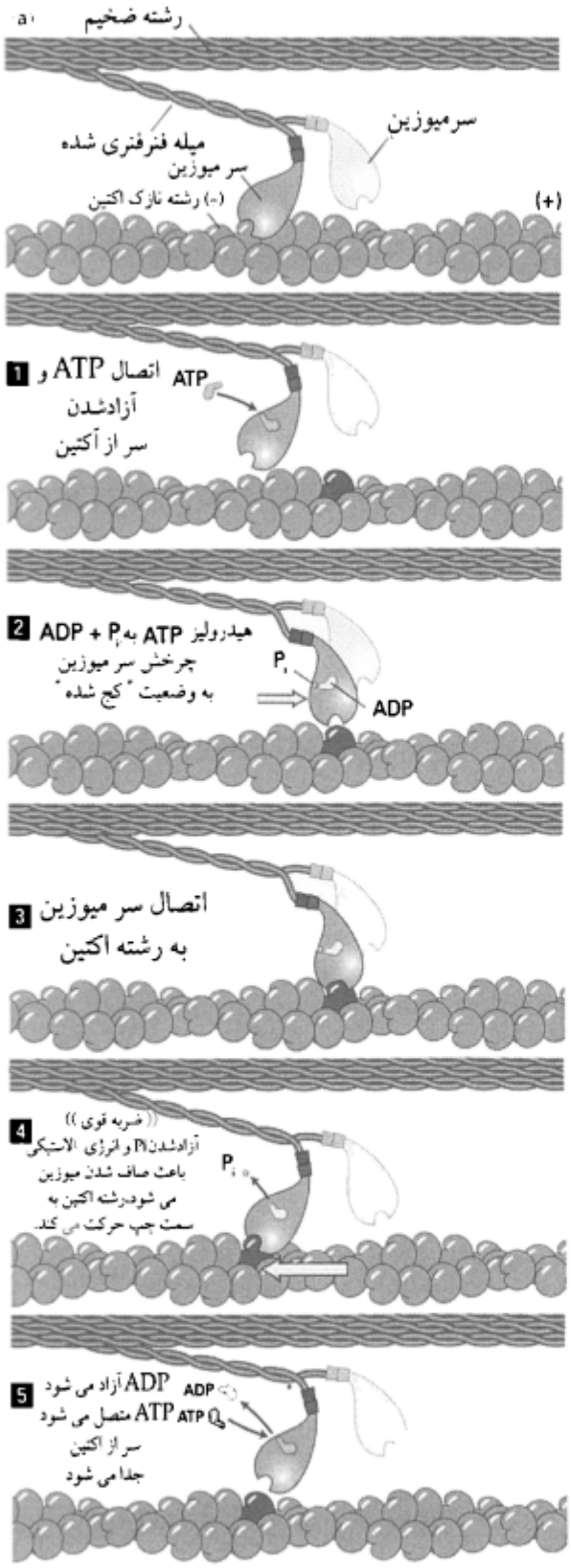
هم موجب چرخش دُمین سر نسبت به گردن می‌گردد. این حالت به وضعیت «کج شده[1]» سر موسوم است (شکل ۱۷ـ۲۴b). در عدم حضور F- اکتین، آزاد شدن Pi به‌طور استثنایی آهسته است که آهسته‌ترین بخش در چرخه ATPase می‌باشد. با وجود این در حضور اکتین، سر به‌طور محکم به F-اکتین متصل می‌شود، باعث تقا آزادسازی Pi و چرخش سر و برگشت آن به وضعیت اولیه‌اش می‌شود، بنابراین باعث می‌شود رشته اکتین نسبت به دُمین گردنی حرکت کند (شکل ۱۷ـ۲۴b). به این طریق، اتصال به F-اکتین باعث تقا حرکت سر و آزاد شدن Pi می‌گردد، در نتیجه دو فرایند را به یکدیگر جفت می‌کند. این مرحله به **ضربه قوی**[2] معروف است. سر به صورت متصل به اکتین باقی می‌ماند تا زمانی که ADP از آن جدا شد و ATP جدید به آن متصل شود که باعث آزادسازی آن از رشته اکتین می‌گردد. سپس چرخه تکرار می‌شود و میوزین می‌تواند دوباره در جهت مخالف اکتین حرکت کند.

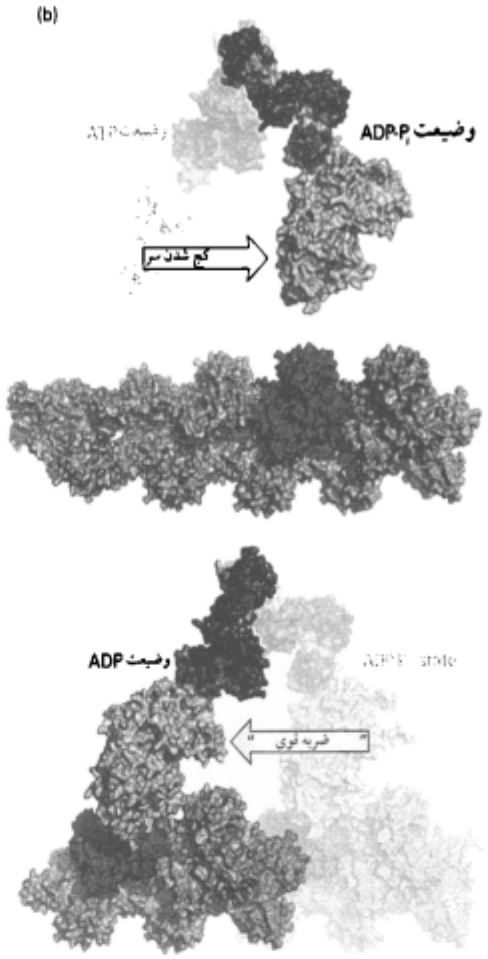
چگونه هیدرولیز ATP در پاکت اتصالی نوکلئوتید به نیرو تبدیل می‌شود؟ نتایج ساختاری حاصل از مطالعات میوزین در حضور نوکلئوتیدها و آنالوگ‌های نوکلئوتیدی که مراحل مختلف این چرخه را تقلید می‌کنند، نشان می‌دهند که اتصال و هیدرولیز نوکلئوتید باعث تغییر ساختمان فضایی در دُمین سر می‌گردد. این حرکت کوچک توسط یک ناحیه «مبدل» موجود در پایه سر که مانند یک تکیه‌گاه عمل می‌کند و باعث می‌شود که گردن اهرم مانند بچرخد، تقویت می‌گردد. این چرخش توسط بازوی اهرم میله‌ای‌شکل که دُمین گردن را تشکیل می‌دهد، تقویت می‌گردد، بنابراین رشته اکتین به اندازه چند نانومتر حرکت می‌کند (شکل ۱۷ـ۲۴b).

از این مدل می‌توان یک پیشگویی قوی ارائه کرد: فاصله‌ای که یک سر میوزین در هنگام هیدرولیز یک مولکول ATP ـ **اندازه گام** میوزین ـ طی می‌کند بایستی با طول دُمین گردن متناسب باشد. به منظور آزمایش این پیش‌بینی، مولکول‌های میوزین جهش‌یافته با دُمین‌های گردنی در اندازه‌های مختلف ساخته شده و سرعت حرکت

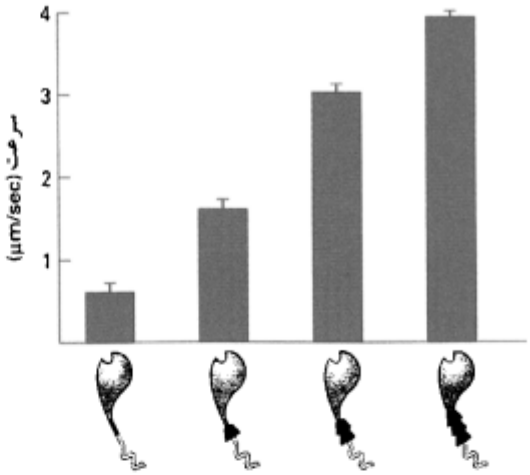
1- Cocked

2- Power stroke





▲ **شکل ۲۴-۱۷ (شکل رنگی) سر میوزین به منظور حرکت بر روی رشته اکتین از ATP استفاده می‌کند.** (a) در غیاب ATP سر میوزین به‌طور محکم به رشته اکتین متصل شده است. اگرچه این وضعیت در عضله زنده خیلی کوتاه مدت می‌باشد، اما آن در اشخاص مرده مسئول سفتی عضلات می‌باشد. مرحله ❶: با اتصال ATP، سر میوزین از رشته اکتین جدا می‌گردد. مرحله ❷: سر باعث هیدرولیز ATP به ADP و Pi می‌شود و آن هم باعث چرخش سر نسبت به گردن می‌گردد. این «وضعیت کج» انرژی آزاد شده از هیدرولیز ATP را به صورت انرژی الاستیکی، شبیه به فنر کشیده شده، حفظ می‌کند. مرحله ❸: میوزین در وضعیت «کج» به اکتین متصل می‌شود. مرحله ❹: وقتی که سر میوزین به اکتین متصل شد، همزمان با آزاد کردن Pi انرژی ذخیره شده، به صورت الاستیک، را به منظور حرکت رشته اکتین آزاد می‌کند. این وضعیت به «ضربه قوی» معروف است و باعث حرکت رشته اکتین نسبت به انتهای دُمین گردن میوزین می‌گردد. مرحله ❺: سر تا زمانی که ADP آزاد شود و ATP جدیدی متصل شود، به‌طور محکم به رشته متصل باقی می‌ماند. (b) مدل‌های مولکولی تغییرات ساختمان فضایی سر میوزین در وضعیت سر «کج شده» (پانل بالایی) و در ضربه قوی (پانل پایینی). زنجیره‌های سبک میوزین به رنگ آبی تیره و سبز بقیه قسمت‌های سر میوزین و گردن به صورت آبی روشن و اکتین به رنگ قرمز نمایش داده شده است.

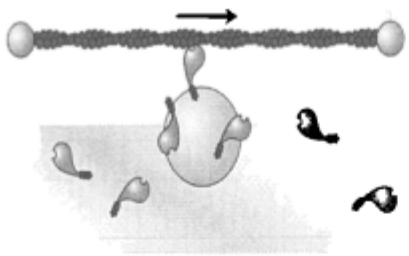


▲ **شکل تجربی ۲۵ـ۱۷ طول دُمین گردنی میوزین II سرعت حرکت را تعیین می‌کند.** به منظور آزمایش مدل بازو ـ اهرم حرکت میوزین، محققان برای اتصال سرهای میوزین به دُمین‌های گردن دارای طول متفاوت از تکنیک‌های DNA نوترکیب بهره جستند. سرعت حرکت آنها بر روی رشته‌های اکتین تعیین شد. مشخص شد که هر چه‌قدر طول بازوی اهرمی زیادتر باشد، سرعت حرکت میوزین سریع‌تر است. این آزمایش مکانیسم مطرح شده را تأیید کرد.

آنها بر روی رشته اکتین تعیین شد. به‌طور قابل توجهی مشخص شد که یک تناسب خوبی بین طول دُمین گردن و سرعت حرکت وجود دارد (شکل ۲۵ـ۱۷).

سرهای میوزین گام‌های جداگانه‌ای در طول رشته‌های اکتین برمی‌دارند

مهم‌ترین ویژگی میوزین، توانایی آن در تولید نیروی لازم برای حرکت می‌باشد. محققان به منظور اندازه‌گیری نیروهای تولید شده توسط یک مولکول میوزین از تله‌های نوری[1] استفاده کردند (شکل ۲۶ـ۱۷). در این روش میوزین‌ها با چگالی کمتری بر روی دانه‌هایی تثبیت می‌شوند. رشته اکتین که بین دو تله نوری قرار گرفته است، به سمت دانه‌ها تا زمانی که با مولکول میوزین تماس برقرار کند، کاسته می‌شود. زمانی که ATP افزوده می‌شود، میوزین بر روی رشته اکتین کشیده می‌شود. با استفاده از یک مکانیسم مکانیکی کنترل شده با کامپیوتر، می‌توان فاصله کشیده‌شدن میوزین و نیروها و زمان حرکت را اندازه‌گیری کرد (شکل ۲۶ـ۱۷). نتایج مطالعات حاصل از تله نوری، نشان می‌دهد که میوزین II به‌طور مداوم با رشته اکتین میانکنش نمی‌کند، بلکه به‌طور نسبی به آن متصل شده، حرکت کرده و از آن رها می‌شود. در واقع، میوزین II به‌طور متوسط ۱۰ درصد از چرخه



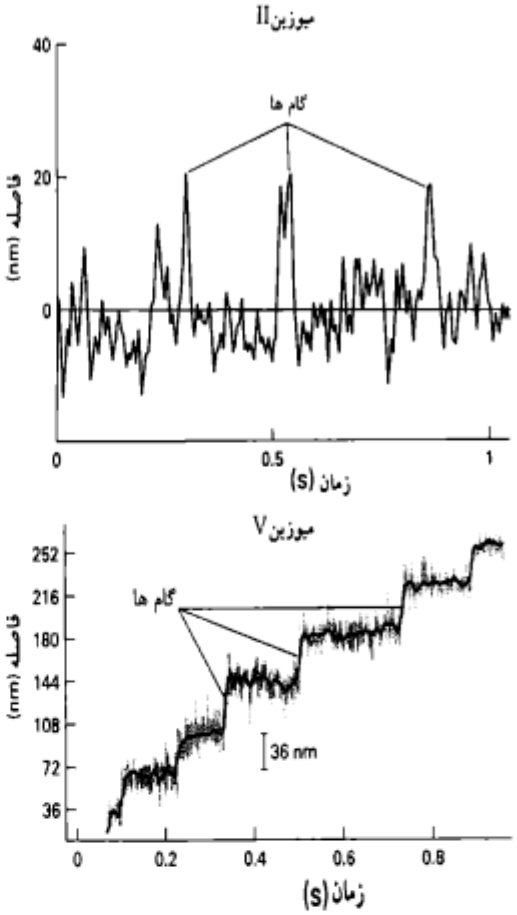
▲ **شکل ۲۶ـ۱۷ تله نوری اندازه گام و نیروی تولید شده توسط یک مولکول میوزین را تعیین می‌کند.** در تله نوری، پرتو یک لیزر مادون قرمز توسط میکروسکوپ نوری بر روی دانه لاتکس (یا هر چیزی که نور مادون قرمز را جذب نمی‌کند)، که دانه را در مرکز پرتو گرفته و نگه می‌دارد، تابیده می‌شود. شدت نیروی نگهدارنده دانه با افزایش یا کاهش شدت پرتو لیزر تنظیم می‌گردد. در این آزمایش یک رشته اکتین بین دو تله نوری نگه داشته می‌شود. سپس رشته اکتین بر روی دانه دیگر که غلظت رقیقی از مولکول‌های میوزین به آن متصل شده است، کم می‌شود. هر گاه در حضور ATP رشته اکتین با یک مولکول میوزین مواجه شد، میوزین بر روی رشته اکتین کشیده می‌شود. با این کار محققان قادر خواهند بود هم نیروی تولید شده توسط میوزین و هم اندازه گام میوزین را تعیین کنند.

ATPase را در تماس با F- اکتین انجام می‌دهد، بعبارتی گفته می‌شود که آن دارای **نسبت وظیفه‌ای**[2] ۱۰ درصدی می‌باشد. این مقدار در زمانی که عضله را بررسی خواهیم کرد، مهم می‌باشد. صدها سر میوزین بر روی رشته‌های اکتین کشیده می‌شوند، به‌طوری که در هر لحظه ۱۰ درصد از سرها در ایجاد انقباض صاف درگیر هستند.

وقتی که میوزین II با F- اکتین تماس برقرار می‌کند، گام‌های جداگانه‌ای برمی‌دارد. طول این گام‌ها تقریباً به طول ۵ـ۱۵nm می‌باشد (شکل ۲۷ـ۱۷)، و نیرویی برابر با ۵ـ۳ پیکونیوتن (pN) تولید می‌کند که برابر با نیروی جاذبه وارد شده بر یک باکتری می‌باشد.

حال اگر به آزمایش مشابه تله نوری انجام شده با میوزین V بنگریم، مشاهده می‌کنیم که منحنی‌ها کاملاً متفاوت هستند (شکل ۲۷ـ۱۷). حال به آسانی می‌توانیم گام‌هایی به طول تقریباً ۳۶nm را تشخیص دهیم. این گام‌های بزرگ نشان‌دهنده دُمین گردنی طویل ـ بازوی اهرمی ـ میوزین V می‌باشد. مضافاً ما مشاهده می‌کنیم که

1- Optical traps 2- Duty ratio



▲ **شکل تجربی ۲۷ـ۱۷ اندازه‌گیری اندازه گام و پیشرفت میوزین‌ها.** با استفاده از یک تله نوری مشابه با آنچه که در شکل ۲۶ـ۱۷ بیان شد، محققان رفتار میوزین II (نمودار بالایی) و میوزین V (نمودار پایینی) را آنالیز کردند. همان‌گونه که قله‌های نمودار نشان می‌دهد، میوزین II گام‌های کوچک نامنظم (۵ـ۱۵nm) برمی‌دارد، به این معنا که آن به رشته اکتین متصل شده، حرکت کرده و سپس جدا می‌شود. بنابراین یک موتور نانو غیر پیشرونده است. بر خلاف آن، میوزین V گام‌های پی در پی با اندازه‌های ۳۶nm برمی‌دارد، بنابراین دارای گام‌هایی به طول ۳۶nm و شدیداً پیشرونده است به این معنی که از رشته اکتین جدا نمی‌شود.

موتور بدون رها شدن از اکتین گام‌های پشت سر هم برمی‌دارد ـ به این نوع حرکت، حرکت **پیشرونده**[1] گفته می‌شود. این عمل به دلیل این است که چرخه ATPase آن تغییر یافته است تا با کاهش سرعت رهایش ADP نسبت وظیفه‌ای بالایی (>۷۰ درصد) داشته باشد؛ بنابراین دُمین سر درصد بیشتری از چرخه را در تماس با رشته اکتین می‌گذراند. از آن جایی که یک مولکول میوزین V دارای دو سر می‌باشد، نسبت وظیفه >۵۰ درصد تضمین می‌کند که یکی از سرها در مدت زمانی که به سمت رشته اکتین حرکت می‌کند به آن متصل باقی بماند تا میوزین جدا نشود.

میوزین V به صورت دست به دست بر روی رشته اکتین گام برمی‌دارد

سئوال بعدی این است که چگونه دو سر میوزین V با یکدیگر همکاری می‌کنند تا روی رشته اکتین حرکت کنند؟ یک مدل پیشنهادی این است که دو سر به صورت دست به دست[2] با سرهای پیشرو بر روی رشته اکتین گام برمی‌دارند (شکل ۲۸ـ۱۷a). یک احتمال پیشنهادی هم مدل کرم خاکی[3] است که در آن سر جلویی یک گام برمی‌دارد، سر دوم پشت سر آن کشیده می‌شود و سپس سر پیشرو یا جلویی یک گام دیگر برمی‌دارد (شکل ۲۸ـ۱۷b). چگونه می‌توان این مدل‌ها را تفکیک کرد؟ در مدل کرم خاکی هر سر گام ۳۶nm برمی‌دارد در صورتی که در مدل گام‌زدن[4] هر سر گام ۷۲nm برمی‌دارد. محققان با اتصال یک پروب فلورسنت تنها به یکی از نواحی گردنی میوزین V مشاهده کردند که آن بر روی رشته اکتین حرکت می‌کند: آن گام‌های ۷۲nm برمی‌دارد (شکل ۲۸ـ۱۷c)، و بنابراین بر روی رشته دست به دست حرکت می‌کند (۷۲nm اندازه گام هر سر می‌باشد؛ اندازه گام یک موتور دو سر ۳۶nm می‌باشد). چرا اندازه گام میوزین V خیلی بزرگ است؟ هر گاه اندازه گام ۳۶nm را با ساختار رشته اکتین مقایسه کنیم، خواهیم دید که برابر با طول بین تکرارهای مارپیچی رشته اکتین می‌باشد (شکل ۵ـ۱۷ و ۲۸ـ۱۷a را ملاحظه کنید)، بنابراین میوزین V زمانی که در یک بخش رشته اکتین گام برمی‌دارد، بین مکان‌های اتصالی گام برمی‌دارد. احتمالاً میوزین V در تکامل به این منظور به وجود آمده است که گام‌هایی بزرگ به اندازه تکرار مارپیچی اکتین بردارد و برای انجام مداوم این کار به ندرت از رشته اکتین جدا می‌شود. این ویژگی‌ها دقیقاً برای موتوری که به منظور انتقال محموله در طول اکتین طراحی شده است، قابل انتظار است.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۷

میوزین‌ها: پروتئین‌های موتوری مبتنی بر اکتین

- میوزین‌های موتورهای مبتنی بر اکتین هستند که به کمک هیدرولیز ATP عمل می‌کنند.
- میوزین‌های دارای یک دُمین موتوری سری، یک دُمین گردنی بازو-اهرمی، و یک دُمین اتصالی به محموله می‌باشند (شکل ۲۰-۱۷ را ملاحظه کنید)

1- Processively
2- Hand over hand
3- Inchworm
4- Walking model

■ چند گروه میوزین وجود دارد که سه گروه از آنها در بسیاری از یوکاریوتها یافت می‌شود: میوزین I دارای یک دُمین سر، میوزین II دارای دو دُمین سر که بصورت رشته‌های دوقطبی آرایش می‌یابند، و میوزین V دارای دو سری می‌باشد که بصورت رشته‌ای آرایش نمی‌یابد (شکل ۳۳-۱۷ را ملاحظه کنید)

■ میوزین‌ها وقتی که به F- اکتین متصل می‌شوند انرژی حاصل از هیدرولیز ATP را به کار مکانیکی تبدیل می‌کنند. این عمل بواسطه تغییر ساختمان فضایی در ناحیه سر صورت می‌گیرد (شکل ۲۴-۱۷ را ملاحظه کنید)

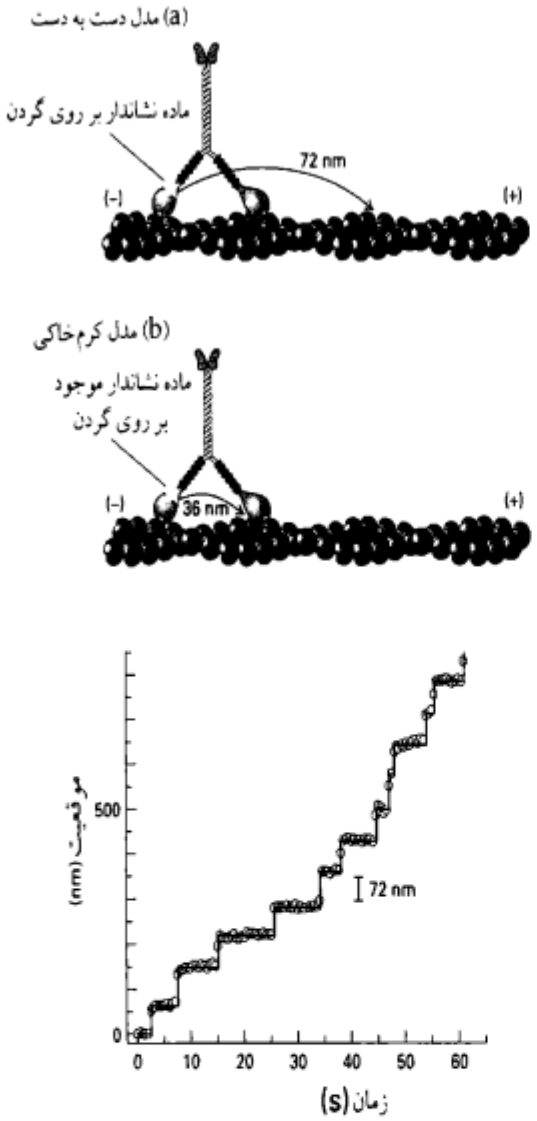
■ سری‌های میوزین در طول رشته اکتین گام‌های جداگانه‌ای برمی دارند. گام‌های میوزین II کوچک (۵-۱۵nm) و غیرپیشرونده و گام‌های میوزین V بزرگ (۳۶nm) و پیشرونده می‌باشد.

۶-۱۷ حرکاتی که به کمک میوزین انجام می‌گردد

ما بحث کردیم که چگونه دُمین‌های سر و گردن میوزین مسئول ویژگی‌های موتوری آن می‌باشد. حال به ناحیه دم برمی‌گردیم که محموله‌هایی که میوزین حمل می‌کند را تعیین می‌کنند. وظایف بسیاری از گروه‌های میوزینی کشف شده، در جانداران متازوا هنوز شناخته نشده است. در زیر دو نمونه از مثال‌هایی که در آن میوزین نقش دارد، آورده می‌شود. اولین مثال ما عضله اسکلتی است که در مطالعه آن میوزین II کشف شده است. در عضله دُمین‌های سر زیادی به صورت رشته‌های دوقطبی به یکدیگر متصل می‌شوند، بطوریکه هر کدام چرخه وظیفه‌ای کوتاهی دارند و به کمک یکدیگر باعث انقباض می‌شوند. ماشین‌های انقباضی سازمان یافته مشابهی در انقباض عضلات صاف و فیبرهای استرسی و در حلقه انقباضی سیتوکینز نقش دارند. سپس گروه میوزین V را بررسی می‌کنیم که دارای چرخه وظیفه‌ای طولانی است و باعث می‌شود این میوزین‌ها بتوانند محموله‌ها را در فاصله‌های نسبتاً طولانی، بدون جدا شدن از رشته‌های اکتین، حمل کنند.

در هنگام انقباض در عضله اسکلتی رشته‌های ضخیم میوزین و رشته‌های نازک اکتین در کنار هم می‌لغزند

سلول‌های عضلانی به منظور انجام یک وظیفه بسیار تخصص یافته به نام انقباض به وجود آمده‌اند. انقباضات عضلانی باید سریع و مکرر باشند و به اندازه کافی نیرو برای حرکت دادن بارهای سنگین و بزرگ داشته باشند. یک سلول عضله اسکلتی معمولی به صورت



▲ **شکل تجربی ۲۸-۱۷ میوزین V دارای گامی به اندازه ۳۶nm می‌باشد، چون هر سر دارای گامی به اندازه ۷۲nm می‌باشد، بنابراین، آن به صورت دست به دست حرکت می‌کند.** دو مدل برای حرکت میوزین V روی رشته اکتینی پیشنهاد گردیده است. (a) در مدل دست به دست، یکی از سرها به رشته اکتین متصل می‌گردد و سپس رشته دیگر حرکت می‌کند و به ناحیه‌ای ۷۲nm جلوتر از آن متصل می‌شود. (b) در مدل کرم‌خاکی مانند، سر پیشرو ۳۶nm حرکت می‌کند، سپس سر پیرو پشت سر آن حرکت می‌کند و سپس سر پیشرو مجدداً یک ۳۶nm دیگر به جلو گام برمی‌دارد. (c) در میوزین V که تنها یک سر آن با فلورسنت نشان داده شده است، مشاهده می‌شود که اندازه یک گام ۷۲nm است. بنابراین میوزین V به صورت دست به دست حرکت می‌کند.

استوانه‌ای بزرگ (طول ۱-۴۰mm و عرض ۱۰-۵۰μm)، و چند هسته‌ای (حدود ۱۰۰ هسته) می‌باشد (شکل ۲۹a-۱۷). در داخل

سلول عضلانی **میوفیبریل‌های** زیادی وجود دارد که از آرایش تکراری و منظم ساختارهای تخصصی به نام **سارکومر** تشکیل شده است (شکل ۱۷ـ۲۹b). سارکومر، که در عضله در حال استراحت به‌طور تقریبی ۲μm می‌باشد، در هنگام انقباض عضلانی تقریباً ۷۰ درصد کوتاه‌تر می‌شود. میکروسکوپ الکترونی و آنالیز بیوشیمیایی نشان داده است که هر سارکومر دارای دو نوع رشته اصلی می‌باشد: **رشته‌های ضخیم**، که از میوزین II تشکیل شده و **رشته‌های نازک** که دارای اکتین و پروتئین‌های متصل‌شونده به آن می‌باشد (شکل ۱۷ـ۲۹c).

رشته‌های ضخیم از رشته‌های دوقطبی میوزین II تشکیل شده‌اند و در آنها سرهای موجود در هر نیمه رشته دارای آرایش‌های مخالف می‌باشند (شکل ۱۷ـ۲۰a را ملاحظه کنید). رشته‌های نازک اکتین از ناحیه انتهای (+) خودشان در ساختار پُررنگی به نام **دیسک Z** قرار می‌گیرند (شکل ۱۷ـ۲۹b)، به‌طوری که دو دسته رشته اکتین موجود در سارکومر دارای آرایش‌های مخالف هم هستند (شکل ۱۷ـ۳۰). به منظور درک انقباضات عضلانی، به میانکنش بین یک سر میوزین (از بین صدها سر در عضله ضخیم) و رشته نازک (اکتین) که در شکل ۱۷ـ۲۴ آورده شده است، توجه شود. در هنگام میانکنش‌های چرخه‌ای، که **چرخه پل عرضی**[1] نیز نامیده می‌شود، هیدرولیز ATP با حرکت سر میوزین به سمت دیسک Z، که معادل با انتهای (+) رشته نازک می‌باشد، همراه است. به دلیل این‌که رشته ضخیم دوقطبی می‌باشد، عملکرد سرهای میوزین در دو انتهای مخالف رشته ضخیم باعث کشیده شدن رشته‌های نازک به سمت مرکز رشته ضخیم و در نتیجه به سمت مرکز سارکومر می‌شود (شکل ۱۷ـ۳۰). این حرکت باعث کوتاه‌تر شدن سارکومر می‌شود و انتهای رشته‌های ضخیم را تا نزدیک دیسک Z می‌برد. انقباض یک عضله سالم ناشی از فعالیت صدها سر میوزین موجود در رشته ضخیم می‌باشد و توسط صدها رشته ضخیم و نازک موجود در سارکومر و هزاران سارکومر موجود در یک فیبر عضلانی تقویت می‌گردد. حال می‌توانیم درک کنیم که چرا میوزین II هم غیر پیشرونده است و هم نیاز به چرخه وظیفه‌ای کوتاه[2] دارد (شکل ۱۷ـ۲۷ را ملاحظه کنید): هر سر فاصله کوتاهی را بر روی رشته اکتین طی می‌کند، سپس رها شده و اجازه می‌دهد که سرهای دیگری کشیده شود، بنابراین سرهای زیادی با همدیگر همکاری می‌کنند تا باعث انقباض ملایم سارکومر گردند.

قلب یک اندام انقباضی شگفت‌انگیز می‌باشد که آن بدون هیچ وقفه‌ای در هر سال تقریباً سه میلیون بار یا در کل عمر شخص ۲۰۰ میلیون بار منقبض می‌شود. سلول‌های عضلانی قلب دارای یک ماشین انقباضی بسیار مشابه با سلول‌های عضله اسکلتی می‌باشند، با این تفاوت که آنها سلول‌های تک یا دوهسته‌ای می‌باشند. در هر سلول، انتهای سارکومرها در ساختارهایی در غشای پلاسمایی، به نام دیسک‌های اینترکالت شده وارد شده، باعث ارتباط سلول‌ها با زنجیره انقباضی می‌گردد. اگرچه سلول‌های عضله قلبی در مراحل اولیه زندگی انسان به وجود آمده‌اند ولی آنها نمی‌توانند در آسیب‌هایی مثل آسیب‌های ناشی از حمله قلبی جایگزین شوند. جهش‌های مختلفی که در پروتئین‌های ماشین انقباضی قلبی رخ می‌دهد باعث **کاردیومیوپاتی‌های هیپرتروفیک** می‌گردد. طی این بیماری‌ها عضله دیواره قلبی ضخیم می‌گردد و باعث مختل شدن عملکرد آن می‌شود. به عنوان مثال، جهش‌های زیادی در زنجیره سنگین میوزین قلبی گزارش شده است که باعث اختلال در وظیفه انقباضی آن حتی در افراد هتروزیگوت شده است. در چنین افرادی، قلب سعی می‌کند بار هیپرتروف شدن را جبران کند و در نتیجه چنین حالتی منجر به آریتمی (ضربان نامنظم) قلبی کشنده می‌گردد. علاوه بر نقص‌های موجود در زنجیره سنگین میوزین، نقص‌های دیگری نیز ناشی از جهش در سایر اجزای ماشین انقباضی، مثل اکتین، زنجیره‌های سبک میوزین، تروپومیوزین و تروپونین و اجزا ساختاری مثل تیتین منجر به کاردیومیوپاتی می‌گردد (در زیر بحث می‌گردد).

ساختار عضله اسکلتی توسط پروتئین‌های پایدارکننده و داربستی شکل می‌گیرد

ساختار سارکومر توسط یک سری پروتئین‌های ضمیمه‌ای حفظ می‌شود (شکل ۱۷ـ۳۱). رشته‌های اکتین در انتهای (+) خود توسط *CapZ* و در انتهای (-) خود توسط **تروپومودولین** پایدار می‌گردند. پروتئین بزرگی به نام **نبولین**[3] سطح کل رشته‌های اکتین را از دیسک Z تا محل اتصال تروپومودولین می‌پوشاند. نبولین از دُمین‌های تکراری تشکیل شده است و رشته اکتین را می‌پوشاند. عقیده بر این است که تعداد تکرارهای متصل‌شونده به اکتین و بنابراین طول نبولین، طول رشته‌های باریک را تعیین می‌کند. پروتئین بزرگ دیگری به نام **تیتین** (به دلیل این‌که خیلی بزرگ است)، دارای سَر است که به دیسک Z متصل شده و تا مرکز

1- Cross-bridge cycle 2- Short duty cycle
3- Nevulin

رشته ضخیم، جایی که مولکول تیتین دیگری از دیسک Z دیگری تا آنجا کشیده شده است، امتداد یافته است. اعتقاد بر این است که تیتین یک مولکول الاستیکی است که رشته‌های ضخیم را در مرکز سارکومر نگه می‌دارد و هم‌چنین از کشیدگی زیاد ممانعت می‌کند تا رشته‌های ضخیم را به صورت تداخلی در بین رشته‌های نازک حفظ کند.

انقباض عضله اسکلتی توسط Ca^{2+} و پروتئین‌های متصل‌شونده به اکتین تنظیم می‌گردد

مانند بسیاری از فرایندهای سلولی، انقباض عضله اسکلتی با افزایش غلظت سیتوزولی Ca^{2+} آغاز می‌گردد. همان‌گونه که در فصل ۱۱ توضیح داده شد، غلظت Ca^{2+} سیتوزول به‌طور طبیعی پایین و کمتر از ۰/۱μM است. در سلول‌های عضله اسکلتی، غلظت پایین Ca^{2+} سیتوزولی اساساً از طریق Ca^{2+}ATPase که به‌طور مداوم یون‌های Ca^{2+} را از سیتوزول به داخل **شبکه سارکوپلاسمیک SR(SR)** پمپ می‌شود، حفظ می‌شود. SR یک شبکه آندوپلاسمی ویژه سلول‌های عضلانی می‌باشد، (شکل ۱۷-۳۲). این فعالیت باعث می‌شود Ca^{2+} در SR ذخیره گردد.

با رسیدن پیام عصبی (یا پتانسیل عمل؛ فصل ۲۳ را ملاحظه کنید) به محل اتصال نورون عضله، پتانسیل عملی در غشای پلاسمایی سلول ـ عضله (**سارکولما** نیز نامیده می‌شود)، آغاز می‌گردد. پتانسیل عمل از فرورفتگی‌های غشای پلاسمایی موسوم به **توبول‌های عرضی**، که در داخل سلول اطراف میوفیبریل‌ها را پوشانده‌اند، انتقال می‌یابند (شکل ۱۷-۳۲). رسیدن پتانسیل عمل به توبول‌های عرضی باعث تحریک باز شدن کانال‌های Ca^{2+} وابسته به ولتاژ در غشا SR می‌گردد. با این عمل Ca^{2+} از SR آزاد می‌گردد و غلظت Ca^{2+} سیتوزولی در میوفیبریل‌ها افزایش می‌یابد. افزایش غلظت Ca^{2+} باعث تغییر در دو پروتئین ضمیمه به نام‌های تروپومیوزین و تروپونین می‌گردد. این پروتئین‌ها به رشته‌های نازک اکتین متصل می‌شوند و به‌طور طبیعی مانع اتصال میوزین می‌شوند. تغییر موقعیت این پروتئین‌ها در روی رشته‌های نازک به نوبه خود باعث می‌گردد که میوزین با اکتین میانکش دهد و بنابراین انقباض رخ دهد. این نوع تنظیم بسیار سریع است و به **تنظیم رشته نازک**[1] معروف است.

تروپومیوزین (TM) یک مولکول طنابی‌شکل و به طول تقریبی ۴۰nm می‌باشد که به هفت زیرواحد رشته اکتین متصل می‌گردد. مولکول‌های TM به صورت سر به دم تشکیل یک زنجیره ممتد در بخش جانبی رشته نازک اکتین می‌دهد (شکل ۱۷-۳۳a,b).

به همراه هر تروپومیوزین **تروپونین** (TN) وجود دارد که یک کمپلکس سه زیرواحدی از زیرواحدهای TN-C, TN-I, TN-T می‌باشد. تروپوتین -C زیرواحد متصل‌شونده به Ca^{2+} تروپوتین است. TN-C موقعیت TM را در سطح رشته اکتین کنترل می‌کند.

تحت کنترل Ca^{2+} و TN، TM می‌تواند دو موقعیت بر روی رشته نازک ـ که از حالت استراحت عضله به انقباضی عضله متفاوت است، اشغال کند. در غیاب Ca^{2+} (حالت استراحت)، TM میانکنش میوزین با F-اکتین را مهار می‌کند و عضله در حال استراحت است. اتصال یون‌های Ca^{2+} به TN-C باعث حرکت TM به مکان جدیدی در روی رشته می‌شود. بنابراین این عمل باعث آشکار شدن مکان اتصال‌شونده به میوزین در اکتین می‌گردد (شکل ۱۷-۳۳b). در نتیجه، در غلظت‌های Ca^{2+} بیشتر از ۱μM، مهار ناشی از کمپلکس TM-TN از بین می‌رود و انقباض اتفاق می‌افتد. چرخه انقباض و استراحت وابسته به Ca^{2+} عضله اسکلتی در شکل ۱۷-۳۳c به‌طور خلاصه آورده شده است.

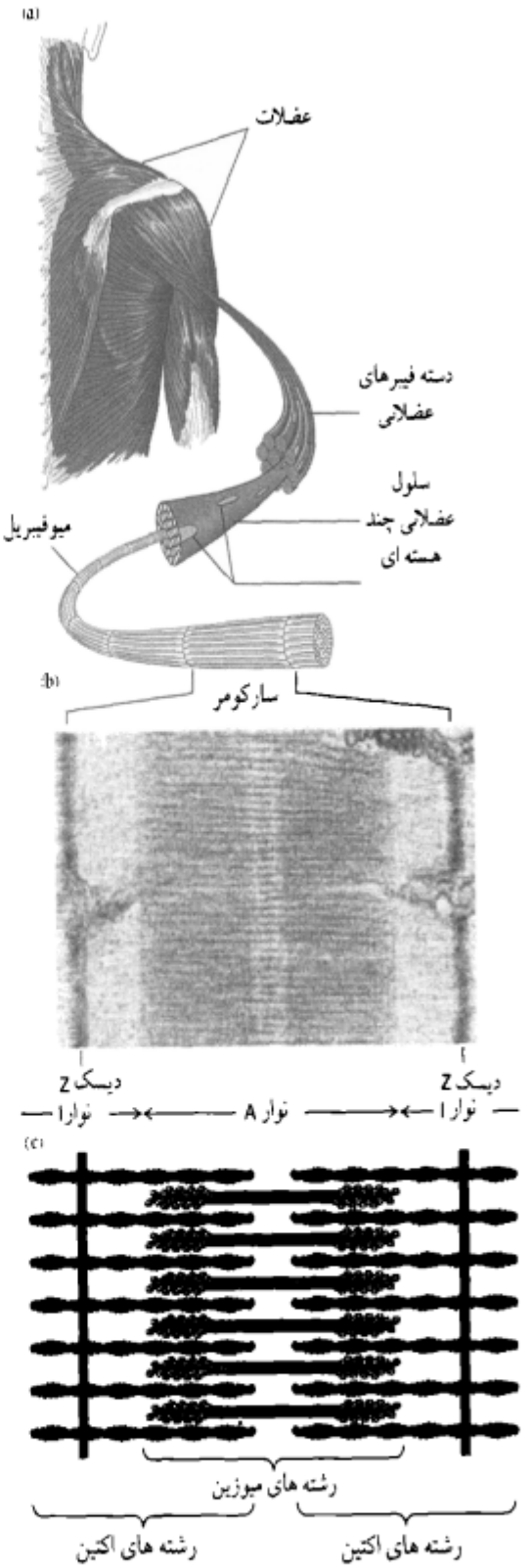
اکتین و میوزین II در سلول‌های غیر عضلانی دسته‌جات انقباضی تشکیل می‌کنند

در عضله اسکلتی، رشته‌های نازک اکتین و رشته‌های ضخیم میوزین II به صورت ساختارهای انقباضی آرایش می‌یابند. سلول‌های غیر عضلانی دارای چندین نوع **دسته‌جات انقباضی**[2] هستند که از رشته‌های اکتین و میوزین تشکیل شده‌اند. این دسته‌جات شبیه فیبرهای عضله اسکلتی می‌باشند، ولی سازمان‌دهی کمتری نسبت به آنها دارند. مضافاً این‌که آنها فاقد سیستم تنظیمی تروپونینی هستند و به جای آن با فسفریلاسیون میوزین تنظیم می‌شوند که در ادامه بحث می‌گردد.

در سلول‌های اپی‌تلیالی، دسته‌جات انقباضی عموماً به صورت **کمربند اتصالی**[3] که سطح داخلی سلول را در اتصالات سلولی می‌پوشاند، یافت می‌گردد (شکل ۱۷-۴a را ملاحظه کنید) و در حفظ یک‌پارچگی اپی‌تلیوم مهم می‌باشد. فیبرهای استرسی، که در سطوح پایین سلول‌های کاشته شده بر روی سطوح مصنوعی (شیشه‌ای یا پلاستیکی) یا در ماتریکس خارج سلولی قابل مشاهده هستند، نوع دیگری از دسته‌جات انقباضی هستند (شکل ۱۷-۴a,c) که در اتصال سلول مخصوصاً به بسترهای بی‌شکل مهم هستند. پایانه‌های فیبرهای استرسی به اتصالات کانونی دارای اینتگرین، ساختارهای

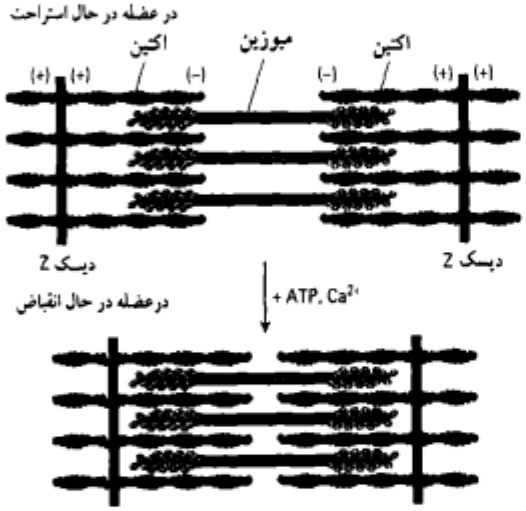
1- Thin filament regulation

2- Contractils bundles 3- Adherens belt



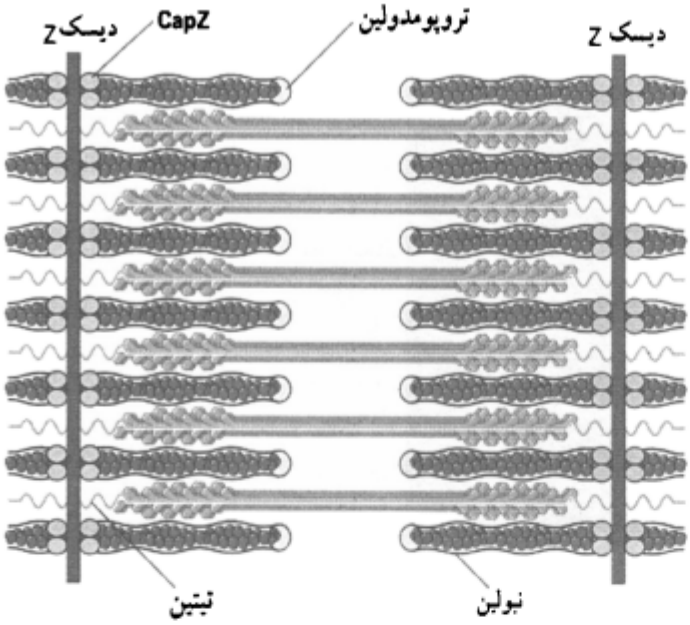
ویژه‌ای که سلول را به بستر مربوطه متصل می‌کنند، منتهی می‌گردند (شکل ۱۷ـ۳۹ را ملاحظه کنید). کمربندهای پیرامونی و فیبرهای استرسی دارای چندین پروتئین می‌باشند که در دستگاه انقباضی عضله صاف یافت می‌شوند و بعضی از ویژگی‌های سازمان‌دهی مشابه سارکومرهای عضلات را نشان می‌دهند. نوع سوم دسته‌جات

◀شکل ۱۷ـ۲۹ ساختار سارکومر عضله اسکلتی. (a) عضلات اسکلتی از فیبرهای عضلانی ساخته شده است که آنها هم از چند دسته سلول چندهسته‌ای تشکیل شده‌اند. هر سلول دارای چند میوفیبریل می‌باشد که از هزاران ساختار تکراری انقباضی به نام سارکومر تشکیل شده‌اند. (b) در میکروگراف الکترونی برش طولی عضله مخطط موشی، یک سارکومر مشاهده می‌شود. در دو سمت دیسک‌های Z، نوارهای I کم‌رنگ و روشن وجود دارد که تماماً از رشته‌های نازک اکتین ساخته شده است. این رشته‌های نازک از هر دو سمت دیسک Z کشیده می‌شوند و با رشته‌های ضخیم میوزین سیاه‌رنگ در نوار A تداخل می‌کنند. (c) دیاگرام آرایش رشته‌های میوزین و اکتین در یک سارکومر.

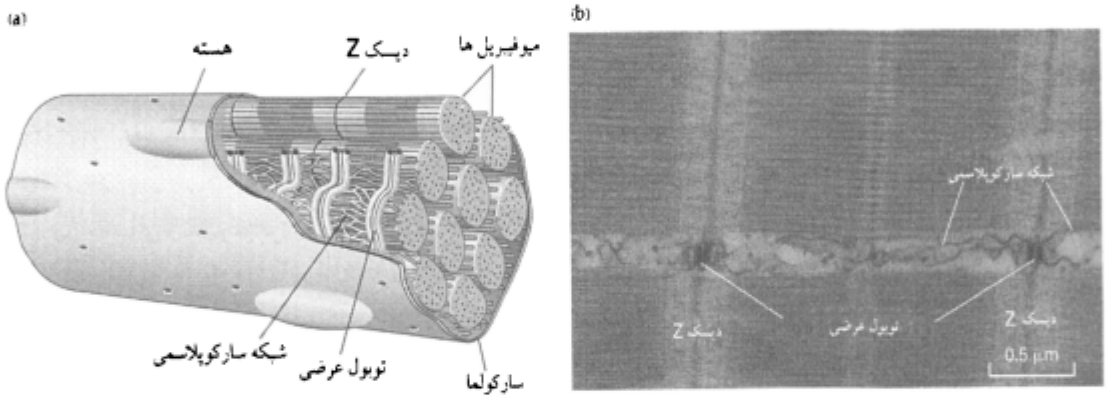


▲ شکل ۱۷ـ۳۰ (شکل رنگی) مدل رشته-لغزنده انقباض عضله مخطط. آرایش رشته‌های ضخیم میوزین و نازک اکتین در حال استراحت در دیاگرام بالایی نشان داده شده است. در حضور ATP و Ca^{2+}، سرهای میوزین رشته ضخیم بر روی رشته‌های نازک به سمت انتهای (+) گام برمی‌دارند. به دلیل این‌که رشته‌های نازک در دیسک Z ثابت شده‌اند (ارغوانی)، حرکت میوزین باعث کشیده شدن رشته‌های اکتین به سمت مرکز سارکوما می‌شود و در نتیجه باعث کوتاه‌تر شدن طول آن می‌گردد که در دیاگرام پایین نشان داده شده است.

انقباضی، معروف به حلقه انقباضی، یک ساختار گذار می‌باشد که در بخش استوایی سلول در حال تقسیم تشکیل می‌شود و سلول را در میانه قطب‌های دوک میتوزی در برمی‌گیرد (شکل ۱۷ـ۳۴a). وقتی که تقسیم سیتوپلاسمی (سیتوکینز) ادامه می‌یابد، قطر حلقه انقباضی کاهش می‌یابد و سلول با عمیق‌تر کردن شیار شکافی به دو بخش تقسیم می‌گردد. رنگ‌آمیزی سلول‌های در حال تقسیم با آنتی‌بادی‌های ضد میوزین I و میوزین II نشان می‌دهد که میوزین II



◀ **شکل ۱۷ـ۳۱ پروتئین‌های ضمیمه موجود در عضله اسکلتی.** به منظور پایدار شدن رشته‌های اکتین، CapZ به انتهای (+) رشته نازک در دیسک Z و تروپومودولین به انتهای (-) متصل می‌گردد. پروتئین بزرگ تیتین از میان رشته‌های ضخیم عبور می‌کند و به دیسک Z متصل می‌شود. نبولین به زیرواحدهای اکتین متصل می‌گردد و طول رشته نازک را تعیین می‌کند.

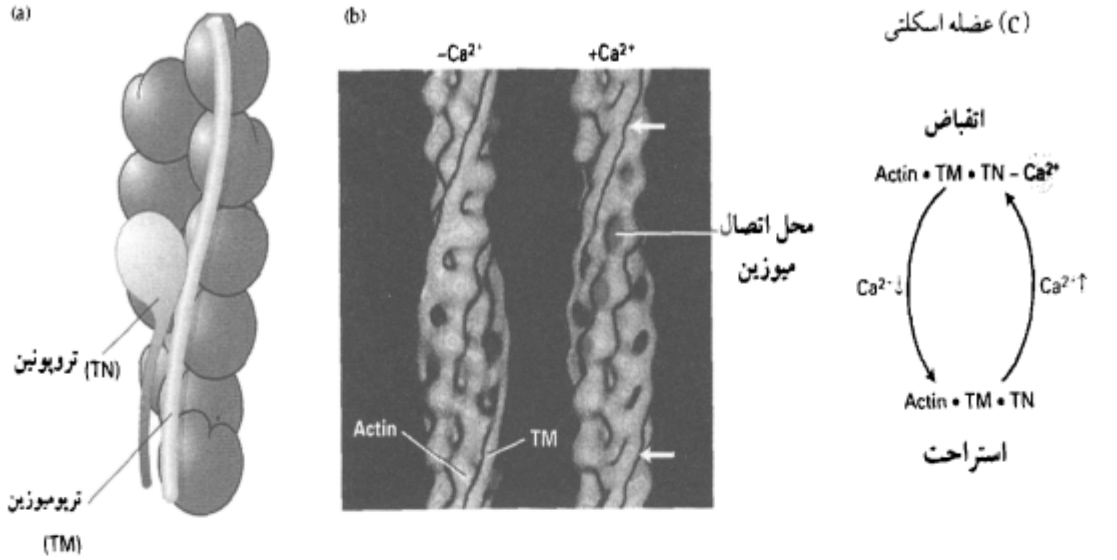


▲ **شکل ۱۷ـ۳۲ (شکل رنگی) شبکه سارکوپلاسمی سطح Ca^{2+} آزاد را در میوفیبریل‌ها تنظیم می‌کند.** (a) وقتی که پیام عصبی سلول عضلانی را تحریک کرد، پتانسیل عمل از طریق توبول عرضی (زردرنگ) که با غشای پلاسمایی (سارکولما) در ارتباط است، به داخل انتقال می‌یابد و منجر به آزاد شدن Ca^{2+} از شبکه سارکوپلاسمی مجاور به میوفیبریل‌ها می‌گردد. (b) میکروگراف الکترونی مقطع عرضی عضله اسکلتی، ارتباط نزدیک شبکه سارکوپلاسمی با فیبرهای عضلانی را نشان می‌دهد.

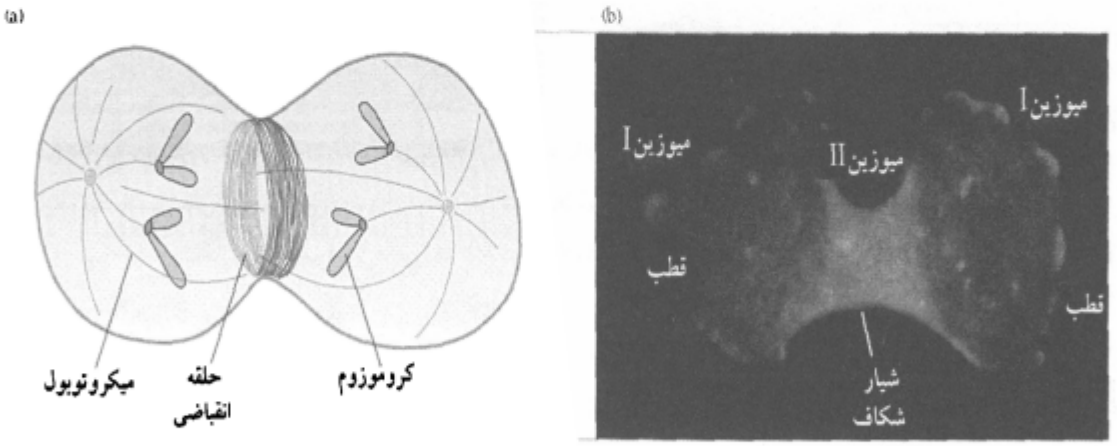
در حلقه انقباضی قرار گرفته است در حالی که میوزین I در نواحی دیستال، مکانی که آن کورتکس اکتین را به غشای پلاسمایی متصل می‌کند، قرار گرفته است (شکل ۱۷ـ۳۴b). این مکان‌گیری نشان می‌دهد که میوزین II، نه میوزین I، در سیتوکینز نقش دارد. سلول‌هایی که در آنها ژن میوزین II حذف شده است قادر به انجام سیتوکینز نمی‌باشند. در عوض، این سلول‌ها به دلیل مهار شدن سیتوکینز با تقسیم هسته‌ای تشکیل سین‌سیتیوم چندهسته‌ای می‌کنند.

مکانیسم‌های وابسته به میوزین باعث تنظیم انقباض در عضله صاف و سلول‌های غیر عضلانی می‌گردند

عضله صاف یک بافت تخصصی یافته است که از سلول‌های انقباضی تشکیل شده است و در بسیاری از اندام‌های درونی یافت می‌شود. به عنوان مثال، عضله صاف در رگ‌های خونی به منظور تنظیم فشار خون، در روده به منظور حرکت غذا و در مجاری هوایی شُش‌ها وجود دارد. سلول‌های عضله صاف دارای دسته‌جات انقباضی شبیه به دسته‌جات انقباضی بزرگ موجود در سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشند. دستگاه انقباض عضله صاف و تنظیم آن یک مدل ارزشمندی در درک تنظیم فعالیت میوزین موجود در سلول‌های غیر عضلانی می‌باشد. همان‌طور که دیدیم، انقباض عضله اسکلتی توسط کمپلکس تروپومیوزین ـ تروپونین متصل به رشته نازک اکتین تنظیم می‌گردد و به دو حالت انقباضی (در حضور Ca^{2+}) و استراحت (در غیاب Ca^{2+}) یافت می‌شود. در مقابل، انقباض عضله صاف توسط



▲ **شکل ۳۳ـ۱۷ (شکل رنگی) تنظیم وابسته به Ca^{2+} رشته نازک انقباض عضله اسکلتی.** (a) مدل کمپلکس تنظیمی تروپومیوزین - تروپونین موجود در روی رشته نازک. تروپونین یک کمپلکس پروتئینی چماقی‌شکل است که به مولکول طویل تروپومیوزین α - هلیکسی متصل می‌شود. (b) بازسازی‌های سه بُعدی میکروسکوپ الکترونی از مارپیچ تروپومیوزین (زردرنگ) موجود بر روی یک رشته نازک عضله حلزون. وقتی که غلظت Ca^{2+} افزایش می‌یابد، تروپومیوزین از حالت استراحت (چپ) به یک موقعیت جدید (فلش) تغییر می‌کند که باعث انقباض (راست) می‌گردد. این حرکت باعث آشکار شدن محل‌های اتصال میوزین (قرمزرنگ) در سطح اکتین می‌گردد. (تروپونین در این‌جا نشان داده نشده است، اما در هر دو حالت به تروپومیوزین متصل است). (c) خلاصه‌ای از تنظیم انقباض عضله اسکلتی توسط اتصال Ca^{2+} به تروپونین.



▲ **شکل تجربی ۳۴ـ۱۷ (شکل رنگی) آنتی‌بادی‌های فلورسنت مکان میوزین I و میوزین II را در هنگام سیتوکینز نشان می‌دهد.** (a) دیاگرامی از سلول در حال سیتوکینز که در آن دوک میتوزی (میکروتوبول‌ها به رنگ سبز و کروموزوم‌ها به رنگ آبی) و حلقه انقباضی با رشته‌های اکتین (قرمزرنگ) نشان داده شده است. (b) میکروگراف فلورسانس از آمیب دیکتیوستلیوم در حال سیتوکینز نشان می‌دهد که میوزین II (قرمز) در شیار تقسیم (شکاف) متمرکز شده است در حالی که میوزین I (سبز) در قطبین سلول قرار گرفته است. سلول با آنتی‌بادی‌های ویژه میوزین I و میوزین II رنگ‌آمیزی شده است و هر آنتی‌بادی به رنگ فلورسنت ویژه‌ای وصل شده است.

چرخه میوزین II بین دو حالت روشن و خاموش تنظیم می‌گردد. چرخه میوزین II و بنابراین انقباض عضله صاف و سلول‌های غیر عضلانی در پاسخ به بسیاری از مولکول‌های سیگنال خارج سلولی تنظیم می‌گردد.

انقباض عضله صاف مهره‌داران اساساً توسط مسیری که طی آن **زنجیره سبک تنظیمی میوزین (LC)** متصل به دُمین گردن میوزین

II (شکل ۲۰b-۱۷ را ملاحظه کنید) متحمل فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون می‌گردد، تنظیم می‌شود. زمانی که زنجیر سبک تنظیمی فسفریله نیست، چرخه میوزین ATPase II غیر فعال است. وقتی که LC تنظیمی توسط **آنزیم میوزین LC** کیناز فسفریله گردید، عضله صاف منقبض می‌گردد (شکل ۳۵-۱۷). به دلیل این‌که این آنزیم توسط Ca^{2+} فعال می‌گردد، سطح سیتوزولی Ca^{2+} میزان فسفریلاسیون LC و بنابراین انقباض را تنظیم می‌کند. تنظیم وابسته به Ca^{2+} فعالیت میوزین LC کیناز توسط پروتئین انتقالی Ca^{2+} (کالمودولین) تنظیم می‌گردد (شکل ۳۱-۳ را ملاحظه کنید). کلسیم ابتدا به کالمودولین متصل می‌شود و سپس کمپلکس کالمودلین / Ca^{2+} به میوزین LC کیناز متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند. این نوع تنظیم بر پایه انتشار Ca^{2+} در فواصل بیشتر از فاصله موجود در سارکومر و عمل پروتئین کینازها می‌باشد. در نتیجه انقباض عضلات صاف بسیار کندتر از عضلات اسکلتی می‌باشد. به دلیل این‌که در این تنظیم میوزین درگیر است به آن **تنظیم رشته ضخیم** گفته می‌شود.

نقش میوزین LC کیناز فعال شده را می‌توان با ریز تزریق کردن یک مهارکننده کینازی به داخل سلول‌های عضله صاف اثبات کرد. اگرچه مهارکننده باعث مهار افزایش سطح Ca^{2+} سیتوزولی نمی‌شود، که به دنبال ورود یک پیام عصبی اتفاق می‌افتد، سلول‌هایی که مهارکننده دریافت کرده‌اند منقبض نمی‌شوند.

بر خلاف عضلات اسکلتی که تنها با پالس‌های عصبی منقبض می‌شود، سلول‌های عضله صاف و سلول‌های غیر عضلانی علاوه بر تحریکات عصبی توسط انواع زیادی از پیام‌های خارجی نیز تنظیم می‌گردند. برای مثال، نورابی‌نفرین، آنژیوتنسین، اندوتلین، هیستامین و مولکول‌های پیام دیگر می‌توانند انقباض عضله صاف را تنظیم یا القا کنند و یا این‌که با به راه انداختن انواع مسیرهای انتقال پیام باعث ایجاد تغییرات در شکل و اتصال سلول‌های عضلانی گردند. بسیاری از این مسیرها باعث افزایش سطح Ca^{2+} سیتوزولی می‌گردند؛ همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد، افزایش کلسیم با فعال کردن میوزین LC کیناز منجر به تحریک فعالیت میوزین می‌گردد (شکل ۳۵-۱۷ را ملاحظه کنید). همان‌طور که در زیر بحث خواهد شد، مسیرهای دیگری Rho کیناز را فعال می‌کنند که مستقل از Ca^{2+}، با فسفریلاسیون زنجیره سبک تنظیمی میوزین آن را فعال می‌کند.

وزیکول‌های دارای میوزین V بر روی رشته‌های اکتین حمل می‌گردند

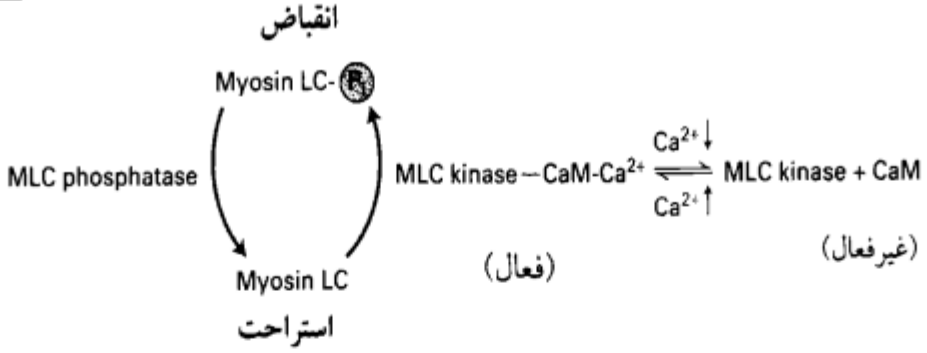
بر خلاف نقش انقباضی رشته‌های میوزین II، خانواده میوزین V موتورهای میوزینی بسیار پیشرونده هستند که تابه حال شناخته شدند و در حمل محموله بر روی رشته‌های اکتین نقش دارند. در فصل بعد بحث می‌کنیم که چگونه آنها با موتورهای میکروتوبولی در انتقال اندامک‌ها همکاری می‌کنند. اگرچه درباره نقش آنها در سلول‌های پستانداری کمتر شناخته شده است، اما موتورهای میوزین V مهم هستند: وجود نقص در پروتئین میوزین V خاصی می‌تواند منجر به بیماری‌های شدید مانند تشنجات گردد (شکل ۲۲-۱۷).

به‌طور تجربی درباره موتورهای میوزین V در سیستم‌های ساده و دسترس‌پذیر مثل مخمر جوانه‌زن زیاد شناخته شده است. این موجودات مهم توسط جوانه زدن رشد می‌کنند و به منظور حمل مواد سنتز شده جدید به جوانه در حال رشد نیاز به ماشین ترشحی دارند (شکل ۳۶a-۱۷). میوزین V با سرعت ۳μm/s وزیکول‌های ترشحی را بر روی رشته‌های اکتینی به محل جوانه حمل می‌کند. با وجود این، این عمل تنها عملکرد میوزین Vها در مخمر نمی‌باشد. در مرحله آخر چرخه سلولی، تمام اندامک‌ها بایستی بین سلول‌های مادری و دختری توزیع گردند. به‌طور قابل ملاحظه‌ای میوزین Vها در مخمر به عنوان یک سیستم انتقالی در جدا شدن بسیاری از اندامک‌ها مثل پراکسیزوم‌ها، لیزوزوم‌ها (یا واکوئل‌ها)، شبکه اندوپلاسمی و شبکه **ترانس**-گلژی و حتی میکروتوبول‌ها و بعضی از RNAها به محل جوانه‌زنی عمل می‌کند (شکل ۳۶b-۱۷). اگرچه مخمر از میوزین V و رشته‌های اکتین قطبی شده به منظور انتقال بسیاری از اندامک‌ها استفاده می‌کند، سلول‌های جانوری که طویل‌تر هستند، به منظور انتقال این اندامک‌ها به فواصل نسبتاً طویل از میکروتوبول‌ها و موتورهای آنها استفاده می‌کنند. ما این نوع مکانیسم انتقالی را در فصل بعد بحث خواهیم کرد.

شاید بتوان کاربرد وسیع میوزین Vها در جلبک‌های سبز بزرگ مثل نیتلا[1] و کارا[2] مشاهده کرد. در این سلول‌های بزرگ که به طول ۲cm هم می‌رسند، سیتوزول به‌طور سریع با سرعت تقریباً ۴/۵$\frac{mm}{min}$ در محیط داخلی سلول گردش می‌کند (شکل ۳۷-۱۷). این **جریان سیتوپلاسمی**، یک مکانیسم مهم و اساسی در توزیع متابولیت‌های سلولی مخصوصاً در سلول‌های بزرگ مثل سلول‌های گیاهی و آمیب‌ها می‌باشد.

1- Nitella

2- Chara



▲ **شکل ۳۵ـ۱۷ مکانیسم فسفریلاسیون میوزین در تنظیم انقباض عضله صاف.** در عضله صاف مهره‌داران فسفریلاسیون زنجیر سبک (LC) تنظیمی میوزین توسط میوزین LC کیناز وابسته به Ca^{2+} باعث فعال شدن عمل انقباض می‌گردد. در غلظت‌های 10^{-6}> میوزین LC کیناز غیر فعال است، و یک میوزین LC فسفاتاز که برای فعال شدن به Ca^{2+} وابسته نیست، میوزین LC را دفسفریله کرده و باعث استراحت عضلانی می‌گردد.

بررسی‌های دقیق اجزا موجود در سیتوزول روان، مثل شبکه اندوپلاسمی (ER) و سایر وزیکول‌های محصور با غشاء نشان می‌دهد که سرعت جریان سیتوزولی از مرکز سلول (سرعت صفر) به سمت محیط سلولی افزایش می‌یابد. وجود این شیب سرعت را می‌توان به سادگی به علت قرارگیری موتور تولیدکننده آن در غشاء توجیه کرد. در میکروگراف‌های الکترونی، دسته‌جات رشته‌های اکتین بصورت امتداد یافته در طول سلول و در عرض کلروپلاست‌های غشایی مشاهده می‌شوند. به دسته‌جات اکتین، وزیکول‌هایی از شبکهٔ ER متصل شده است. تودهٔ سیتوزولی توسط میوزین متصل به بخش‌هایی از ER مجاور رشته‌های اکتین به جلو رانده می‌شود. سرعت جریان سیتوزول در نیتلا حداقل ۱۵ برابر بیشتر از حرکت ایجادشده توسط سایر میوزین‌های شناخته شده می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۷

حرکات ناشی از میوزین

■ در عضلات اسکلتی، میوفیبریل‌های انقباضی از هزاران واحد تکراری بنام سارکومر تشکیل شده‌اند. هر سارکومر از دو نوع رشته در هم رفته تشکیل شده است: رشته‌های ضخیم میوزین و رشته‌های نازک اکتین (شکل ۲۹-۱۷ را ملاحظه کنید).

■ در انقباض عضله اسکلتی رشته‌های ضخیم میوزین طی فرایند وابسته به ATP بر روی رشته‌های اکتین می‌لغزند. طی این عمل سارکومر و در نتیجه میوفیبریل کوتاه می‌شود (شکل ۳۰-۱۷ را ملاحظه کنید).

■ انتهای (+) رشته‌های نازک اکتین در عضلات اسکلتی توسط CapZ و انتهای (-) توسط تروپومدولین پایدار می‌گردد. دو پروتئین بزرگ بنام‌های نبولین که به رشته‌های نازک و تیتین که به رشته‌های ضخیم متصل شده است نیز در سازماندهی عضله اسکلتی مشارکت می‌کنند.

■ انقباض عضله اسکلتی با تنظیم رشته‌های نازک صورت می‌گیرد. وقتی که سطح Ca^{2+} آزاد پایین است عضله در حالت استراحت است و تروپومیوزین میانکنش میوزین و F-اکتین را مهار می‌کند. وقتی که سطح Ca^{2+} آزاد افزایش می‌یابد، کمپلکس تروپونین که به تروپومیوزین چسبیده است به Ca^{2+} متصل می‌شود و تروپومیوزین را جابجا می‌کند. طی این فرایند مکان‌های اتصالی میوزین در رشته اکتین هویدا می‌شود و انقباض رخ می‌دهد (شکل ۳۳-۱۷ را ملاحظه کنید).

■ سلولهای صاف و غیرعضلانی دارای دسته‌جات انقباضی می‌باشند که از رشته‌های اکتین و میوزین تشکیل شده است. سازماندهی این دسته‌جات انقباضی شبیه به عضله اسکلتی می‌باشد اما نظم آنها کمتر است.

■ دسته‌جات انقباضی توسط تنظیم رشته‌های ضخیم عمل می‌کنند. زنجیره سبک میوزین توسط میوزین کیناز فسفریله می‌شود. این فسفریلاسیون میوزین را فعال کرده و در نتیجه باعث انقباض می‌گردد. وقتی که غلظت Ca^{2+} آزاد افزایش می‌یابد میوزین کیناز با اتصال Ca^{2+}- کالمودولین فعال می‌گردد (شکل ۳۵-۷ را ملاحظه کنید).

■ میوزین V با گام زدن بر روی رشته‌های اکتین باعث جابجایی محموله بار می‌شود.

۷ـ۱۷ مهاجرت سلولی: پیام‌رسانی و کموتاکسی

ما مکانیسم‌های مختلف مورد استفاده توسط سلول‌ها ـ از تجمع

رشته‌های اکتین و تشکیل دسته‌جات و شبکه‌های رشته اکتین تا انقباض دسته‌جات اکتین و میوزین و انتقال اندامک‌ها توسط مولکول‌های میوزینی در امتداد رشته‌های اکتین به منظور ایجاد حرکت را بررسی نمودیم. بسیاری از این مکانیسم‌های پایه فرایندهای مهم سلول‌ها در تولید نیروی لازم برای مهاجرت می‌باشند. **مهاجرت سلولی** حاصل هماهنگی جنبش‌های تولید شده در بخش‌های مختلف سلول و چرخه اندوسیتوزی هدفدار می‌باشد.

مطالعه مهاجرت سلولی در بسیاری از زمینه‌های زیست‌شناسی و پزشکی مهم می‌باشد. به عنوان مثال، یک ویژگی مهم تکامل جانوران مهاجرت سلول‌های خاص در مسیرهای از قبل تعیین شده می‌باشد. سلول‌های اپی‌تلیال یک جانور بالغ به منظور ترمیم زخم و سلول‌های سفید خون به محل عفونت مهاجرت می‌کنند. مهاجرت آهسته اما ممتد سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای در امتداد پُرزهای روده و مهاجرت ثابت و آهسته در سلول‌های اندوتلیال که رگ‌های خونی را می‌پوشانند، مشاهده شده است. مهاجرت سلول‌های سرطانی از بافت‌های طبیعی خودشان در متاستاز رخ می‌دهد.

مهاجرت سلولی با تشکیل یک زائده برجسته بزرگ غشایی در لبه پیشرو سلول آغاز می‌گردد. میکروسکوپی ویدئویی نشان داد که ویژگی مهم این حرکت سلولی پلیمریزاسیون اکتین در غشاء می‌باشد. در سلول‌های مهره‌داران رشته‌های اکتین در لبه پیشرو سریعاً با برقراری اتصالات عرضی موجب تشکیل دسته‌ها و شبکه‌های اکتین در ناحیه زائده‌مانند به نام **لاملی‌پودیوم**[1] می‌شود. در برخی موارد تظاهرات غشایی باریک و انگشتی‌شکل به نام **فیلوپودیا**[2] از لبه پیشرو خارج می‌شود. این ساختار با تشکیل تماس‌های پایدار با سطوح زیرین مانع از برگشت غشاء لبه پیشرو می‌گردند. در این بخش، فرایندهای مختلف تولیدکننده نیرو که باعث حرکت سلول‌ها در یک سطح می‌شوند را بررسی می‌کنیم. هم‌چنین نقش مسیرهای پیام‌رسان را در هماهنگی و یک‌پارچه کردن اعمال اسکلت سلولی مورد توجه قرار خواهیم داد.

در مهاجرت سلولی نیروی تولید شده، با اتصالات سلول و بازیافت غشایی هماهنگ می‌شود

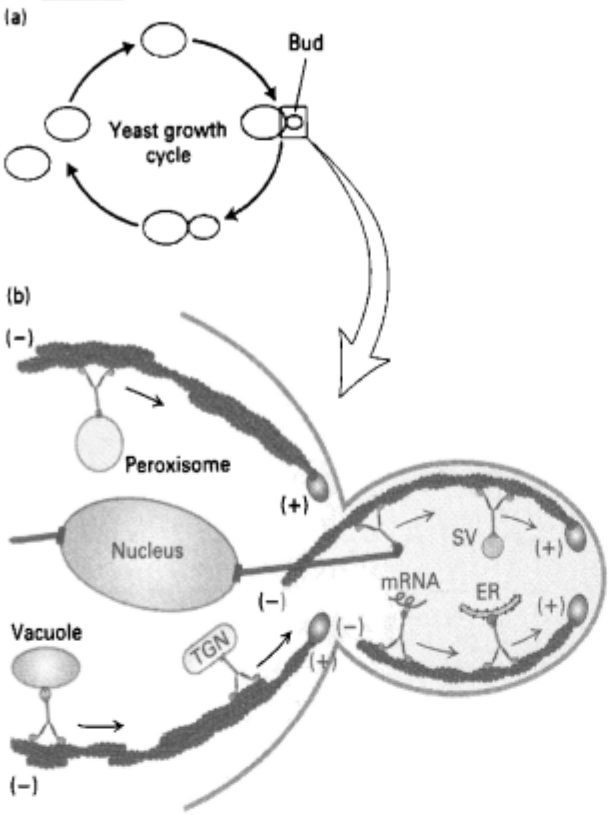
فیبروبلاست متحرک (سلول بافت پیوندی) یک سری اتفاقات متوالی شاخص کشیدگی و ظهور زائده غشایی، اتصال به بستر، جریان رو به جلو سیتوزولی و انقباض در عقب سلول را نشان می‌دهد (شکل ۱۷ـ۳۸). اگرچه ما همه این اتفاقات را به‌طور جداگانه شرح می‌دهیم اما همه آنها به‌طور خودبه‌خودی و هماهنگ رخ می‌دهند.

ایجاد زائده غشایی[3] شبکه رشته‌های اکتین در لبه پیشرو یک نوع موتور سلولی است که طی مکانیسم وابسته به پلیمریزاسیون اکتین، غشا را به جلو می‌راند. این مکانیسم بسیار شبیه به جلو رفتن **لیستریا** توسط پلیمریزاسیون اکتین می‌باشد (شکل ۱۷ـ۳۹b؛ در مورد لیستریا به شکل ۱۷ـ۱۷c رجوع شود). بنابراین در غشا لبه پیشرو، اکتین توسط کمپلکس Arp2/3 فعال شده، هسته‌ای شده و رشته‌ها در مجاورت غشای پلاسمایی طویل می‌شود. وقتی که شبکه اکتین نسبت به بستر تثبیت شد، در طی طویل شدن رشته اکتین غشای پیشین به جلو رانده می‌شود. به‌طور مشابه **لیستریا** بر روی دم اکتین در حال پلیمریزاسیون، که آن هم در سیتوپلاسم تثبیت شده است، حرکت می‌کند. نوسازی اکتین و بنابراین تریدمیلینگ، مانند دم‌های کشیده شده لیستریا، توسط پروفیلین و کوفیلین هدایت می‌گردد (شکل ۱۷ـ۳۹d). همان‌طور که در مرحله ❹ شکل ۱۷-۳۸ آورده شده است غشا جدید لبه پیشرو احتمالاً با اگزوسیتوز غشا اندوسیتوزشده در عقب سلول جایگزین می‌گردد.

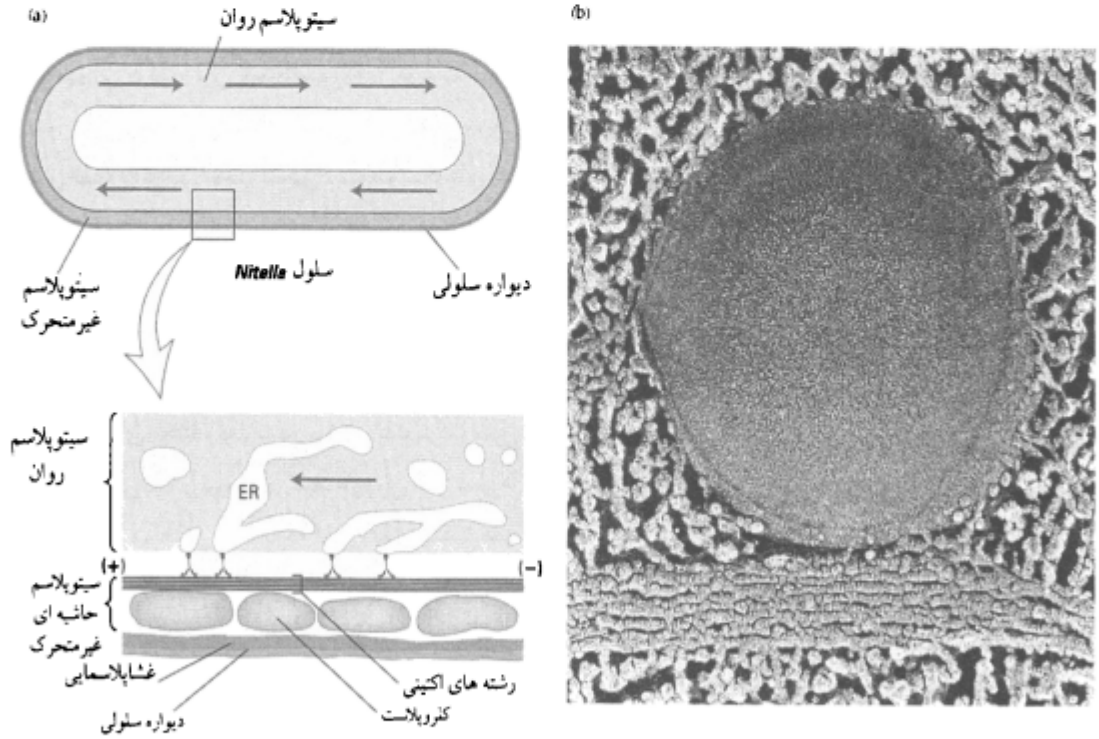
اتصالات سلول ـ سوبسترا. وقتی که در غشا زایده به وجود آمد و اسکلت سلولی تشکیل شد، غشاء پلاسمایی به‌طور محکم به پایه متصل می‌گردد. میکروسکوپ مروری[4] نشان می‌دهد که دسته‌های اکتین لبه پیشرو در ساختارهایی به نام اتصالات کانونی لنگر انداخته‌اند (شکل ۱۷ـ۳۹c). این نوع اتصال دو هدف دارد: اولاً مانع برگشت لاملا می‌گردد و ثانیاً باعث اتصال سلول به پایه می‌گردد تا سلول به جلو حرکت کند. با توجه به اهمیت اتصالات کانونی و تنظیم آنها در حرکت سلولی، شگفت‌انگیز نخواهد بود هر گاه آنها سرشار از مولکول‌های درگیر در مسیرهای انتقال پیام باشند. اتصالات کانونی با جزئیات بیشتر در فصل ۱۹ که میانکش‌های سلول ـ ماتریکس بحث می‌گردد، بررسی خواهد شد.

پروتئین‌های غشایی که در چسبندگی‌ها نقش دارند **اینتگرین** نامیده می‌شود. این مولکول‌ها، مولکول‌های چسبنده سلولی هستند که میانکش‌های سلول ـ ماتریکس را وساطت می‌کند. این پروتئین‌ها دارای یک دُمین خارج سلولی که به اجزای ویژه ماتریکس خارج سلولی مثل فیبرونکتین و کلاژن متصل می‌شود و یک دُمین سیتوپلاسمی می‌باشند که آنها را به اسکلت سلولی اکتین متصل می‌کند (شکل ۱۷ـ۳۹ و فصل ۱۹). سلول در بخش جلویی به پایه متصل می‌گردد و هنگامی که به سمت جلو مهاجرت می‌کند، اتصالات به سمت عقب سلول کشیده می‌شوند. زمانی که اتصالات به

1- Camellipodium
2- Filopodia
3- Membrane extension
4- Time-lapse



◀ شکل ۳۶-۱۷ میوزین‌های V محموله‌های مختلفی را در مخمر جوانه‌زدن حمل می‌کنند. (a) مخمر ساکارومایسس سرویزیا (در تولید نان، آبجو و شراب استفاده می‌شود) با جوانه‌زدن رشد می‌کند. وزیکول‌های ترشحی به سمت جوانه منتقل می‌شوند. جوانه تقریباً به اندازه سلول مادر متورم می‌شود. سپس سلول‌ها متحمل سیتوکینز می‌شوند و تقسیم می‌گردند. (b) دیاگرام یک جوانه متوسط نشان می‌دهد که چگونه میوزین‌های V وزیکول‌های ترشحی (SV) را به سمت پایین رشته‌های اکتین تشکیل شده توسط فرمین‌ها (رنگ ارغوانی) که در انتها و گردن جوانه قرار گرفته است، منتقل می‌کنند. میوزین‌های V هم‌چنین در جداسازی اندامک‌هایی مثل واکوئل (در مخمر لیزوزوم)، پراکسیزوم‌ها، شبکه اندوپلاسمی (ER)، شبکه ترانس گلژی (TGN) و حتی mRNAهای خاصی و انتقال آنها به سمت جوانه نقش دارند. هم‌چنین میوزین V به انتهای میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود تا هسته را برای میتوز آماده سازد.



▲ شکل ۳۷-۱۷ (شکل رنگی) جریان سیتوپلاسمی در جلبک بزرگ استوانه‌ای‌شکل. (a) مرکز سلول Nitella با یک واکوئل بزرگ لبریز از آب که توسط لایه‌ای از سیتوپلاسم روان (فلش‌های آبی‌رنگ) محصور شده اشغال شده است. لایه غیر متحرک سیتوپلاسم حاشیه‌ای با کلروپلاست‌هایی که درست در زیر غشا پلاسمایی قرار گرفته‌اند، پُر شده است (در شکل پایین بزرگ‌نمایی شده است). در بخش داخلی این لایه دسته‌جات رشته‌های ثابت اکتین (قرمزرنگ)، دارای قطبیت یکسانی هستند. پروتئین موتوری (آبی‌رنگ)، میوزین V گیاهی، بخشی از شبکه اندوپلاسمی (ER) را بر روی رشته‌های اکتین حمل می‌کند. حرکت شبکه ER باعث به جلو راندن کل سیتوپلاسم ویسکوز، مانند اندامک‌هایی که در شبکه ER به دام انداخته شده‌اند، می‌گردند. (b) میکروگراف الکترونی سیتوپلاسم حاشیه‌های، یک وزیکول بزرگ را نشان می‌دهد که به یک دسته از رشته اکتین متصل شده است. این وزیکول که بخشی از شبکه ER می‌باشد، به رشته‌های ثابت اکتین می‌چسبد و توسط یک پروتئین موتوری میوزین بر روی آن حرکت می‌کند.

شکل ۳۸ـ۱۷ مراحل مهاجرت سلولی. حرکت سلول با ظهور یک یا چند لاملی‌پودیا از لبه پیشرو سلول آغاز می‌گردد: ❶: بعضی از لاملی‌پودیاها توسط اتصالات کانونی به بستر متصل می‌شوند ❷. سپس توده سیتوپلاسم سلولی با انقباض بخش عقبی سلول به جلو رانده می‌شود ❸. لبه جلویی سلول تا زمانی که دم سلول از بستر جدا شده، به صورت متصل به بستر باقی می‌ماند. در این چرخه که اساس آن اسکلت سلولی می‌باشد، چرخه اندوسیتوزی، غشا و اینتگرین‌ها را از عقب سلول به درون کشیده و آن را به بخش جلویی سلول انتقال می‌دهد تا مجدداً در تشکیل اتصالات جدید مورد استفاده قرار دهد ❹.

عقب‌سلول رسیدند، اینتگرین‌ها توسط اندوسیتوز به درون سلول کشیده می‌شوند و به کمک اسکلت سلولی میکروفیلامنتی و میکروتوبولی (فصل ۱۸) به سمت جلو سلول برده می‌شوند تا در آنجا اتصالات جدید را به وجود بیاورند (شکل ۳۸ـ۱۷ را ملاحظه کنید، مرحله ❹). این چرخه مولکول‌های چسبنده در مهاجرت سلولی مشابه مسیر حرکت تانک است که در آن تانک به کمک جابجایی زنجیر چرخ‌های خود به جلو حرکت می‌کند.

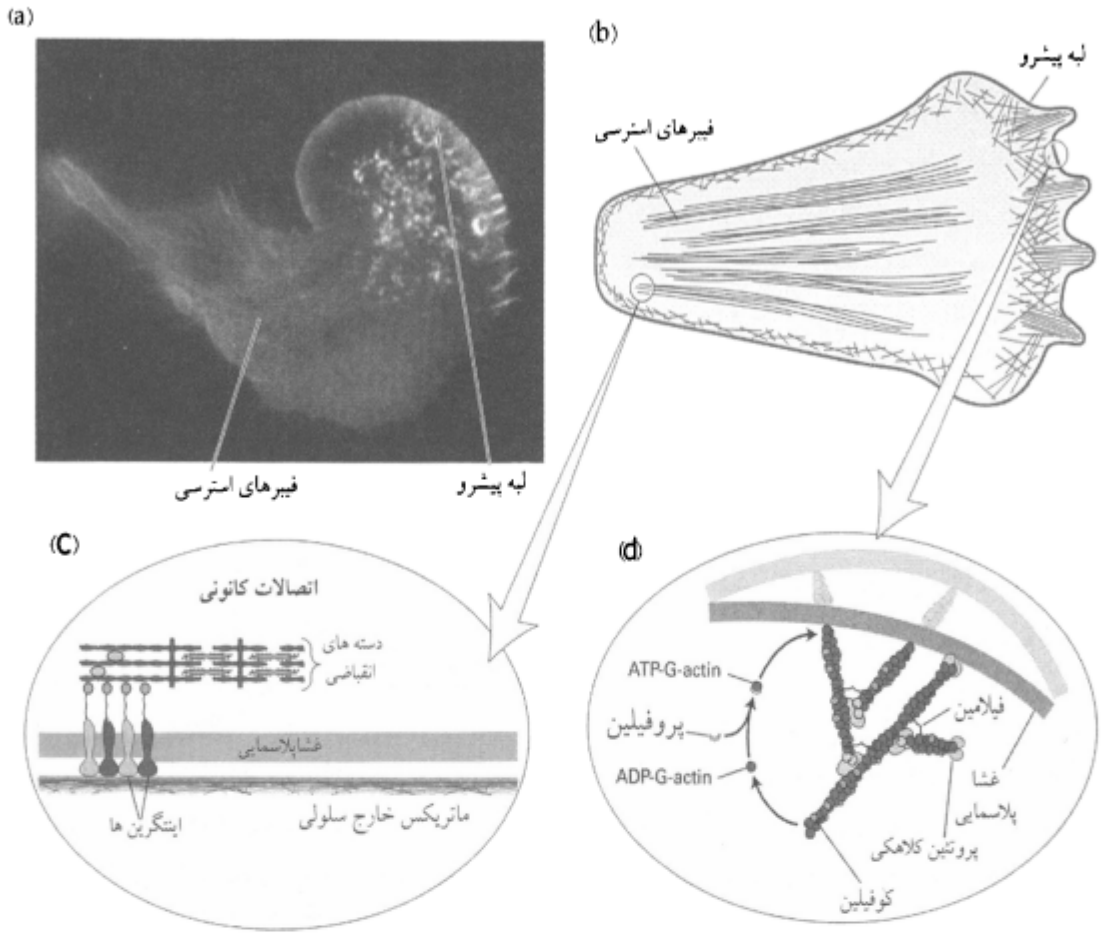
جابه‌جایی تنه سلول. بعد از این‌که قسمت جلویی سلول متصل شد، محتویات تنه سلول به جلو رانده می‌شود (به شکل ۳۸ـ۱۷ رجوع شود). اعتقاد بر این است که هسته و سایر اندامک‌های محصور در اسکلت سلولی طی انقباض کورتیکالی وابسته به میوزین در بخش عقبی سلول این انقباض به جلو رانده می‌شود. این عمل مانند فشار به بخش پایینی تیوب خمیر دندان به منظور خارج کردن خمیر دندان می‌باشد. به دلیل وجود میوزین II ـ کورتکس عقبی سلول این عمل بیشتر تأیید می‌گردد.

شکست اتصالات سلولی. سرانجام در مرحله آخر مهاجرت سلولی، اتصالات کانونی عقب سلول شکسته می‌شود. اینتگرین‌ها بازیافت می‌شود و دم آزاد به جلو آورده می‌شود. در میکروسکوپ نوری، مشاهده شده است که دم اتصالات خود را از دست می‌دهد ـ احتمالاً با انقباض فیبرهای استرسی در دم یا توسط کشیدگی الاستیکی ـ و بخش کوچکی از غشا خود را در برخی مواقع به صورت متصل به پایه بر جای می‌گذارد.

توانایی سلول در حرکت، مربوط به تعادل بین نیروهای مکانیکی تولید شده توسط اسکلت سلولی و نیروهای مقاومت‌کننده تولید شده توسط اتصالات سلولی می‌باشد. هر گاه سلول‌ها به‌طور محکم به سطح متصل شوند یا اصلاً به سطح متصل نشوند، نمی‌توانند حرکت کنند. این رابطه را می‌توان با اندازه‌گیری سرعت حرکت سلول‌هایی که سطوح متفاوتی از اینتگرین‌ها را بیان می‌کنند، اثبات کرد. آزمایشات نشان می‌دهد که در اتصالات متوسط و مهاجرت سریع و در اتصالات بیشتر و کمتر به ترتیب کم‌ترین و کندترین مهاجرت صورت می‌گیرد. بنابراین حرکت سلولی ناشی از نیروهای کشسانی است که از طرف سلول به پایه اعمال می‌گردد.

پروتئین‌های کوچک اتصالی Rac, Cdc42, GTP و Rho سازمان دهی اکتین را کنترل می‌کنند

ویژگی مهم و برجسته سلول در حال حرکت، قطبیت آن می‌باشد: سلول دارای عقب و جلو می‌باشد. وقتی که سلولی می‌چرخد، لبه‌های پیشرو در مسیر جدیدی تشکیل می‌گردد. هر گاه این زائده‌ها در همه مسیرها تشکیل گردد، سلول قادر نخواهد بود مسیر جدیدی برای حرکت پیدا کند. به منظور حفظ حرکت سلولی در یک مسیر ویژه، سلول نیاز به پیام‌هایی دارد که رخدادهای جلو و عقب سلول را هماهنگ کند، در واقع پیام به سلول اعلام کند که بخش جلویی آن کدام سمت است. درک چگونگی هماهنگی این رخدادها از مطالعات انجام شده توسط فاکتورهای رشد به دست آمده است.



▲ **شکل ۳۹-۱۷ ساختارهای اکتینی درگیر در حرکت سلولی.** (a) مکان‌یابی اکتین در فیبروبلاستی که GFP-اکتین بیان می‌کند. (b) دیاگرام گروه‌های مختلف میکروفیلامنت‌ها که در مهاجرت سلولی درگیر هستند. شبکه رشته‌های اکتین در لبه پیشرو باعث راندن سلول به جلو می‌شوند. فیبرهای انقباضی موجود در کورتکس سلول تنه سلول را به جلو می‌راند و فیبرهای استرسی که در انتها به اتصالات کانونی متصل شده‌اند نیز هنگام از بین رفتن اتصالات عقب سلول، توده داخلی تنه سلول را می‌کشند. (c) در ساختمان اتصالات کانونی اتصال پایانه‌های فیبرهای استرسی بواسطه اینتگرین‌ها به ماتریکس خارج سلولی نقش دارد. اتصالات کانونی هم‌چنین دارای مولکول‌های پیام‌رسان بسیاری می‌باشد که در حرکت سلولی مهم هستند. (d) شبکه دینامیک اکتین لبه پیشرو توسط کمپلکس Arp2/3 هسته‌ای می‌شود و فاکتورهای مشابهی به منظور کنترل تشکیل و تجزیه رشته‌های اکتین در دم **لیستریا** درگیر هستند (شکل ۱۷-۱۷ را ملاحظه کنید).

فاکتورهای رشد، مانند فاکتور رشد اپی‌درمی (EGF) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) به گیرنده‌های سطحی ویژه سلولی متصل شده (فصل ۱۴) و سلول را وادار به حرکت و سپس تقسیم می‌کند. برای مثال، در یک زخم، پلاکت‌های خونی وقتی در معرض کلاژن ماتریکس خارج سلولی لبه زخم قرار می‌گیرد، فعال شده و باعث لخته شدن خون می‌گردد. پلاکت‌های فعال شده هم‌چنین PDGF ترشح می‌کنند که باعث جذب فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال به محل زخم می‌گردند تا باعث ترمیم زخم گردند. بخشی از این فرایند را می‌توان در *In Vitro* مشاهده کرد. هر گاه شما سلول‌ها را در یک ظرف کشت رشد بدهید، بعد از محروم‌سازی آنها از فاکتورهای رشد، مقداری فاکتور رشد تازه به آن اضافه کنید، سلول‌ها در عرض یک یا دو دقیقه با تشکیل زائده‌های موج‌دار غشایی[1] به آن پاسخ می‌دهند. زائده‌های موج‌دار غشایی بسیار شبیه به لاملی‌پودیاهای سلول‌های مهاجرت‌کننده می‌باشند: آنها نتیجه فعال‌سازی ماشین کنترل‌کننده تشکیل اکتین می‌باشند. دانشمندان می‌دانند که فاکتورهای رشد به گیرنده‌های بسیار ویژه سطح سلولی متصل می‌گردند و باعث القا مسیر انتقال پیام در سطح داخلی غشای پلاسمایی می‌گردند (فصل ۱۵). اما چگونگی ارتباط آن با ماشین اکتینی هنوز مشخص نیست. سپس دانشمندان دریافتند که مسیر

1- Membrane ruffles

انتقال پیام، Rac که پروتئینی از اعضای فوق خانواده GTPaseهای پروتئین‌های منسوب به Ras[1] می‌باشد، را فعال می‌سازند (فصل ۱۵). Rac یکی از اعضای خانواده پروتئینی می‌باشد که سازمان‌دهی میکروفیلامنتی را تنظیم می‌کنند؛ اعضای دیگر این خانواده پروتئینی Cdc42 و Rho می‌باشد. متأسفانه به دلیل تاریخچه کشف آنها، این خانواده پروتئینی روی هم رفته «پروتئین‌های Rho» نامیده شدند و اعضای آن Rac, Cdc42 و Rho می‌باشد. به منظور درک این‌که این پروتئین‌ها چگونه عمل می‌کنند، ما ابتدا مسیرهای عملکردی پروتئین‌های کوچک اتصالی GTP[2] را مرور می‌کنیم.

مانند همه GTPaseهای کوچک فوق خانواده Rac,Ras ,Cdc42 و Rho به صورت سویچ‌های مولکولی، در حالت متصل به GDP بصورت غیر فعال و در حالت متصل به GTP بصورت فعال عمل می‌کنند (شکل ۴۰ـ۱۷) در حالت متصل به GDP آنها در سیتوپلاسم به صورت غیر فعال و متصل به پروتئینی به نام مهارکننده جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین (GDI) یافت می‌شوند. فاکتورهای رشد می‌توانند با اتصال به گیرنده خودشان و فعال نمودن آن پروتئین‌های تنظیمی ویژه متصل به غشا، فاکتورهای تعویض‌کننده نوکلئوتید گوانین (GEFFs)، را روشن کنند که آن هم پروتئین‌های Rho موجود در غشا را با آزادسازی آنها از GDI و کاتالیز تعویض GDP با GTP فعال سازد. پروتئین Rho فعال متصل به GTP به غشای پلاسمایی، محلی که آن به **پروتئین‌های عمل‌گر** متصل می‌شود و پاسخ‌های زیستی را آغاز می‌کند، متصل شده است. GTPase کوچک، تا هنگامی که پروتئین‌های فعال‌کننده GTPase (GAPs)، GTP را به GDP هیدرولیز نکرده، بصورت فعال باقی می‌ماند. یک روش مهم به منظور درک عملکرد پروتئین‌های Rho وارد کردن پروتئین‌های جهش یافته که یا در حالت فعال Rho-GTP یا در حالت غیر فعال Rho-GDP به داخل سلول‌ها می‌باشد. به GTPase کوچک جهش یافته که در حالت فعال قفل شده است، پروتئین **فعال ـ غالب**[3] گفته می‌شود. این پروتئین فعال ـ غالب به‌طور ثابت به مولکول‌های عمل‌گر متصل می‌شود و بنابراین می‌توان نتیجه زیستی آن را بررسی کرد. به‌طور جایگزین، می‌توان یک پروتئین جهش یافته متفاوت که **منفی ـ غالب**[4] است، به داخل سلول وارد کرد. این پروتئین‌ها غالباً به GDP متصل می‌شوند و توسط GEF نمی‌توانند فعال شوند. بنابراین پروتئین منفی ـ غالب با مسیر انتقال پیام تداخل ایجاد می‌کند، در نتیجه می‌توان بررسی کرد که کدام فرایندها مهار شده‌اند.

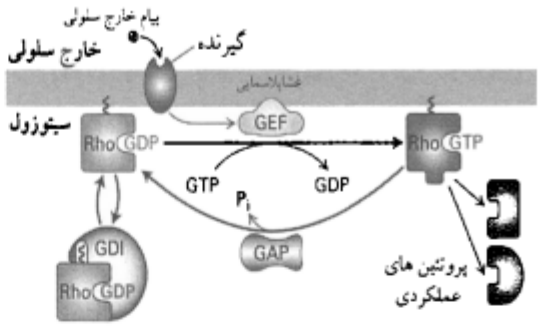
Rac, Cdc42 و Rho در تنظیم سازمان‌دهی میکروفلامنت‌ها نقش دارند زیرا مشخص شده است که استفاده از جهش یافته‌های فعال ـ غالب حتی در غیاب فاکتورهای رشد اثرات ژرفی بر روی اسکلت سلولی داشته است. مشخص شده است که Cdc42 فعال ـ غالب منجر به ظهور فیلوپودیا، Rac فعال ـ غالب منجر به ظهور زائده‌های موجی‌شکل غشایی، و Rho فعال ـ غالب منجر به تشکیل فیبرهای استرسی که در انقباض نقش دارند، می‌گردند (شکل ۴۱ـ۱۷). چگونه می‌توان توضیح داد که Rac فعال ـ غالب و فاکتور رشد که هر دو آنها باعث تحریک تشکیل زائده‌های موجی‌شکل غشایی می‌گردند، از طریق یک مسیر انتقال پیام عمل می‌کنند؟ هر گاه تحریک فاکتور رشد منجر به فعال شدن Rac گردد، با وارد کرد پروتئین Rac منفی ـ غالب به داخل سلول بایستی توانایی فاکتور رشد در تحریک تشکیل زائده‌های موجی‌شکل غشایی مهار گردد. این نتیجه دقیقاً مشاهده و کشف شد. با به کارگیری این روش و سایر استراتژی‌های بیوشیمیایی، محققان مسیرهای پیام‌رسانی که در آن Rac, Cdc42 و Rho نقش داشتند را کشف و تعیین کردند (شکل ۴۲ـ۱۷).

در بسیاری از مسیرهایی که این پروتئین‌ها تنظیم‌کننده هستند، پروتئین‌های دیگری نیز نقش دارند که ما با آنها آشنا هستیم. بنابراین فعال شدن Cdc42 باعث تحریک تشکیل اکتین توسط Arp2/3 به واسطه فعال کردن WASp می‌گردد که منجر به تشکیل فیلوپودیا می‌شود. فعال شدن Rac نیز از طریق فعالسازی WAVE و تحریک Arp2/3 باعث تجمع رشته‌های شاخه‌دار اکتین در لبه پیشرو می‌شود (شکل ۴۲ـ۱۷). فعال شدن Rho حداقل دارای دو اثر می‌باشد: آن می‌تواند تشکیل F-اکتین بدون شاخه را به واسطه مسیر فرمین فعال سازد یا این‌که به واسطه یک پروتئین کیناز فعال شده با Rho، فسفریلاسیون زنجیره سبک میوزین و فسفریلاسیون و مهار فسفاتاز زنجیره سبک میوزین، فعال شدن میوزین II غیر عضلانی را القا کند. در هر دو عمل Rho کیناز، سطح فسفریلاسیون زنجیره سبک میوزین افزایش می‌یابد و بنابراین فعالیت میوزین و انقباض افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۴۲ـ۱۷ نشان داده شده است، هر سه پروتئین Rac, Cdc42 و Rho در مسیرهای فعال‌سازی و مهاری نقش دارند.

1- Ras-related proteins

2- GTP-binding proteins

3- Dominant-active 4- Dominant-negative

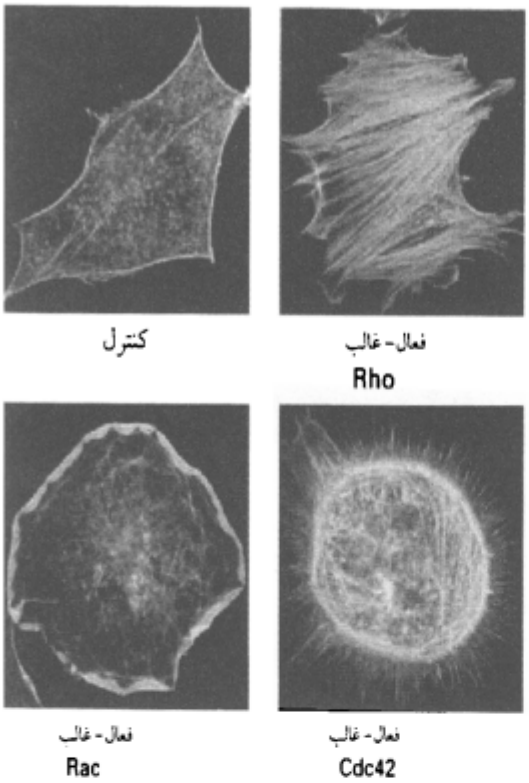


▲ شکل ۴۰-۱۷ خانواده Rho و GTPaseهای کوچک سویچ‌های مولکولی هستند که توسط پروتئین‌های ضمیمه تنظیم می‌گردند. پروتئین‌های Rho به صورت متصل به GDP که با پروتئین معروف به GDI (مهارکننده جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین) تشکیل کمپلکس داده است، آنها را در سیتوزول بصورت غیر فعال نگه می‌دارد. مسیرهای پیام‌رسانی غشایی پروتئین‌های Rho را به غشا آورده و به واسطه عمل GEF (فاکتور مبادله نوکلئوتید گوانین) GDP را با GTP مبادله می‌کند و آنها را فعال می‌سازد. GTP-Rho فعال متصل به غشا سپس می‌تواند به پروتئین‌های عمل‌گر متصل گردد و باعث ایجاد تغییراتی در اسکلت سلولی اکتین گردد. پروتئین Rho تا زمانی که GAP (پروتئین فعال‌کننده GTPase) بر روی آن عمل نکرده و آن را به سیتوپلاسم برگشت نداده، به حالت فعال Rho-GTP باقی می‌ماند.

در مهاجرت سلولی، تنظیم هماهنگی بین Rac, Cdc42 و Rhoوجود دارد

چگونه هر یک از این پروتئین‌های کوچک متصل‌شونده به GTP در تنظیم مهاجرت سلولی نقش دارند؟ برای پاسخ به این سئوال محققان یک آزمایش ترمیم زخم در *In Vitro* ابداع کرده‌اند (شکل ۴۳a-۱۷). سلول‌ها در یک پتری‌دیش با فاکتورهای رشد کاشته می‌شوند و به آنها اجازه داده می‌شود تا زمان تشکیل تک‌لایه محکم که در آن تقسیم متوقف می‌شود، رشد کنند. سپس تک‌لایه سلول با یک سوزنی خراشیده می‌شود و یک خط از سلول‌ها برداشته می‌شود تا یک «زخم» دارای لبه آزاد از سلول‌ها ایجاد گردد. سلول‌ها در لبه خودشان حذف سلول‌های مجاور را حس می‌کنند و در پاسخ به ترکیبات ماتریکس خارج سلولی که در سطح ظرف قرار داده می‌شود، به سمت نواحی تهی زخم حرکت می‌کنند تا آنجا را پر کنند. به منظور انجام این کار، آنها خودشان به سمت ناحیه آزاد می‌چرخند، ابتدا تولید لاملی‌پودیوم کرده و سپس در آن جهت حرکت و مهاجرت می‌کنند. با این روش می‌توان القا مهاجرت سلولی هدف‌دار و جهت‌دهی شده را در *In Vitro* مطالعه کرد.

با استفاده از این سیستم، محققان Rac منفی ـ غالب را به داخل سلول‌های موجود در لبه زخم وارد کردند و چگونگی تأثیر آن را بر



▲ شکل ۴۱-۱۷ Rho, Rac و Cdc42 فعال ـ غالب باعث القا ساختارهای متفاوت دارای اکتین می‌شود. به منظور بررسی اثرات Rac، Rho و Cdc42 فعال، به فیبروبلاست‌های محروم از فاکتور رشد پلاسمیدهایی تزریق شد تا نسخه‌های فعال ـ غالب این سه پروتئین بیان گردد. سپس سلول‌ها با فالوئیدین فلورسنت که اکتین رشته‌ای را رنگ می‌کند، تیمار گردید. Rac فعال ـ غالب تشکیل زائده‌های غشایی را القا می‌کند، در حالی که Rho فعال ـ غالب فیبرهای استرسی انقباضی و Cdc42 فعال-غالب فیلوپودیا را القا می‌کند.

روی توانایی سلول‌ها در مهاجرت و پُر کردن زخم بررسی کردند. اگرچه Rac برای فعال سازی کمپلکس Arp2/3 و تشکیل لاملی‌پودیوم ضروری است، اما اگر سلول‌ها تشکیل این ساختارها را ندهند و نتوانند مهاجرت کرده و زخم را ترمیم کنند تعجب‌آور نخواهد بود (شکل ۴۳c-۱۷). در زمانی که Cdc42 منفی غالب به داخل سلول‌های موجود در لبه زخم وارد گردید یک نتیجه بسیار جالب به دست آمد: آنها لبه پیشرو تشکیل دادند ولی در جهت صحیح نتوانستند آرایش یابند ـ در واقع، آنها در جهت‌های تصادفی مهاجرت می‌کنند. این بررسی نشان داد که Cdc42 برای تنظیم قطبیت کلی سلول حیاتی می‌باشد. مطالعه بر روی مخمر (که در آن Cdc42 اولین بار کشف شد)، تک‌لایه سلول ـ زخمی شده، سلول‌های اپی‌تلیال و نورون‌ها نشان داد که Cdc42 تنظیم‌کننده اصلی در سیستم‌های

مختلف می‌باشد. در بخشی از این تنظیم در جانوران، آن به عملگر خودش (Par-6) متصل شود. این پروتئین یک پروتئین قطبی می‌باشد که در نماتودها (اولین بار در این موجود کشف گردید)، نورون‌ها و سلول‌های اپی‌تلیالی عمل می‌کند.

چنین مطالعاتی یک مدل عمومی از چگونگی کنترل مهاجرت سلولی را مطرح می‌کند (شکل ۴۴-۱۷). پیام‌های محیطی به Cdc42 منتقل می‌شود و آن به سلول جهت می‌دهد. در بخش جلویی سلول جهت‌گیری شده، فعالیت Rac بالا می‌باشد تا باعث القا تشکیل لبه پیشرو گردد؛ فعالیت Rho در بخش عقب سلول زیاد است تا ساختارهای انقباضی تشکیل شود و ماشین انقباضی وابسته به میوزین I فعال شود. لازم است توجه شود که نواحی مختلف سلول دارای میزان متفاوتی از Rac, Cdc42 و Rho فعال می‌باشد، بنابراین این تنظیم‌کننده‌ها به‌طور موضعی در سلول کنترل می‌شوند. به دلیل این‌که بعضی از این G- پروتئین‌های کوچک می‌توانند به صورت آنتاگونیست عمل کنند، بخشی از این تنظیم فضایی رخ می‌دهد. برای مثال Rho فعال می‌تواند مسیرهای را تحریک کند که باعث غیر فعال شدن Rac می‌گردد. این عمل تضمین می‌کند که هیچ ساختار لبه پیشرو در عقب سلول تشکیل نگردد.

سلول‌های مهاجرت‌کننده توسط مولکول‌های کموتاکتیک جهت‌دهی می‌شوند

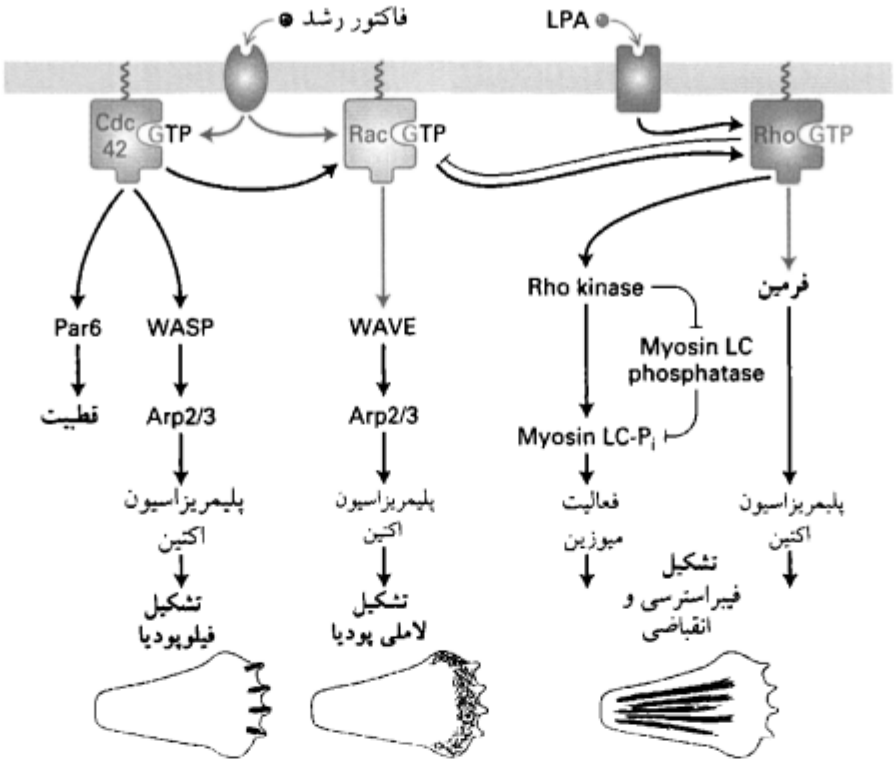
تحت شرایط ویژه، پیام‌های شیمیایی خارج سلولی مسیر حرکت سلول را مشخص می‌کنند. در برخی موارد، حرکت سلولی توسط مولکول‌های نامحلول موجود در بستر، که در فوق توسط آزمایش ترمیم زخم شرح داده شد، هدایت می‌شود. در مواردی هم، سلول مولکول‌های محلولی را حس می‌کند و آنها را در جهت شیب غلظتی دنبال می‌کند که این فرایند به **کموتاکسی** معروف است. به عنوان مثال، لوکوسیت‌ها (سلول‌های سفید خون) توسط یک تری‌پپتید مترشحه از بسیاری از سلول‌های باکتری به سمت محل عفونت راهنمایی می‌گردند. در یک مثال دیگر، در هنگام تکوین عضله مهاجرت میوبلاست‌ها را به مکان‌های مناسب در جوانه‌های اعضای بدن راهنمایی می‌کند (فصل ۲۲). یکی از مثال‌هایی که به خوبی مطالعه شده است، مهاجرت آمیب **دیکتیواستلیوم** به سمت غلظت در حال افزایش cAMP که یک فاکتور کموتاکسی خارج سلولی در این موجود هست، می‌باشد (شکل ۴۵a-۱۷). با رسیدن آمیب به منبع cAMP، آن به صورت یک توده بی‌شکل تجمع یافته و سپس به جسم بارور تمایز می‌یابد.

علی‌رغم وجود انواع متنوعی از مولکول‌های کموتاکسی - قندها، پپتیدها، متابولیت‌های سلولی، لیپیدهای دیواره سلولی یا غشایی - همه آنها با یک مکانیسم مشابهی عمل می‌کنند: آنها به گیرنده‌های سطح سلول متصل می‌شوند، مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی را فعال می‌سازند و اسکلت سلولی را به واسطه فعال یا مهار پروتئین‌های اتصالی به اکتین تغییر می‌دهند. آنچه که خیلی تعجب‌آور است این است که تنها ۲٪ اختلاف غلظت مولکول‌های کموتاکسی بین جلو و عقب سلول در جهت‌دهی مهاجرت سلولی کافی می‌باشد. یک مورد تعجب‌آور دیگر این است که مسیرهای انتقال پیام استفاده شده در کموتاکسی با وجود تقریباً یک بیلیون سال تکامل در آمیب دیکتیوستلیوم و لوکوسیت‌های انسانی حفظ شده است.

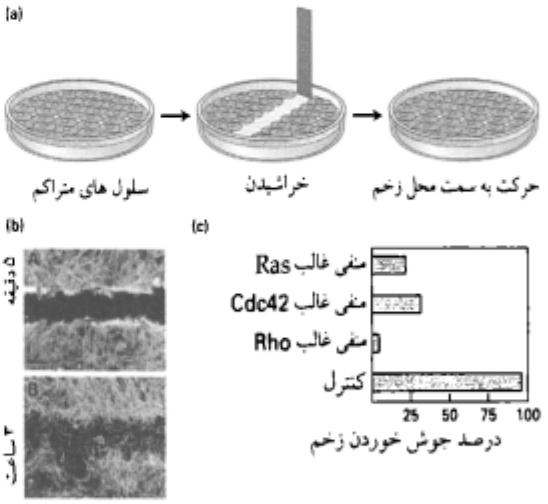
شیب کموتاکسی باعث القا تغییراتی در سطح فسفوایـنوزیتید بخش‌های جلویی و عقب سلول می‌گردد

به منظور بررسی این‌که آمیب دیکتیوستلیوم چگونه شیب کموتاکسی را حس می‌کند، محققان گیرنده‌های سطح سلولی برای cAMP خارج سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی پایین‌دست را مطالعه کرده‌اند. قبل از این‌که جزئیات این مسیرها را بحث کنیم، لازم است بدانیم که چگونه چنین سیستمی ممکن است کار کند. هر گاه سلولی بتواند ۲٪ اختلاف غلظت را در طول خودش حس کند، غیر ممکن است که به سادگی تجمع اکتین را در بخش جلویی ۲٪ بیشتر از بخش عقبی خود فعال سازد تا باعث جهت‌گیری حرکت خود گردد. در نتیجه بایستی یک مکانیسم‌هایی وجود داشته باشد که این اختلاف جزیی در پیام خارجی را به اختلاف بزرگ بیوشیمیایی داخلی تبدیل کند. یکی از راه‌های انجام این کار این است که سلول پیام موجود در جلو و عقب خودش را کسر کند و تنها به **اختلاف سیگنال** پاسخ دهد. این روش، یک روش مورد قبول برای انجام این کار می‌باشد. به منظور درک این فرایند، محققان غلظت ترکیبات فعال مسیر پیام‌رسانی را بررسی کردند تا دریابند که تقویت پیام در کجا رخ می‌دهد.

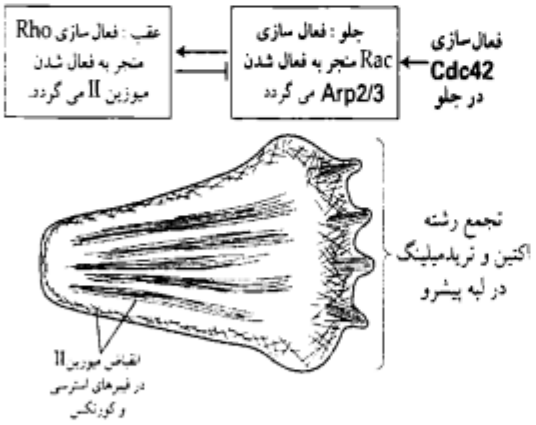
میکروگراف‌های گیرنده‌های cAMP نشان دار شده با پروتئین فلورسانس سبز (GFP) نشان می‌دهد که گیرنده‌ها به‌طور نامنظم در سطح سلول آمیبی توزیع شده‌اند (شکل ۴۵b-۱۷). بنابراین شیب داخلی بایستی توسط اجزا دیگر مسیر پیام‌رسانی تولید شده باشد. به دلیل این‌که گیرنده cAMP به واسطه G- پروتئین‌های تریمر، پیام را انتقال می‌دهند (فصل ۱۶)، به منظور بررسی توزیع آنها، زیرواحدی از G- پروتئین تریمر و سایر پروتئین‌های سیگنالی پایین‌دست با



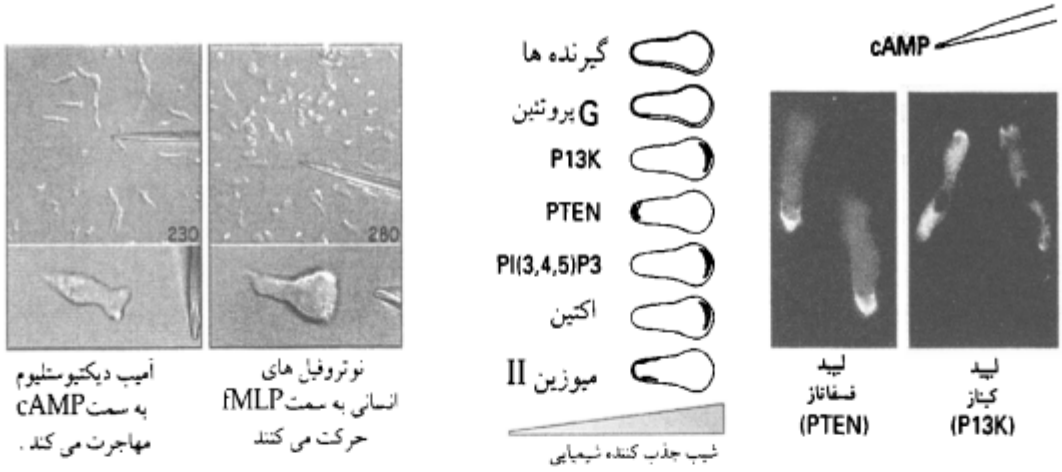
▲ **شکل ۴۲ـ۱۷ خلاصه‌ای از تغییرات القا شده توسط پیام در اسکلت سلولی اکتین.** پیام‌های ویژه توسط گیرنده‌های کوچک متصل‌شونده به GTP تشخیص داده می‌شود. سپس این پروتئین‌ها با عملگرها میانکش می‌دهند و همان‌طور که در تصویر نشان داده شده است، باعث تغییر در اسکلت سلولی می‌گردند.



▲ **شکل تجربی ۴۳ـ۱۷ به کمک آزمایش تک‌لایه سلولی زخم شده می‌توان مسیرهای پیام‌رسانی در مهاجرت سلولی جهت‌دهی شده را تعیین کرد.** (a) از سلول‌های متراکم یک‌لایه خطی خراشیده شده تا سطح سلول‌های باقی‌مانده آزاد باشد. سلول‌ها، فضای آزاد و ماتریکس خارج سلولی ظاهرشده را تشخیص دادند و طی چند ساعت آن ناحیه را پُر کردند. (b) مکان‌یابی اکتین در تک‌لایه زخم شده ۵ دقیقه و سه ساعت بعد از خراشیدن؛ سلول‌ها به ناحیه زخم شده مهاجرت کردند. (c) تأثیر Cdc42، Rac و Rho منفی ـ غالب وارد شده به داخل سلول‌های موجود در لبه زخم شده؛ تمامی آنها بر روی جوش خوردن زخم تأثیر می‌گذارند.



▲ **شکل ۴۴ـ۱۷ مشارکت Cdc42، Rac و Rho در مهاجرت سلولی.** قطبیت کلی سلول مهاجرت‌کننده، توسط Cdc42 که در جلو سلول فعال می‌شود، کنترل می‌گردد. فعال شدن Cdc42 باعث فعال شدن Rac در جلو سلول، که باعث تولید لبه پیشرو و Rho در عقب سلول، که منجر به فعال شدن میوزین II و انقباض می‌شود، می‌گردد. Rho فعال، فعال سازی Rac را مهار می‌کند و عدم تقارن دو G- پروتئین فعال را تضمین می‌کند.



▲ شکل تجربی ۴۵-۱۷ (شکل رنگی) در کموتاکسی سطح فسفواینوزیتیدهای پیام‌رسان که پیام را به اسکلت سلولی اکتین می‌رسانند، افزایش می‌یابد. (a) سلول‌های دیکتیوستلیوم به سمت پپیت حاوی cAMP مهاجرت می‌کنند (چپ)، و نوتروفیل‌های انسانی (نوعی لوکوسیت) به سمت پپیت حاوی (fMLP Met-Leu-Phe فرمیله شده)، پپتید جذب‌کننده شیمیایی باکتری، مهاجرت می‌کند (راست). در دو پانل پایین، کموتاکسی دیکتیوستیلوم و نوتروفیل، با وجود تقریباً ۸۰۰ بیلیون سال اختلاف در تکامل، به‌طور قابل ملاحظه‌ای مشابه می‌باشد. (b) خلاصه‌ای از نتایج حاصل از مطالعات انجام شده بر روی غلظت اجزا مسیرهای پیام‌رسان (سبز) در سلول‌های دیکتیوستلیوم که متحمل کموتاکسی در جهت cAMP می‌شوند. غلظت اکتین و میوزین نیز نشان داده شده است (قرمز). (c) در بخش جلویی سلول‌های مهاجرت‌کننده به سمت مواد کموتاکسی، غلظت آنزیم PI-3 کیناز که تولید [PI(3,4,5)P3] می‌کند، زیاد است در حالی که PTEN که هیدرولیزکننده [PI(3,4,5)] می‌باشد، در عقب سلول فراوان است. این نوع نحوه توزیع آنزیمی باعث می‌شود که غلظت [PI(3,4,5)P3] در جلو سلول افزایش یابد و یک نوع قطبیت در سلول به وجود آید.

اسکلتی، یک پیام پروتئینی ترشحی به نام فاکتور پراکنده[1]، GFP، نشان‌دار شد. میکروگراف‌های فلورسنت نشان داد که غلظت G-پروتئین‌های تریمر نیز نسبتاً غیر یکنواخت است. در پایین‌دست G-پروتئین‌های تریمر آنزیم PI-3 کیناز، آنزیمی که فسفولیپیدهای اینوزیتولی متصل به غشا (**فسفواینوزیتیدها**) مثل PI4,5 بیس فسفات [$PI(4,5)P_2$]، را به لیپید پیام PI3,4,5 تری‌فسفات [$PI(3,4,5)P_3$] فسفریله می‌کند، قرار دارد. (به شکل ۲۹-۱۶ رجوع شود). به‌طور قابل ملاحظه‌ای آنزیم PI-3 کیناز مثل فراورده خودش بیشتر در بخش جلوی سلول مهاجر یافت می‌شود. فسفاتاز PTEN که لیپید پیام‌رسان [$PI(3,4,5)P_3$] را به [$PI(4,5)P_2$] دفسفریله می‌کند، در دُم سلول مهاجر به‌طور فراوان یافت می‌شود (شکل ۴۵-۱۷b.c). عقیده بر این است که این نامتقارنی مطابق روش زیر به وجود آمده است. قبل از این‌که سلول شیبی را حس کند فسفاتاز PTEN بصورت یکنواخت در غشاء پلاسمایی قرار گرفته است. زمانی که سلول شیبی را «می‌بیند» PI3-کیناز کمی در جلوی سلول نسبت به عقب آن فعال می‌گردد. این عمل موجب می‌شود که میزان فسفولیپید پیام‌رسان در جلو سلول نسبتاً افزایش یابد. اتصال فسفاتاز PTEN به غشا به سطح [$PI(3,4,5)P_3$] بسیار حساس می‌باشد. بنابراین آن ترجیحاً از بخش جلو سلول حذف می‌شود. از آنجایی که این آنزیم در جلو سلول اثر کمتری بر روی دفسفریلاسیون [$PI(3,4,5)P_3$] و در عقب سلول در دفسفریلاسیون آن مؤثرتر است، بنابراین حاصل این اثرات ایجاد نابرابری [$PI(3,4,5)P_3$] در جلو و عقب سلول می‌باشد. بنابراین، فسفاتاز PTEN در کسر پس زمینه‌ای[2] ضروری برای سلول نقش دارد تا سلول بتواند شیب سطحی جذب‌کننده‌های شیمیایی[3] را حس کند.

حال اختلاف در غلظت موضعی [$PI(3,4,5)P_3$] به اسکلت سلولی اکتین پیام می‌فرستد تا در بخش جلویی تشکیل و در بخش عقبی باعث انقباض گردد (شکل ۴۵b-۱۷)، و سلول به سمت منبع جذب‌کننده شیمیایی حرکت می‌کند. این قطبیت سلولی در غیاب شیب جذب‌کننده‌های شیمیایی پایدار نیست، بنابراین هر گاه شیب تغییر کند، مثلاً هر گاه جذب‌کننده باکتری متحرک باشد، سلول مسیر خود را تغییر خواهد داد تا به منبع آن شیب شیمیایی برسد.

1- Scatter factor
2- Backgrund stubtraction
3- Chemoattractant

نکات کلیدی بخش ۷-۱۷

مهاجرت سلولی: پیام‌رسانی و کموتاکسی

■ در مهاجرت سلولی، ظهور لبه پیشرو غنی از اکتین در جلو سلول نقش دارد. پس تماس‌های چسبنده با سطح برقرار می‌شود که این تماس‌ها به سمت عقب سلول نیز کشیده می‌شود. سپس با انقباض بخش عقبی سلولی و از بین رفتن تماس‌های چسبنده جلو سلول، سلول به جلو حرکت می‌کند (شکل ۳۸-۱۷ را ملاحظه کنید).

■ تشکیل و عملکرد رشته‌های اکتین توسط مسیرهای پیام‌رسانی کنترل می‌گردد. در این مسیرهای پیام‌رسانی پروتئین‌های اتصالی به GTP خانواده Rho نقش دارند. Cdc42 قطبیت کلی و تشکیل فیلوپودیا، Rac تشکیل شبکه اکتینی را از طریق کمپلکس Arp2/3، Rho تشکیل رشته اکتین توسط فرمین‌ها و فرایند انقباض را از طریق تنظیم میوزین II، تنظیم می‌کنند (شکل ۴۲-۱۷ را ملاحظه کنید).

■ کموتاکسی حرکت جهت دار به سمت جذب‌کننده می‌باشد. در کموتاکسی مسیرهای پیام‌رسان باعث اختلاف در فسفواینوزیتیدهای بخش جلویی و عقبی سلول می‌گردد که این عمل به نوبه خود اسکلت اکتینی و مسیر مهاجرت سلولی را تنظیم می‌کند (شکل ۴۵-۱۷ را ملاحظه کنید).

چشم‌اندازی به آینده

در این فصل مشاهده کردیم که سلول‌ها دارای مکانیسم‌های دقیق برای آرایش فضایی و زمانی، نوسازی و اتصال میکروفیلامنت‌ها به غشاها دارند. تحلیل‌های بیوشیمیایی پروتئین‌های اتصالی اکتین و محتوای پروتئینی به دست آمده از توالی کل ژنوم باعث شد که گروه‌های مختلف پروتئین‌های متصل‌شونده به اکتین شناسایی شوند. به منظور درک دقیق این که چگونه این گروه بزرگ پروتئینی می‌تواند ساختارهای ویژه‌ای را در یک سلول تشکیل دهد، ضروری خواهد بود که غلظت همه ترکیبات را بشناسیم و بدانیم که چگونه آنها میانکنش می‌دهند و تنظیم آنها توسط مسیرهای سیگنالی چگونه می‌باشد. اگرچه این کار به نظر کمی وحشتناک می‌رسد، اما روش‌های میکروسکوپی جدید که توانایی تشخیص مکان میانکش‌های ویژه پروتئین - پروتئین و مکان بسیاری از مسیرهای پیام‌رسان کلیدی را فراهم نموده‌اند، در پیشرفت این حوزه امیدوارکننده به نظر می‌رسد.

محتوای پروتئین بدست‌آمده از توالی‌های ژنومی هم‌چنین باعث ثبت تعداد زیادی خانواده میوزینی گردیده است که هنوز خصوصیات بیوشیمیایی بسیاری از این موتورها یا وظایف زیستی آنها مبهم و کشف نشده باقی مانده است. پیشرفت‌های تکنیکی اخیر، مانند توانایی نشان‌دار کردن موتورها با ردیاب‌های فلورسنتی مثل GFP یا مهار بیان آنها به کمک تکنولوژی RNAi، روش‌های قدرتمند در کشف عملکرد موتورها می‌باشند. با وجود این، جنبه‌های بسیار مهم موتورها مبهم باقی می‌ماند. برای مثال، موتوری که اندامکی را در طول یک رشته حمل می‌کند، بایستی ابتدا به اندامک متصل شود، سپس آن را حمل کند و در نهایت آن را در مقصد رها کند. در مورد هماهنگی این رویدادهای مختلف و این‌که چگونه این نوع موتورهای میوزینی مجدداً محموله جدیدی را برمی‌دارند، کمتر شناخته شده است.

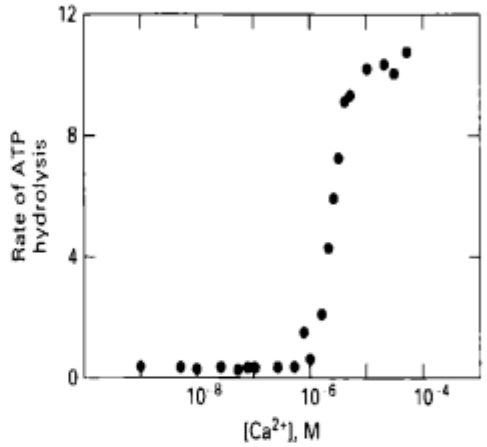
سرانجام، اگرچه ما میکروفیلامنت‌ها را صرف نظر از نوع بافت - به جز در مورد بعضی از ویژگی‌های آنها در عضلات اسکلتی و صاف - بررسی کردیم، بسیاری از پروتئین‌های اتصالی اکتین در سلول‌های خاصی بیان می‌شوند و بنابراین آرایش و سطوح نسبی آنها به منظور انجام وظایف آنها در انواع مختلف سلول‌ها طراحی شده است. در واقع زمانی که با آنالیز پروتئومیکسی بیان پروتئین‌ها ویژه سلولی آشکار شد و با این واقعیت که بسیاری از بیماری‌ها حاصل بیان ویژه بافتی پروتئین‌های اتصالی اکتینی و میوزین‌ها می‌باشد، این یک واقعیت آشکار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

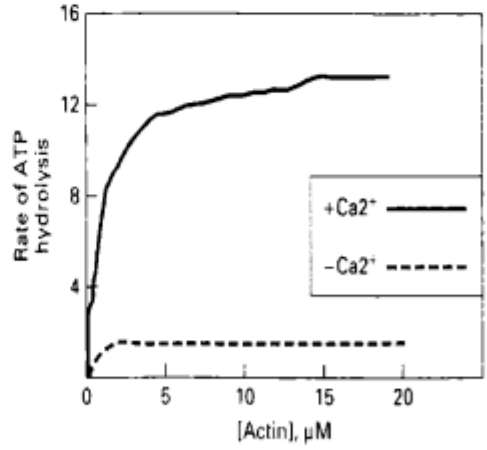
میوزین V فراوان‌ترین میوزین، غیرعضلانی می‌باشد که در انواع سلول‌ها در جابجایی محموله هایی‌مثل اندامک‌ها نقش دارد. از نظر ساختاری آن از دو زنجیره پلی‌پپتیدی مشابه تشکیل شده است که تشکیل همودایمر می‌کنند. دُمین‌های موتوری در N - ترمینال زنجیره‌ها قرار گرفته است و دارای مکان اتصالی برای ATP و اکتین می‌باشد. دُمین موتوری به ناحیه گردنی چسبیده است بطوریکه در آن شش موتیف (IQ) وجود دارد و هر کدام از آن‌ها به کالمودولین، پروتئین متصل شونده به کلسیم، متصل می‌شوند و بعد از دُمین گردنی ناحیه‌ای وجود دارد که پیچ پیچ شده و باعث دایمرشدن دو زنجیره می‌گردد و ۴۰۰ اسید آمینه باقیمانده دُمین دمی کروی (GTD) را تشکیل می‌دهد که به محموله متصل می‌شود. هر گام دمین موتوری میوزین V همیشه فعالیت کند بیشترین مقدار ATP را مصرف می‌کند و مطالعات زیادی صورت می‌گیرد تا نحوه تنظیم

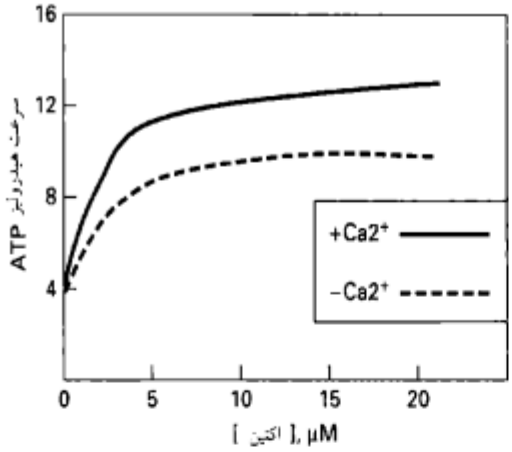
این موتور را کشف شود.

a) سرعت هیدرولیز ATP (مانند تعداد مولکول‌های ATP که در هر ثانیه به ازای هر میوزین V هیدرولیز می‌شود) با افزایش غلظت Ca^{2+} آزاد اندازه‌گیری شد. در حالت طبیعی غلظت سیتوزولی Ca^{2+} آزاد کمتر از $10^{-6}M$ است اما در نواحی خاصی از سلول بیشتر از این مقدار هم می‌تواند باشد و اغلب در پاسخ به یک حادثه پیام رسان افزایش می‌یابد. با استفاده از این داده‌ها درباره تنظیم میوزین چه اطلاعاتی می‌توان بدست آورد؟



b) در مطالعات دیگر، فعالیت ATPase ی میوزین V با افزایش غلظت F-اکتین یا در عدم حضور غلظت $10^{-6}M$ کلسیم آزاد اندازه‌گیری شد. درباره تنظیم میوزین V با استفاده از این داده‌ها چه اطلاعات دیگری می‌توان بدست آورد.





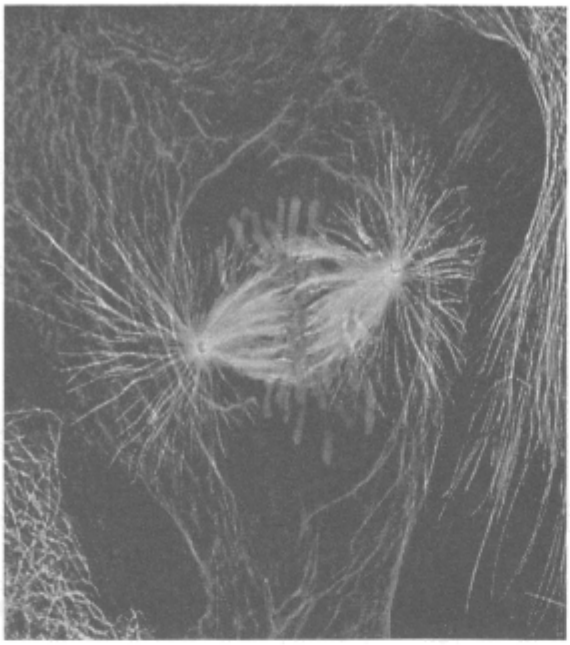
c) در مطالعات بعدی رفتار میوزین سالم V قطع شده [1]، فاقد دم کروی C- ترمینال، بررسی شد و نتایج حاصله با رفتار میوزین V مقایسه شد. به کمک این آزمایش نتیجه‌گیری شما درباره مکانیسم تنظیم میوزین V چیست؟

1- Truncated

فصل ۱۸

سازمان‌دهی و حرکت سلولی

II: میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط



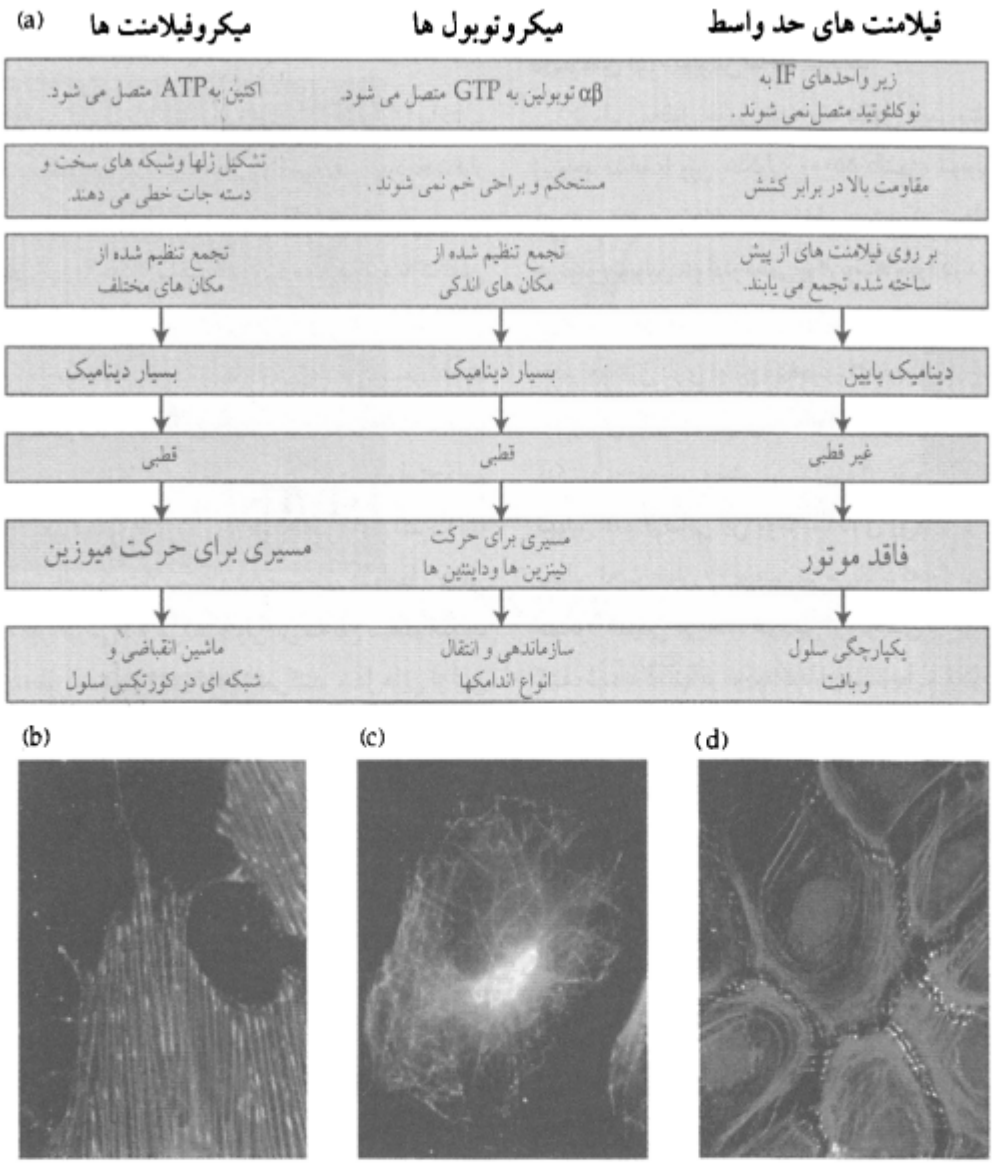
(شکل رنگی) سلول میتوزی شُش سمندر آبی که سانتروزوم‌ها (ارغوانی متمایل به قرمز)، میکروتوبول‌ها (سبز)، کروموزوم‌ها (آبی)، فیلامنت‌های حد واسط کراتین (قرمز) رنگ‌آمیزی شده است.

رئوس مطالب

۱۸ـ۱ ساختار و سازمان‌دهی میکروتوبول‌ها
۱۸ـ۲ دینامیک میکروتوبول
۱۸ـ۳ تنظیم ساختار و پویایی میکروتوبول
۱۸ـ۴ کینزین و داینئین: موتورهای پروتئینی وابسته به میکروتوبول
۱۸ـ۵ مژک و تاژک: ساختارهای سطحی وابسته به میکروتوبول
۱۸ـ۶ میتوز
۱۸ـ۷ فیلامنت‌های حد واسط
۱۸ـ۸ هماهنگی و همکاری عناصر اسکلت سلولی
۱۸ـ۹ مهاجرت سلولی: پیام‌رسانی و کموتاکسی

سه دسته عمده فیلامنت‌های سازنده اسکلت سلولی در سلول جانوری عبارتند از: میکروفیلامنت‌ها، میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط. چرا این سه نوع فیلامنت متفاوت به وجود آمده‌اند؟ به نظر می‌رسد که ویژگی‌های فیزیکی آنها احتمالاً برای عملکردهای مختلف مناسب می‌باشد. در فصل ۱۷ توضیح داده شد که چگونه فیلامنت‌های اکتین اغلب از طریق اتصالات عرضی شبکه‌های طولی فیلامنت‌های درون سلولی، ساختمان‌های انعطاف‌پذیر و پویا تشکیل می‌دهند و به عنوان مسیر حرکت گونه‌های گوناگونی از موتورهای میوزین به کار می‌روند. میکروتوبول‌ها لوله‌های محکمی هستند که می‌توانند به صورت ساختارهای منفرد وجود داشته باشند و گاهی طول آنها به ۲۰ میکرومتر هم می‌رسد و یا می‌توانند به صورت ساختارهای دسته‌مانند در ساختار مژک و تاژک وجود داشته باشند. بدلیل ساختار لوله‌ای، میکروتوبول‌ها بدون هیچ‌گونه خمیدگی قادر به تولید نیروهای کِشنده و پیش‌برنده می‌باشد. این ویژگی به توبول‌های منفرد این امکان را می‌دهد که در درون سلول به طول زیادی گسترش یافته و در کنار هم به صورت دسته‌جات منظم قرار گیرند. این خاصیت در تاژک و دوک تقسیم به وضوح قابل مشاهده می‌باشد. توانایی میکروتوبول‌ها در گسترش یافتن در مسافت‌های طولانی درون سلول، به همراه قطبیت ذاتی آنها به‌طور وسیعی مورد استفاده موتورهای وابسته به میکروتوبول‌ها می‌باشند که از میکروتوبول‌ها به عنوان مسیرهای حرکت برای حمل ونقل‌های طولانی اندامک‌ها استفاده می‌نمایند. میکروتوبول‌ها ساختارهای بسیار دینامیک هستند ـ از انتهای خود قادر به طویل شدن یا کوتاه شدن می‌باشند ـ که این امر باعث می‌شود سلول در سازمان‌دهی مجدد میکروتوبول‌های مورد نیاز خود انعطاف‌پذیری داشته باشد.

بر خلاف میکروتوبول‌ها و میکروفیلامنت‌ها، فیلامنت‌های حد واسط دارای استحکام و ثبات بالاتری بوده و به منظور افزایش مقاومت سلول در برابر کشش‌ها و فشارها ایجاد شده‌اند. فیلامنت‌های حد



◀ **شکل ۱ـ۱۸ (شکل رنگی) نگاهی اجمالی بر ویژگی‌های فیزیکی و عملکردهای سه نوع سیستم اسکلت سلولی موجود در سلول‌های جانوری.** (a) ویژگی‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی (نارنجی) و ویژگی‌های زیستی (سبز) برای هر نوع فیلامنت نشان داده شده است. میکروگراف‌ها مثال‌هایی از هر نوع فیلامنت را در سلول خاص نشان می‌دهد، اما توجه کنید که میکروتوبول‌ها ساختارهای دیگری را نیز می‌سازند و فیلامنت‌های حد واسط سطح داخلی هسته را نیز می‌پوشانند. (b) سلول‌های کشت داده شده که به خوبی گسترش یافته به منظور نمایش اکتین (سبز) و جایگاه‌های اتصال اکتین (قرمز) رنگ‌آمیزی شده‌اند. (c) موقعیت میکروتوبول‌ها (سبز) و دستگاه گلژی (زرد). به موقعیت مرکزی دستگاه گلژی که توسط میکروتوبول‌ها در آنجا تجمع یافته‌اند، توجه نمایید. (d) موقعیت سیتوکراتین‌ها (قرمز)، نوعی فیلامنت حد واسط و جزیی از ساختار دسموزوم‌ها (سبز) در سلول‌های اپی‌تلیال. سیتوکراتین‌های موجود در سلول‌های ویژه توسط دسموزوم‌ها به یکدیگر اتصال یافته‌اند.

واسط همانند اتصالات ملکولی محکم عمل کرده و این ویژگی آنها سبب پایداری ساختارهای بافت‌ها و سلول‌ها شده و بدین ترتیب در سازمان‌دهی سلولی نقش دارند. بر خلاف میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها، فیلامنت‌های حد واسط فاقد قطبیت ذاتی بوده و بنابراین هیچ نوع موتور پروتئینی شناخته نشده که از فیلامنت‌های حد واسط به عنوان مسیر حرکت خود استفاده نماید. هر چند که ما هر دو مبحث میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط را در این بخش مورد بحث قرار می‌دهیم ـ و موقعیت آنها در سیتوپلاسم کاملاً مشابه به نظر می‌رسد ـ ولی خواهیم دید که دینامیک و عملکردهای آنها بسیار متفاوت می‌باشد. خلاصه‌ای از شباهت‌ها و تفاوت‌های موجود

بین این سه سیستم اسکلت سلولی در شکل ۱ـ۱۸ نشان داده شده است.

این فصل دربرگیرنده چهار موضوع مهم می‌باشد. اول؛ ساختار و دینامیک میکروتوبول‌ها و موتورهای پروتئینی آنها را مورد بحث قرار می‌دهیم. دوم؛ بررسی خواهیم کرد که چگونه میکروتوبول‌ها و موتورهای آنها در حرکت ساختارهای ویژه مانند مژک و تاژک نقش ایفا می‌کنند. سوم؛ نقش میکروتوبول‌ها را در دوک‌میتوز ـ یک ماشین ملکولی که به‌طور دقیقی کروموزوم‌ها را از هم جدا می‌کند ـ مورد بحث و بررسی قرار می‌دهیم. نهایتاً؛ ما نقش دسته‌جات مختلف فیلامنت‌های حد واسط را در حفظ ساختمان غشا هسته و استحکام و سازمان‌دهی سلول‌ها و بافت‌ها نشان می‌دهیم. اگرچه ما میکروتوبول‌ها، میکروفیلامنت‌ها و فیلامنت‌های حد واسط را به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار می‌دهیم، ولی این سه نوع سیستم اسکلت سلولی به‌طور مستقل از هم عمل نمی‌کنند. مثال‌هایی از این همبستگی درونی این سیستم‌ها را در قسمت انتهایی این بخش مورد توجه و بررسی قرار خواهیم داد.

۱ـ۱۸ ساختار و سازمان‌دهی میکروتوبول

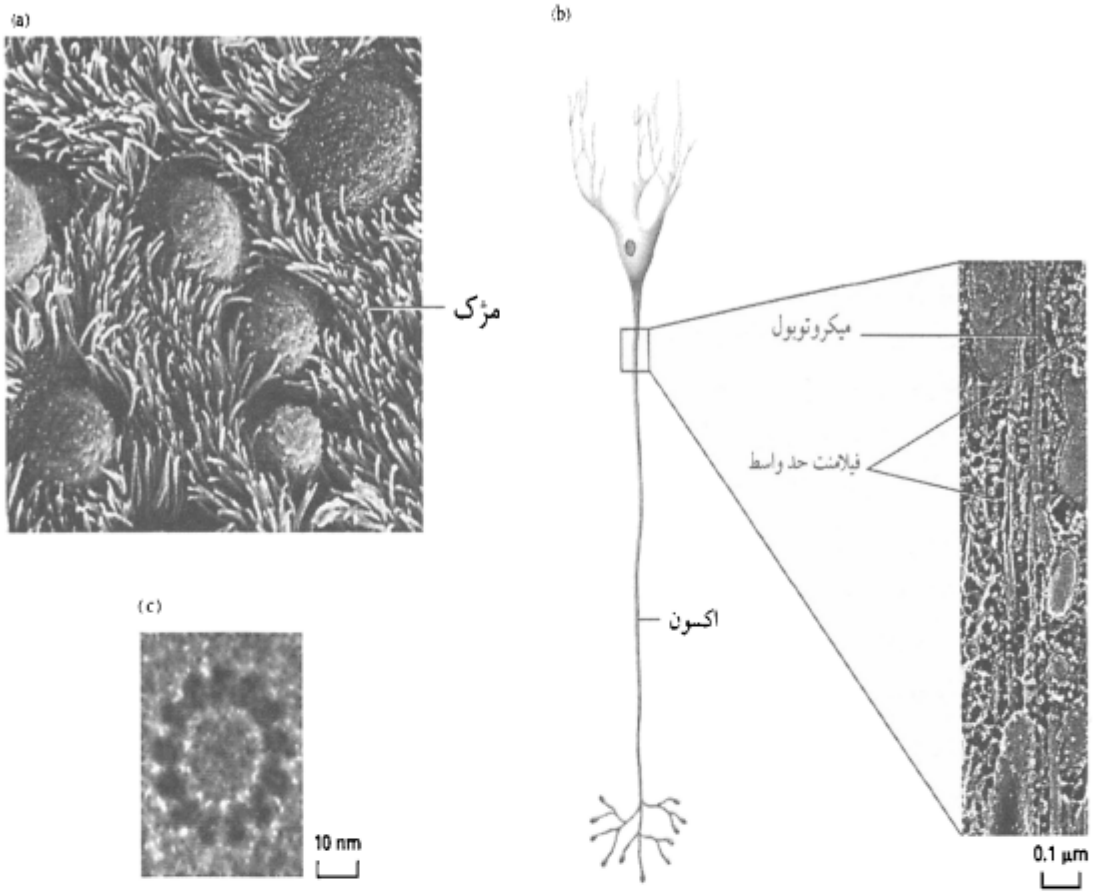
در روزهای اولیه کشف میکروسکوپ الکترونی، زیست‌شناس‌های سلولی لوله‌های طویلی را در درون سیتوپلاسم مشاهده نمودند و آنها را **میکروتوبول** نامیدند. میکروتوبول‌ها با مورفولوژی مشابه، سازنده فیبرهای دوک‌میتوزی، اجزاء آکسون‌ها و عناصر ساختاری در مژک و تاژک می‌باشند (شکل ۲ـ۱۸ a و b). بررسی‌های دقیق تمامی میکروتوبول‌های مشاهده شده در برش عرضی دلالت بر این داشت که میکروتوبول‌ها از ۱۳ واحد طولی تکرارشونده ساخته شده‌اند (شکل ۲ـ۱۸ c) که امروزه پروتوفیلامنت نامیده می‌شوند. این امر نشان می‌دهد تمامی آنها دارای یک ساختمان مشترک هستند. مشخص شد که میکروتوبول‌های استخراج شده از مغز حاوی یک پروتئین ویژه، **توبولین**، و پروتئین‌های همراه آن، **پروتئین‌های متصل به میکروتوبول**[1] (**MAPs**) می‌باشند. این توبولین‌های تخلیص شده تحت شرایط مناسب به تنهایی قادر به تجمع به شکل یک میکروتوبول می‌باشند که دلالت بر این دارد که توبولین تحت شرایط مناسب جزء ساختاری دیواره میکروتوبول می‌باشد. MAPها می‌توانند ساختار و دینامیک میکروتوبول‌های تشکیل شده توسط توبولین‌ها را تغییر دهند.

دیواره‌های میکروتوبول ساختمان‌های قطبی می‌باشند که از دایمرهای $\alpha\beta$ - توبولین ساخته شده‌اند

توبولین محلول خالص شده یک ملکول دایمر متشکل از دو زیرواحد مشابه با وزن ملکولی ۵۵۰۰۰ دالتون، توبولین α و β می‌باشد. تجزیه و تحلیل ژنومی نشان می‌دهد که ژن‌های کدکننده هر دو نوع توبولین α و β در تمامی یوکاریوت‌ها وجود دارند و تعداد این ژن‌ها در موجودات پرسلولی بسیار زیاد می‌باشد. به عنوان مثال، مخمر جوانه‌زن دارای دو ژن ویژه برای α- توبولین و یک ژن برای β- توبولین می‌باشد، حال آن‌که نماتود کانورابدیتیس الگانس، نه ژن کدکننده α- توبولین و شش ژن کدکننده β- توبولین دارد. علاوه بر توبولین α و β تمامی این موجودات دارای ژن‌های نوع سومی از توبولین تحت عنوان γ- توبولین نیز می‌باشند که این توبولین دارای عملکرد تنظیمی می‌باشد. هم‌چنین ایزوفرم‌های اضافی از توبولین کشف شده‌اند که تنها در موجودات دارای سانتریول و اجسام پایه وجود دارند و نشان می‌دهد این نوع توبولین خاص برای حفظ این ساختارها بسیار مهم می‌باشند.

هر زیرواحد دایمر توبولین قادر به اتصال به یک مولکول GTP می‌باشد (شکل ۳ـ۱۸a). مولکول GTP موجود در زیرواحد α- توبولین هرگز هیدرولیز نمی‌شود و در سطح تماس بین زیرواحدهای α و β به دام می‌افتد. در مقابل، زیرواحد β دارای جایگاه متصل‌شونده به GTP بوده که قابلیت تبادل با GTP آزاد را دارد و این GTP اتصال یافته می‌تواند هیدرولیز شود. میکروتوبول‌ها شامل ۱۳ پروتوفیلامنت می‌باشند که به‌طور جانبی به یکدیگر اتصال یافته و تشکیل ساختار لوله‌ای را می‌دهند که قطر خارجی آن حدود ۲۵ نانو متر می‌باشد (شکل ۳ـ۱۸b). هر پروتوفیلامنت از دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ ساخته شده است، به‌طوری که زیرواحدهای متوالی تشکیل پروتوفیلامنت را می‌دهند و هر واحد تکراری قطری حدود ۸ نانومتر دارد. از آنجایی که پروتوفیلامنت از دایمرهای توبولین ساخته شده است، بنابراین هر پروتوفیلامنت دارای یک زیرواحد α در یک انتها و یک زیرواحد β در انتهای دیگر می‌باشد ـ و بنابراین پروتوفیلامنت‌ها دارای یک **قطبیت** ذاتی می‌باشند. در یک میکروتوبول، تمامی پروتوفیلامنت‌ها به‌طور جانبی دارای قطبیت یکسان می‌باشند و بنابراین میکروتوبول نیز دارای قطبیت می‌باشد. انتهای (+) میکروتوبول که برای عمل پلیمریزاسیون مناسب می‌باشد، حاوی زیرواحدهای β می‌باشد، حال آن‌که انتهای (-) دارای زیرواحدهای α

1- Microtubule-associated proteins

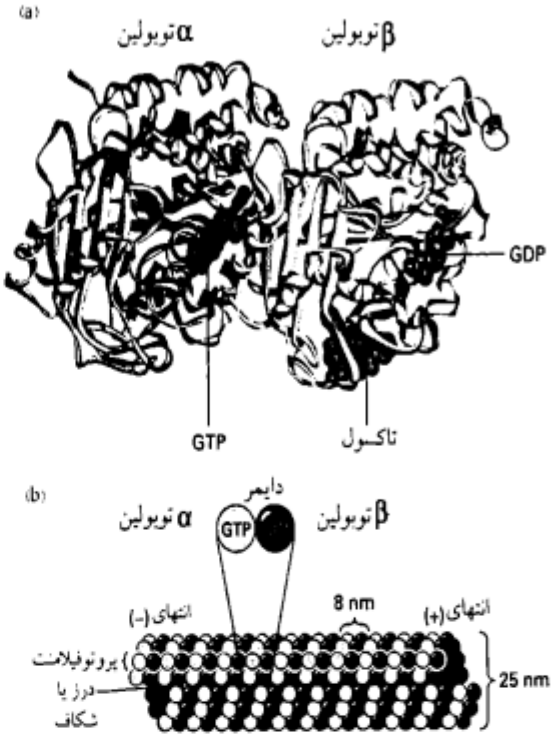


▲ شکل ۲ـ۱۸ میکروتوبول‌ها در مکان‌های مختلف وجود دارند و تمامی آنها دارای ساختارهای مشابه هستند. (a) سطح اپیتلیوم مژک لوله رحم خرگوش که در زیر میکروسکوپ الکترونی نگاره مشاهده شده است. زنش مژک که دارای هسته میکروتوبولی می‌باشد، سلول تخم را به درون لوله رحم هدایت می‌کند. (b) میکروتوبول‌ها و رشته‌های حد واسط موجود در اکسون سریع منجمد شده[۱] و عمیقاً خراشیده[۲] قورباغه که در زیر میکروسکوپ الکترونی گذاره مشاهده شده است. (c) نمایش یک میکروتوبول واحد با بزرگ‌نمایی بالا که حاوی ۱۶ واحد تکراری بنام پروتوفیلامنت می‌باشد.

مـــی‌باشد. در مـــیکروتوبول‌ها، هـــتروداییـــمرهای مـوجود درپروتوفیلامنت‌های مجاور به آرامی بر روی هم لغزیده و ردیف‌های منحنی‌شکل از مونومرهای توبولین α و β در دیواره میکروتوبول تشکیل می‌دهند. به عنوان مثال، اگر شما یک ردیف از زیرواحدهای β را دنبال کنید، خواهید دید که این ردیف β توبولین به صورت یک دور کامل به دور میکروتوبول می‌چرخد. نهایتاًشما دقیقاً بـه نـقطه‌ای خواهید رسید که به میزان ۶ زیـرواحـد از نـقطه اولیـه در هـمان پروتوفیلامنت فاصله داشته و متصل به یک زیرواحد α می‌باشد. بنابراین تمامی میکروتوبول‌ها دارای یک شکاف[۳] طولی منفرد هستند که در آن یک زیرواحد α از یک پروتوفیلامنت با یک زیرواحد β در پروتوفیلامنت مجاور برخورد می‌کند.

بـیشتر مـیکروتوبول‌های سلول یک لوله ساده، تـحت عـنوان میکروتوبول واحد[۴] می‌باشند که از ۱۳ پروتوفیلامنت می‌باشند. در مواقع نادری، میکروتوبول واحد دارای پروتوفیلامنت‌های کمتر یا بیشتری می‌باشد. به عنوان مثال، برخی میکروتوبول‌های خاص در نورون‌های کرم‌های نماتود حاوی ۱۱ یا ۱۵ پروتوفیلامنت می‌باشند. علاوه بر ساختار ساده این نوع میکروتوبول‌ها، میکروتوبول‌های دوگانه و سه‌گانه نیز وجود دارند که در برخی ساختارهای ویژه از قبیل مژک و تاژک (میکروتوبول‌های دوگانه) و سانتریول و اجسام پایه (میکروتوبول‌های سه‌گانه) مشاهده شده‌اند. این ساختارها در بخش‌های بعدی به‌طور کامل مورد بحث قرار می‌گیرند. هر میکروتوبول دوگانه یا سه‌گانه حاوی یک میکروتوبول کامل با ۱۳ پروتوفیلامنت (توبول A) و یک یا دو توبول اضافی (C,B) دارای ۱۵

1- Quick-frozen
2- Deep-etched
3- Seam
4- Singlet



▲ **شکل ۳-۱۸ (شکل رنگی) ساختار دایمرهای توبولین و سازمان‌دهی آنها در درون میکروتوبول‌ها.** (a) دیاگرام رویانی دایمر توبولین. GTP (قرمز) متصل به مونومر توبولین α غیر قابل تبادل می‌باشد، حال آن‌که GDP (آبی) متصل به مونومرتوبولین β قابل مبادله با GTP آزاد می‌باشد. تاکسول، نوعی دارو که سبب تثبیت میکروتوبول‌ها شده و در درمان برخی سرطان‌ها به کار می‌برد، به ناحیه دیگری در زیرواحد متصل می‌شود. (b) سازمان‌دهی زیرواحدهای توبولین در یک میکروتوبل. دایمرها از انتها به یکدیگر به صورت پروتوفیلامنت‌ها ردیف شده‌اند که این پروتوفیلامنت از طریق اتصال پهلو به پهلو دیواره میکروتوبل را تشکیل می‌دهند. پروتوفیلامنت‌ها به‌طور آهسته بر روی هم می‌لغزند، به گونه‌ای که α- توبولین یک پروتوفیلامنت در تماس با α- توبولین پروتوفیلامنت‌های مجاور می‌باشد، به جز در ناحیه شکاف که در آن یک زیرواحد α با یک زیرواحد β تماس دارد. این ملکول میکروتوبول دارای ساختار قطبی می‌باشد که در آن زیرواحدها اساساً در یک انتها، تحت عنوان انتهای (+) اضافه می‌شوند. در انتهای (+) توبولین β مشاهده می‌شوند.

پروتوفیلامنت می‌باشند (شکل ۴-۱۸).

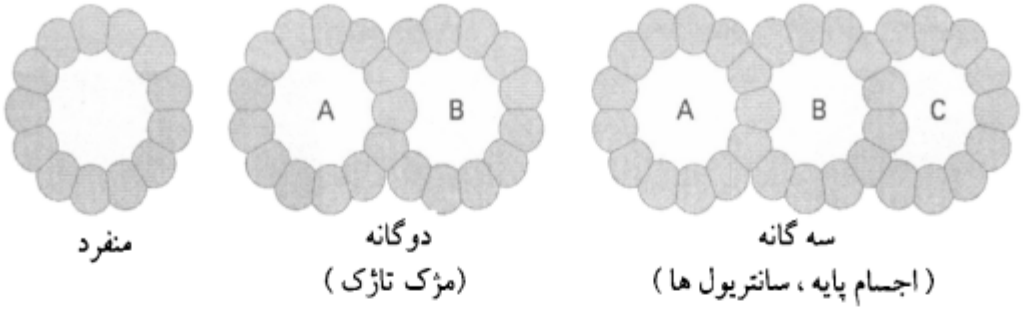
میکروتوبول‌ها در MTOCs تشکیل شده و ساختارهای گوناگون تشکیل می‌دهند

با مشخص شدن این موضوع که توبولین عمده‌ترین جزء ساختاری میکروتوبول‌ها می‌باشد، آنتی‌بادی‌هایی بر علیه توبولین ساخته شد که از طریق میکروسکوپ ایمونو فلورسنت در تعیین محل میکروتوبول‌های سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۵-۱۸ a و b). این روش به همراه توصیف ساختاری میکروتوبول‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی، نشان داد که میکروتوبول‌ها از مکان‌های مختلف بر روی هم سوار شده و نهایتاً انواع مختلفی از ساختارها را به وجود می‌آورند (شکل ۵-۱۸).

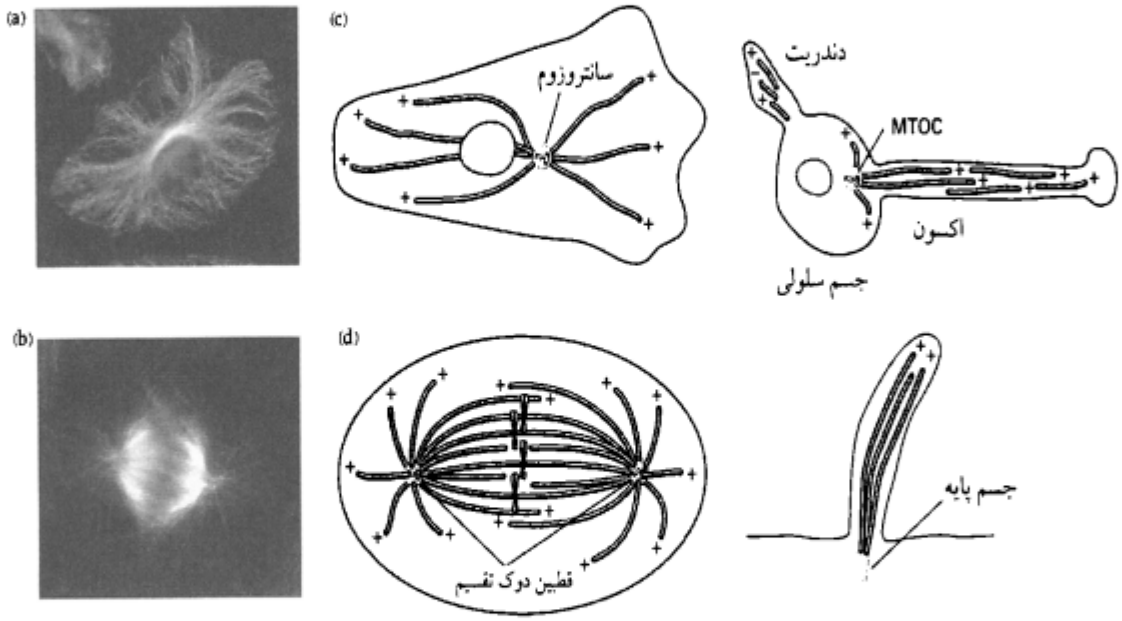
فاز هسته‌ای شدن تشکیل میکروتوبول‌ها هم آن‌چنان واکنش نامطلوبی است که هسته‌ای شدن خودبه‌خودی نقش مهمی را در سوار شدن میکروتوبول‌ها در *In Vivo* بازی نمی‌کند. تقریباً تمامی میکروتوبول‌ها از ساختارهایی تحت عنوان **مراکز سازمان‌دهنده میکروتوبول‌ها**[1] یا **MTOCs** شروع به هسته‌ای شدن می‌کنند. در بیشتر موارد، انتهای (-) میکروتوبول به صورت متصل به MTOC باقی می‌ماند. در سلول‌های غیر میتوزی که تحت عنوان سلول‌های اینترفازی نیز شناخته می‌شوند، MTOC تحت عنوان **سانتروزوم** شناخته می‌شود و به‌طور معمول نزدیک هسته قرار دارد که تولید یک ردیف شعاعی از میکروتوبول‌هایی می‌کند که انتهای (+) آنها به سمت ناحیه بیرونی سلول می‌باشد (شکل ۵c-۱۸). این نمایش شعاعی میکروتوبول‌ها به عنوان مسیر حرکت پروتئین‌های موتوری وابسته به میکروتوبول عمل می‌کند تا بخش‌های متصل به غشاء سلول، مانند بخش‌هایی که درگیر در مسیرهای ترشحی و آندوسیتوز هستند، سازماندهی و منتقل شوند. در طی میتوز، سلول‌ها به‌طور کامل مجدداً میکروتوبول‌های خود را سازمان‌دهی می‌کنند که این عمل به منظور تشکیل دوک دوقطبی می‌باشد. دوک دوقطبی از دو MTOC به نام **قطبین دوکی**[2] تشکیل می‌شود و به‌طور دقیقی سبب جداسازی نسخه‌های کروموزوم‌های دوبرابر شده می‌شود (شکل ۵d-۱۸). در مثال دیگری، نورون‌ها دارای زوائد دراز تحت عنوان آکسون می‌باشند که در آن اندامک‌ها در طول میکروتوبول‌ها در هر دو جهت انتقال می‌یابند (شکل ۵e-۱۰). میکروتوبول‌های موجود در آکسون‌ها که طول آنها گاهی به یک متر هم می‌رسد، پیوسته نبوده و در مناطقی از MTOC جدا می‌باشند، ولی با این حال همگی دارای قطبیت یکسان می‌باشند. در سلول‌های مشابه میکروتوبول‌های موجود در دندریت‌ها دارای قطبیت مخلوط می‌باشند، و هنوز اهمیت عملکردی آن مشخص نمی‌باشد. در مژک و تاژک (شکل ۵f-۱۸)، میکروتوبول‌ها از یک MTOC تحت عنوان جسم پایه منشأ می‌گیرند.

1- Microtubule-organizing centers

2- Spindle poles



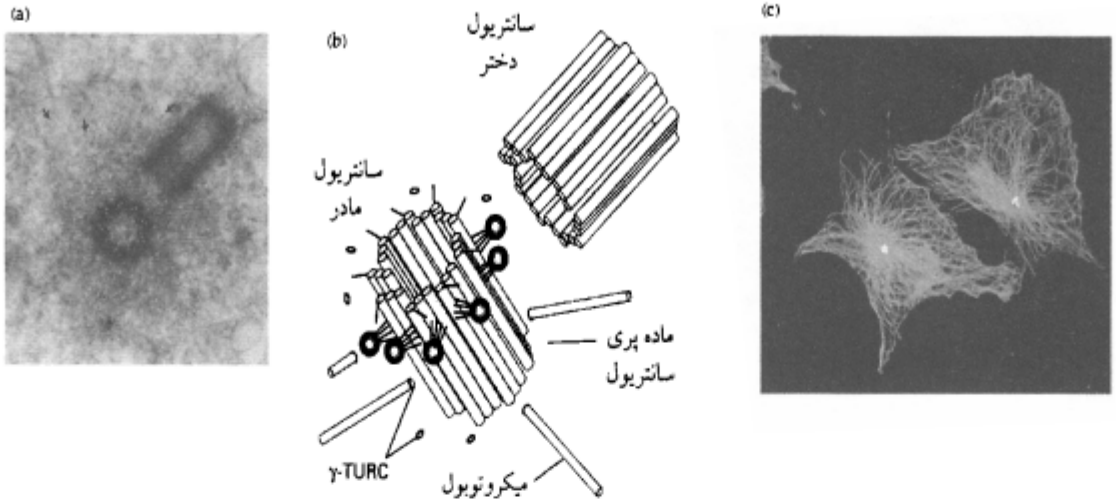
▲ **شکل ۴-۱۸ میکروتوبول‌های منفرد، دوگانه و سه گانه.** در برش عرضی، یک میکروتوبول منفرد، به عنوان میکروتوبول معمول، شامل یک لوله ساده بوده که از ۱۳ رشته پروتوفیلامنت ساخته شده‌است. در یک میکروتوبول دوگانه، یک دسته اضافی از پروتوفیلامنت‌های ۱۵ تایی به واسطه ادغام با دیواره میکروتوبول منفرد(A)، تشکیل یک توبول ثانویه (B) را می‌دهد. اتصال پروتوفیلامنت‌های ۱۵ تایی دیگر به توبول β میکروتوبول دوگانه، تولید توبول C را می‌کند که منجر به شکل‌گیری ساختار میکروتوبول سه گانه می‌شود.



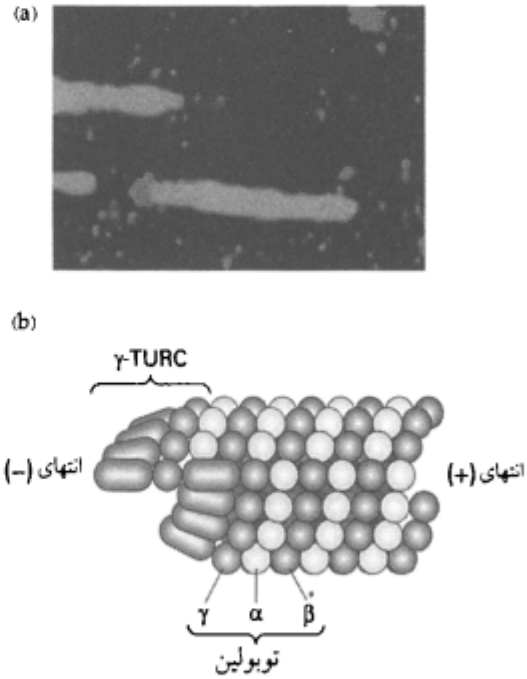
▲ **شکل ۵-۱۸ (شکل رنگی) میکروتوبول‌ها از مراکز سازمان‌دهنده میکروتوبولی (MTOCs) منشأ می‌گیرند.** توزیع میکروتوبول‌ها در سلول‌های کشت داده شده که به کمک میکروسکوپ ایمونوفلورسانس و توسط اتصال آنتی‌بادی‌های ضدتوبولین در یک سلول اینترفازی (a) و یک سلول در حال تقسیم میتوز (b) مشاهده می‌شود. (c-f) دیاگرام‌های توزیع میکروتوبول‌ها در سلول‌ها و ساختارهایی که در آن میکروتوبول‌ها از MTOCsهای مجزا منشأ می‌گیرند. در یک سلول اینترفازی MTOC (c) یک سانتروزوم نامیده می‌شود (هسته به وسیله بیضی آبی‌رنگ مشخص شده است)؛ در یک سلول میتوزی (d) دو MTOCs مربوطه تحت عنوان قطبین دوک میتوزی نامیده می‌شوند (کروموزوم‌ها به رنگی آبی نشان داده شده‌اند)؛ در یک نورن (e)، میکروتوبول‌های هر دو مولکول اکسون و دندریت از یک MTOC در جسم سلولی منشأ گرفته و سپس از آن آزاد می‌شوند. میکروتوبول‌هایی که تنه مژک یا تاژک را می‌سازند (f) از یک MTOC تحت عنوان جسم پایه منشأ می‌گیرند. قطبیت میکروتوبول‌ها به وسیله انتهاهای (+) و (−) مشخص می‌شود.

در سلول‌های اینترفازی میکروتوبول‌ها از سانتروزوم منشأ می‌گیرند. میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که در سلول‌های جانوری سانتروزوم‌ها از یک جفت سانتریول‌های استوانه‌ای که به حالت عمود بر هم قرار دارند، تشکیل می‌شوند و توسط ماده بی‌شکل تحت عنوان **ماده‌پری سانتریولی**[1] احاطه شده است (شکل ۶a-۱۸، نوک فلش‌ها). سانتریول‌ها که حدود ۰/۵μm طول و ۰/۲μm قطر دارند، ساختارهای به شدت سازمان یافته و مستحکم می‌باشند که متشکل از ۹ دسته میکروتوبول‌های ۳ تایی می‌باشند. این اجسام از نظر

1- Pericentriolar material



▲ **شکل ۶ـ۱۸ (شکل رنگی) ساختار سانتروزوم‌ها.** (a) مقطع نازک سانتروزوم یک سلول جانوری نشان می‌دهد که هر سانتروزوم متشکل از ۲ سانتریول با زاویه ۹۰ درجه می‌باشد که توسط ماده پری‌سانتریول احاطه شده است (فلش‌ها). (b) دیاگرام یک سانتروزوم دو سانتریول را نشان می‌دهد که هر یک از آنها شامل ۹ دسته میکروتوبول ۳ تایی می‌باشد که از سمت خارج به هم اتصال یافته و در ماده پری‌سانتریول که حاوی ساختارهای هسته‌ای کننده γTURC می‌باشد، قرار دارد. (c) نمایش میکروتوبول (سبز) و موقعیت MTOC توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسانس در یک سلول جانوری با استفاده از آنتی‌بادی ضد پروتئین سانتروزومی (زرد).



▶ **شکل ۷ـ۱۸ (شکل رنگی) کمپلکس حلقه γ- توبولین (γ-TURC) که سبب هسته‌ای شدن تشکیل و طویل شدن میکروتوبول‌ها می‌شود.** (a) میکروگراف ایمونوفلورسانس میکروتوبول‌های سنتز شده در محیط *In Vitro* که با رنگ سبز نشان داده شده است و قسمتی از γ-TURC که به رنگ قرمز می‌باشد، نشان می‌دهد که γ-TURC به‌طور ویژه‌ای در یک انتهای میکروتوبول قرار دارد. (b) مدلی که نشان می‌دهد چگونه γ-TURC از طریق تشکیل یک الگوی مرتبط با انتهای (−) یک میکروتوبول می‌تواند در هسته‌ای شدن سنتز یک میکروتوبول مؤثر باشد.

ساختاری بسیار شبیه اجسام پایه موجود در پایه مژک و تاژک می‌باشد. سانتروزم‌ها در شکل‌گیری هسته اولیه میکروتوبول در سیتوپلاسم ضروری می‌باشند. سانتریول‌ها به تنهایی در هسته‌ای شدن میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی نقشی ندارند، بلکه عامل اصلی در این عمل ماده پری سانتریولی می‌باشد. یک عامل مهم در این فرایند **کمپلکس حلقه γ- توبولین**[1] (γ-TURC) می‌باشد (شکل‌های ۶ـ۱۸b و ۷ـ۱۸). این کمپلکس پروتئینی در ماده پری سانتریولی وجود دارد و متشکل از نسخه‌های زیاد γ- توبولین، نوعی توبولین که متفاوت از α و β توبولین می‌باشد، بوده و با انواع متفاوتی از پروتئین‌ها اتصال دارد. عقیده بر این است که γ-TURC همانند یک الگوی واشر جداکننده[2] عمل کرده و از طریق اتصال به دایمرهای توبولین‌های βα یک میکروتوبول جدید را تشکیل می‌دهد (شکل ۷ـ۱۸b). علاوه بر نقش سانتروزوم‌ها در شکل‌گیری هسته

1- γ-tubulin ring complex
2- Split-washer

اولیه میکروتوبول‌ها، این مولکول‌ها به انتهای (-) میکروتوبول‌ها قلاب شده و دینامیک این ناحیه را تنظیم می‌کنند.

اجسام پایه دارای ساختاری مشابه با سانتریول بوده و به عنوان MTOC موجود در پایه مژک و تاژک عمل می‌کنند. توبول‌های A و B میکروتوبول‌های سه‌گانه بعنوان الگو برای تشکیل میکروتوبول‌هایی عمل می‌کنند که ساختار مرکزی مژک و تاژک را تشکیل می‌دهند.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۸

- توبولین عمده‌ترین جزء ساختاری میکروتوبول‌ها بوده و به همراه پروتئین‌های متصل‌شونده به میکروتوبول (MAPs)، ساختار میکروتوبول‌ها را تشکیل می‌دهد (شکل ۱۸-۳ را ملاحظه کنید).
- توبولین آزاد به صورت یک دایمر $\alpha\beta$ می‌باشد که زیرواحد α آن متصل به یک ملکول GTP غیر قابل هیدرولیز می‌باشد و زیرواحد β آن متصل به یک ملکول GTP قابل تعویض و هیدرولیز شدن می‌باشد.
- توبولین $\alpha\beta$ بر روی هم سوار شده و تشکیل میکروتوبول‌هایی را می‌دهند که دارای ۱۳ رشته پروتوفیلامنت هستند. پروتوفیلامنت‌ها به‌طور جانبی به یکدیگر متصل می‌شوند و در آنها یک زیرواحد α در انتهای (-) و یک زیرواحد در انتهای (+) مشاهده می‌شود.
- در مژک و تاژک، سانتریول‌ها و اجسام پایه، میکروتوبول‌های دوگانه یا سه‌گانه وجود دارند که در آنها میکروتوبول‌های اضافی دارای ۱۰ رشته پروتوفیلامنت می‌باشند (شکل ۱۸-۴ را ملاحظه کنید).
- تمامی میکروتوبول‌ها از مراکز سازمان‌دهنده میکروتوبولی (MTOCs) منشأ می‌گیرند و بسیاری از آنها از طریق انتهای (-) خود بصورت متصل و قلاب شده به این مراکز می‌مانند. بنابراین همیشه انتهای (+) میکروتوبول‌ها از MTOC خارج می‌شود.
- سانتروزوم نوعی MTOC می‌باشد که سبب شکل‌گیری ردیف شعاعی از میکروتوبول‌ها در سلول‌های غیر میتوزی می‌شود. قطب‌های دوک تقسیم، MTOCsهایی می‌باشند که سبب شکل‌گیری میکروتوبول‌های دوک تقسیم میتوزی می‌شوند و اجسام پایه، MTOCsهایی می‌باشند که سبب تشکیل میکروتوبول‌های مژک و تاژک می‌شوند (شکل ۱۸-۵ را ملاحظه کنید).
- سانتروزوم‌ها متشکل از دو سانتریول و ماده پری‌سانتریول می‌باشند که حاوی کمپلکس تشکیل‌دهنده میکروتوبول γTURC می‌باشد (شکل ۱۸-۶ را ملاحظه کنید)

۱۸-۲ دینامیک میکروتوبول

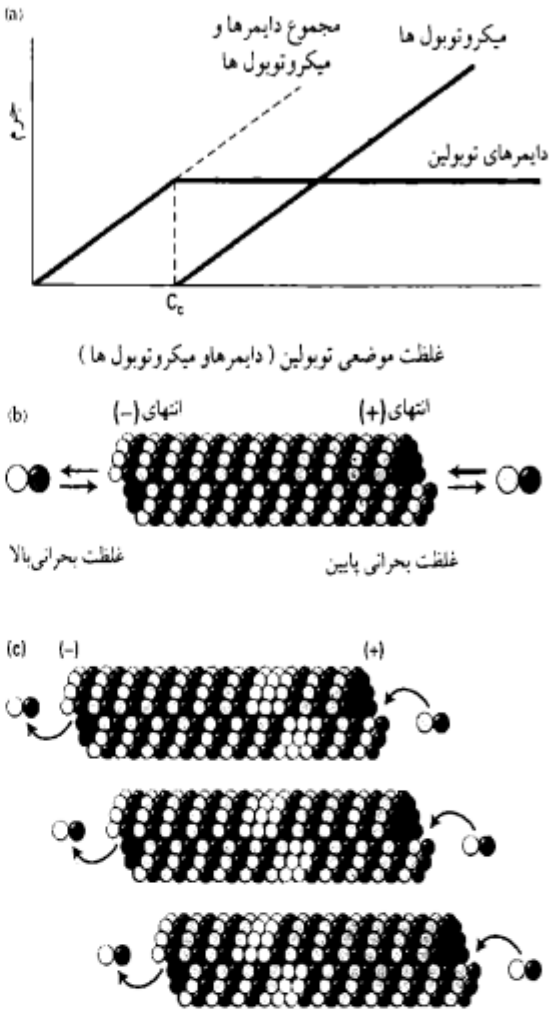
میکروتوبول‌ها به دلیل این‌که در دو انتهای خود به‌طور مداوم تشکیل وتجزیه می‌شوند، ساختارهای دینامیک می‌باشند. میزان این دینامیک بسیار متغیر می‌باشد، به‌طوری که به‌طور متوسط نیمه عمر یک میکروتوبول از کمتر از ۱ دقیقه برای سلول‌های میتوزی تا ۱۰-۵ دقیقه برای میکروتوبول‌های دخیل در تشکیل آرایش شعاعی سلول‌های غیر میتوزی متغیر می‌باشد. طول عمر میکروتوبول‌ها در آکسون‌ها طولانی و در مژک و تاژک بسیار زیاد می‌باشد. به منظور مشخص شدن این‌که چه‌طور این تفاوت‌ها ایجاد می‌شوند، ما ابتدا ویژگی‌های پلیمریزاسیون پروتئین میکروتوبول و سپس رفتار دینامیک دو انتهای میکروتوبول‌ها را مورد بحث و بررسی قرار می‌دهیم.

میکروتوبول‌ها به دلیل تفاوت‌های کینیتکی دو انتهای خود ساختارهای دینامیکی می‌باشند

میکروتوبول‌ها از طریق پلیمریزاسیون دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ و در طی فرایندی که به‌طور عمده توسط پروتئین‌های وابسته به میکروتوبول (MAPs) کاتالیز می‌شود، سنتز می‌شوند. میکروتوبول‌های سنتز شده از مخلوط توبولین $\alpha\beta$ و MAPs که مجموعاً پروتئین میکروتوبولی[1] نامیده می‌شود، زمانی که در دمای $4^{\circ}C$ قرار گیرند، تخریب شده و اگر تا دمای $37^{\circ}C$ گرم شود دوباره سنتز می‌گردند. این ویژگی به محققین این امکان را می‌دهد که پروتئین میکروتوبول را تخلیص نموده و مکانیسم سنتز میکروتوبول و دینامیک آن را در زمانی که یک محلول پروتئین میکروتوبول از $4^{\circ}C$ تا $37^{\circ}C$ گرم می‌شود، مشخص نمایند.

تجزیه و تحلیل ویژگی‌های عمده پلیمریزاسیون یک محلول میکروتوبولی نشان می‌دهد که این فرایند دارای چندین ویژگی مشابه با پلیمریزاسیون اکتین می‌باشد. با این حال از آن‌جایی که ویژگی‌های سنتز میکروتوبول‌ها به‌طور عمده‌ای توسط MAPs و توبولین $\alpha\beta$ تحت تأثیر قرار می‌گیرد، تنها برخی از ویژگی‌های رایج در اینجا مورد

1- Microtubular protein



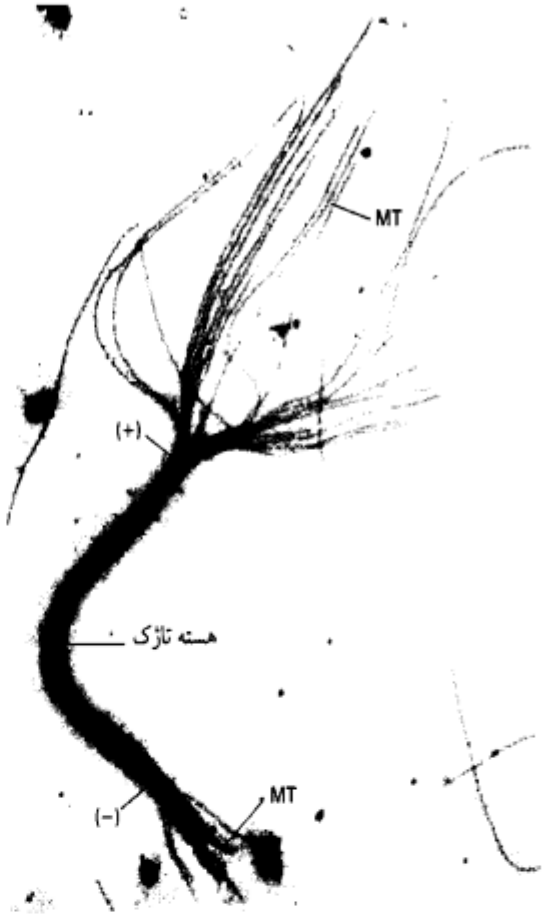
▲ **شکل ۸ـ۱۸ (شکل رنگی) تریدمیلینگ میکروتوبول.** (a) دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ تنها زمانی به شکل میکروتوبول سنتز می‌شوند که غلظت‌شان بیشتر از غلظت بحرانی (C_c) باشد. در غلظت‌های بالاتر از C_c، میکروتوبول‌ها در حالت پایدار با دایمرهای $\alpha\beta$ توبولین در تعادل می‌باشند. (b) غلظت‌های بحرانی برای دایمرهای $\alpha\beta$ توبولین (با حالت متصل به GTP) در دو انتها متفاوت می‌باشد، به‌طوری که سرعت اضافه شدن در انتهای (+) بیشتر از انتهای (-) می‌باشد. (c) در حالت پایدار، دایمرهای $\alpha\beta$- توبولین عمدتاً به انتهای (+) اضافه شده و از انتهای (-) جدا می‌شوند. به‌طوری که زیرواحدهای موجود در میکروتوبول (زرد) به نظر می‌رسد که منجر به حرکت میکروتوبول یا ترید میلینگ می‌شوند.

بررسی قرار می‌گیرد. اول؛ بازه زمانی پلیمریزاسیون یک فاز آهسته هسته‌ای شدن و به دنبال آن یک فاز سریع طویل شدن و سپس یک فاز حالت پایدار را نشان می‌دهد که در آن همانند سنتز اکتین به شکل فیلامنت‌های اکتین (شکل ۷ـ۱۷ را ملاحظه کنید)، سنتز و تخریب میکروتوبول‌ها در حالت تعادل می‌باشد. دوم؛ به منظور این‌که میکروتوبول سنتز شود، غلظت توبولین $\alpha\beta$ بایستی بیش از **غلظت بحرانی**[1] (C_c) باشد. در غلظت‌های بالاتر از این غلظت، دایمرهای توبولین به شکل میکروتوبول‌ها پلیمریزه شده، حال آن‌که در غلظت‌های پایین‌تر از C_c، میکروتوبول‌ها دپلیمریزه می‌شوند که این حالت مشابه رفتار G-اکتین و F-اکتین می‌باشد (شکل ۸ـ۱۸a). سوم؛ در غلظت‌های توبولین $\alpha\beta$ بالاتر از C_c، دایمرها در یک انتها سریع‌تر از انتهای دیگر اضافه می‌شوند (شکل ۹ـ۱۸). همانند سنتز F-اکتین، انتهای مناسب برای سنتز انتهای (+) نامیده می‌شود که در واقع انتهای دارای β- توبولین می‌باشد (شکل ۸ـ۱۸b را ملاحظه کنید). چهارم؛ غلظت بحرانی در انتهای (+) کمتر از انتهای (-) می‌باشد. در نتیجه این ویژگی، در حالت پایدار، غلظت توبولین $\alpha\beta$ آزاد بیش از غلظت بحرانی انتهای (+) و کمتر از غلظت بحرانی در انتهای (-) می‌باشد. بنابراین زیرواحدها به انتهای (+) اضافه شده و از انتهای (-) جدا می‌شوند. این فرایند در نهایت منجر به اضافه شدن به انتهای (+) و جدا شدن از انتهای (-) می‌شود، بنابراین به نظر می‌رسد که زیرواحدها منجر به حرکت روبه پایین میکروتوبول طی فرایندی تحت عنوان تریدمیلینگ (شکل ۸ـ۱۸c را ملاحظه کنید)، مشابه با آنچه که در مورد اکتین نیز دیده می‌شد (شکل ۱۰ـ۱۷b را ملاحظه کنید)، می‌شوند. به دلیل این‌که غلظت داخل سلولی توبولین (۲۰ـ۱۰) بسیار بیشتر از غلظت بحرانی (C_c) مورد نیاز برای سنتز ($0/03\mu m$) می‌باشد، بنابراین پلیمریزاسیون فرایند بسیار مطلوب می‌باشد. با این حال، مکانیسم‌هایی در درون سلول‌ها وجود دارند که مکان و زمان پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها را تنظیم می‌کنند.

میکروتوبول‌های منفرد دارای دینامیک ناپایدار می‌باشند

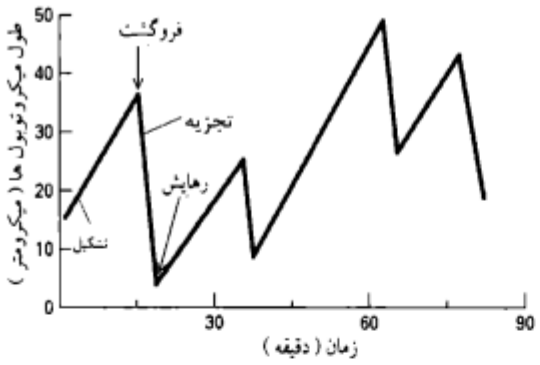
زمانی که جمعیتی از میکروتوبول‌های در حال رشد را مورد بررسی قرار دهیم، مشخص می‌شود که ویژگی‌های سنتز میکروتوبول‌ها مشابه سنتز اکتین به صورت فیلامنت‌های اکتین می‌باشد. با این وجود، زمانی که محققین رفتار میکروتوبول‌های منفرد را در درون یک جمعیت مورد بررسی قرار دادند، فرایند جدیدی را کشف نمودند. آنها آزمایش بسیار ساده‌ای انجام دادند. در این آزمایش، میکروتوبول‌ها در *In Vitro* سنتز شده و سپس به قطعات کوچک‌تر شکسته شدند بطوری که اندازه این قطعات قابل آنالیز بود. تحت این شرایط، می‌توان انتظار داشت که میکروتوبول‌های کوچک شروع به حرکت کنند. با این حال، محققین نشان دادند که طول

1- Critical concentration



▲ **شکل ۹ـ۱۸ میکروتوبول‌ها به‌طور اساسی در انتهای (+) رشد می‌کنند.** قطعه‌ای از یک دسته میکروتوبول مربوط به تاژک به عنوان هسته برای اضافه شدن توبولین $\alpha\beta$ در *In Vitro* استفاده شد. قطعه هسته‌ای کننده مربوط به تاژک به صورت دسته ضخیمی در زیر میکروسکوپ الکترونی دیده می‌شود. طول بیشتر میکروتوبول‌ها در یک انتها، انتهای (+)، دلالت بر این دارد که زیرواحدهای توبولین عمدتاً به این انتها اضافه می‌شوند.

تعدادی از میکروتوبول‌ها افزایش می‌یابد، حال آن‌که تعدادی دیگر از آنها به سرعت کوتاه می‌شوند ـ که این امر دلالت بر حضور دو دسته مجزا از میکروتوبول‌ها دارد. مطالعات بیشتر نشان داد که میکروتوبول‌های منفرد ابتدا افزایش طول داشتند و به دنبال آن به‌طور ناگهانی یک کاهش رشد را نشان می‌دهند. علاوه بر این، برخی‌مواقع انتهای دپلیمریزه‌شونده میکروتوبول طی گذر از مرحله **رهایش**[1] توانایی رشد مجدد و افزایش طول پیدا می‌کند (شکل ۱۰ـ۱۸). اگرچه این فرایند اولین بار در *In Vitro* مشاهده شد، با این حال بررسی توبولین‌های نشاندار شده با مواد فلورسانس، که به درون سلول‌های زنده تزریق شده بود، نشان داد که میکروتوبول‌های درون سلولی نیز دوره‌های طویل شدن و کوتاه شدن را طی می‌نمایند (شکل

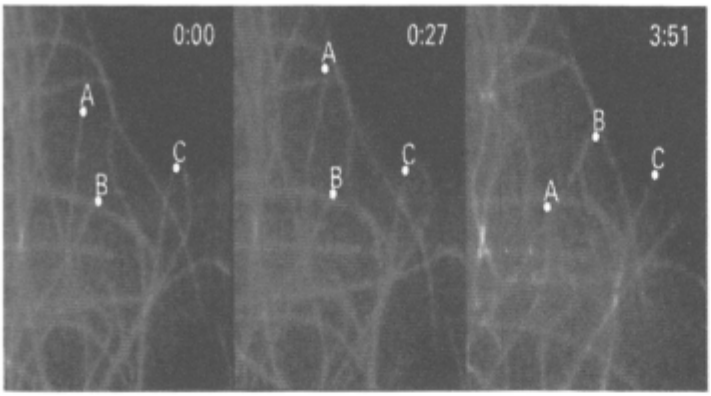


▲ **شکل ۱۰ـ۱۸ ناپایداری دینامیکی میکروتوبول‌ها در *In Vitro*.** میکروتوبول‌های منفرد را می‌توان در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کرد و طول آنها در زمان‌های مختلف تشکیل و تجزیه نشان داده شده است. تشکیل و تجزیه میکروتوبول در سرعت‌های یکنواخت انجام می‌شود، ولی یک تفاوت عمده بین این دو سرعت وجود دارد و آن همانطور که مشاهده می‌شود شیب‌های متفاوت خطوط است. کوتاه شدن یک میکروتوبول بسیار سریع‌تر از ($7\mu m/min$) رشد میکروتوبول ($1\mu m/min$) می‌باشد. به انتقالات ناگهانی مرحله کوتاه شدن (فروگشت) و مرحله طویل شدن (رهایش) توجه نمایید.

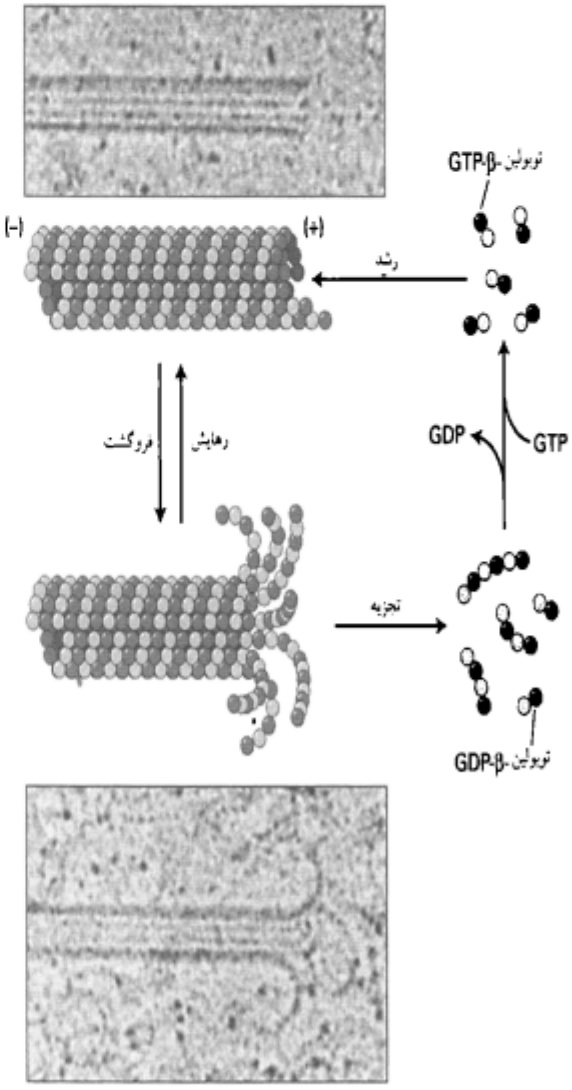
۱۱ـ۱۸). این فرایند تناوبی بین حالات رشد و کوتاه شدن تحت عنوان ناپایداری دینامیکی[2] معرفی می‌شود. بنابراین ناپایداری دینامیکی یک ویژگی انتهاهای میکروتوبول‌های منفرد بوده و فرایندی متفاوت از توانایی تریدمیلینگ میکروتوبول‌ها که با اضافه شدن دایمرهای توبولین به انتهای (+) و جدا شدن آنها از انتهای (−) صورت می‌گیرد، می‌باشد. اساس ملکولی ناپایداری دینامیکی چیست؟ اگر شما توسط میکروسکوپ الکترونی به‌طور دقیق انتهاهای در حال رشد و کوتاه شدن میکروتوبول‌ها را مورد بررسی قرار دهید، خواهید دید که آن‌ها کاملاً با هم متفاوت می‌باشند. یک میکروتوبول در حال رشد دارای یک انتهای مشخص می‌باشد، حال آن‌که انتهای میکروتوبول در حال دپلیمریزه، دارای پروتوفیلامنت‌های در حال پوست‌اندازی می‌باشد که ظاهری شبیه شاخ گوسفند دارند (شکل ۱۲ـ۱۸).

مطالعات اخیر تفسیر ساختاری ساده برای دو انتهای میکروتوبول‌ها فراهم نموده است. همان‌طور که در بالا ذکر کردیم، زیرواحد β دایمر توبولین $\alpha\beta$ در انتهای (+) هر پروتوفیلامنت قرار دارد. با استفاده از آنالوگ‌های GTP و GDP محققین مشاهده نمودند که پروتوفیلامنت‌های منفرد مصنوعی ـ که فاقد هر گونه

1- Rescue 2- Dynamic instability



شکل ۱۱-۱۸ تصویر میکروسکوپ فلورسانس رشد و کوتاه شدن میکروتوبول‌های منفرد را در *In Vivo* نشان می‌دهد. توبولین‌های نشان‌دار با مواد فلورسانس به درون فیبروبلاست‌های کشت داده شده انسانی تزریق شده‌اند. به منظور دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌های اولیه به شکل دایمرهای توبولین، این سلول‌ها ابتدا سرد شدند و سپس در ۳۷°C انکوبه شده‌اند تا توبولین‌ها دوباره پلیمریزه شوند، بنابراین توبولین‌های فلورسانس به درون میکروتوبول‌های سلول‌ها وارد شدند. یک ناحیه از محیط سلولی در زیر میکروسکوپ فلورسانس در زمان‌های صفر و ۲۷ ثانیه و ۳ دقیقه و ۵۱ ثانیه مورد مشاهده قرار گرفت (چپ و راست). در این مدت زمان چندین میکروتوبول طویل و کوتاه می‌شوند. حروف و نقاط سفید موقعیت انتهاهای سه میکروتوبول را نشان می‌دهند.



شکل ۱۲-۱۸ (شکل رنگی) ناپایداری دینامیکی وابسته به حضور یا عدم حضور یک کلاهک GTP-β- توبولین می‌باشد. تصاویر، مربوط به نمونه‌های منجمد از یک میکروتوبول در حال رشد (بالایی) و یک میکروتوبول در حال کوتاه شدن (پایینی)می‌باشد که توسط میکروسکوپ الکترونی گرفته شده است. توجه نمایید که انتهای میکروتوبول در حال رشد دارای یک انتهای صاف می‌باشد، در حالی که انتهای در حال کوتاه شدن مانند شاخ گوسفند حالت خمیده دارد. این دیاگرام نشان می‌دهد که میکروتوبول حاوی GTP- β- توبولین در انتهای پروتوفیلامنتی خود برای طویل شدن بسیار مناسب می‌باشد. با این وجود، میکروتوبول دارای GTP-β- توبولین در انتهای پروتوفیلامنت‌های خود ساختاری را تشکیل می‌دهد که به سرعت تجزیه می‌شود. رفت و برگشت بین افزایش و کاهش طول که رهایش و فروگشت نامیده می‌شود، همواره رخ داده و سرعت این فرایند توسط پروتئین‌های همراه تنظیم می‌شود.

میانکنش جانبی بودند ـ از دایمرهای تکراری توبولین $\alpha\beta$ دارای GDF-β- توبولین که مانند شاخ گوسفند حالت خمیده داشتند ساخته شده‌اند. با این حال، پروتوفیلامنت‌های منفردی که به‌طور مصنوعی از دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ دارای GTP-β- توبولین سنتز شده بودند، حالت راست داشتند. بنابراین میکروتوبول‌های در حال رشد با انتهاهای مشخص به β- توبولین متصل به GTP ختم می‌شوند، حال آن‌که میکروتوبول‌های در حال کوتاه شدن با انتهاهای خمیده به β- توبولین متصل به GDP ختم می‌شوند. بنابراین اگر ملکول

GTP موجود در β-توبولین‌های انتهای یک میکروتوبول هیدرولیز شوند، علی‌رغم این‌که این فرایند کاملاً تصادفی رخ خواهد داد، میکروتوبول در حال رشد که در ابتدا دارای انتهای مشخص بوده است، به حالت خمیده درآمده و یک فرایند **فروگشت**[1] خواهد داد. تمامی این وقایع در شکل ۱۲ـ۱۸ خلاصه شده است.

این نتایج دارای یک مفهوم اضافی می‌باشد. به همین دلیل ما بایستی یک میکروتوبول در حال رشد را به‌طور دقیق مورد بررسی قرار دهیم. اضافه کردن یک دایمر به انتهای (+) پروتوفیلامنت یک میکروتوبول در حال رشد نیازمند میانکنش بین زیرواحد α جدید و زیرواحد β انتهایی می‌باشد. این میانکنش سبب هیدرولیز GTP به GDP در زیر واحد β انتهایی می‌باشد. با وجود این β توبولین موجود در دایمر جدید دارای GTP می‌باشد. بنابراین پروتوفیلامنت میکروتوبول در حال رشد که حاوی GDP-β- توبولین می‌باشد از آن جدا شده و به وسیله GTP-β- توبولین پوشیده می‌شود. همان‌طور که در بالا ذکر کردیم، یک پروتوفیلامنت جدا شده حاوی GTP-β- توبولین در امتداد طول خود به حالت منحنی می‌باشد، بنابراین زمانی که این پروتوفیلامنت در میکروتوبول قرار می‌گیرد چرا آن نمی‌شکند و کنده نمی‌شود؟ میانکنش پروتوفیلامنت با پروتوفیلامنت مجاور در ناحیه کلاهک GTPβ'- توبولین آن چنان محکم می‌باشند که مانع کنده شدن میکروتوبول در انتهای آن می‌شود و بنابراین پروتوفیلامنت‌هایی که در پشت کلاهک GTPβ'- توبولین قرار دارند، الزاماً قادر به جدا شدن نیستند (شکل ۱۲ـ۱۸ را ملاحظه کنید). انرژی آزاد شده حاصل از هیدرولیز GTP زیرواحدهای پشت ناحیه کلاهک در درون شبکه میکروتوبول به صورت ساختار تحت فشار ذخیره می‌شود که پس از جدا شدن GTP-β- توبولین این انرژی آزاد می‌شود. اگر GTP-β- توبولین جدا شود، این انرژی ذخیره شده در صورتی قابل استفاده خواهد بود که برخی ساختارها مانند یک کروموزوم، به انتهای در حال کوتاه شدن میکروتوبول اتصال یابد. بنابراین می‌بینیم که توانایی β- توبولین در اتصال و هیدرولیز GTP دارای سه پیامد مهم در بیولوژی میکروتوبول می‌باشد:

- غلظت‌های بحرانی منحصر به فرد و ویژه در دو انتهای میکروتوبول منجر به ترید میلینگ آن می‌شود.
- انتهای (+) میکروتوبول متحمل ناپایداری دینامیکی می‌شود.
- میکروتوبول‌ها می‌توانند انرژی را بصورت انرژی پیچشی[2] ذخیره و برای انجام کار استفاده نمایند.

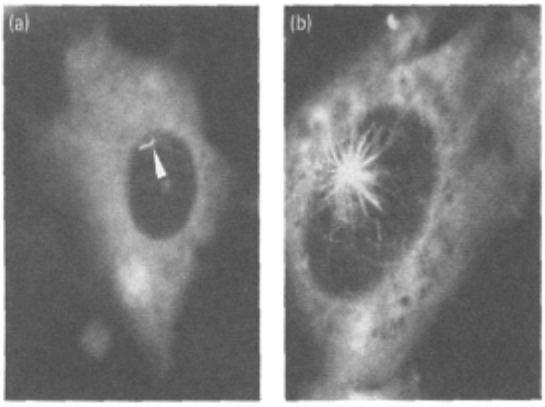
رشد میکروتوبول‌ها در مکان‌های معین و «جستجو و به دام اندازی[3]» به سازماندهی میکروتوبول‌ها کمک می‌کنند

اکنون ما دو مفهوم مرتبط با سازمان‌دهی میکروتوبول و دینامیکی انتهای (+) میکروتوبول را نشان می‌دهیم: میکروتوبول‌ها در یک سری مکان‌های مشخصی تحت عنوان MTOCs سنتز می‌شوند و میکروتوبول‌های منفرد متحمل ناپایداری دینامیکی می‌شوند. روی هم رفته این دو فرآیند در انتشار میکروتوبول در درون سلول‌ها نقش دارند. در یک سلول اینترفازی در حال رشد، میکروتوبول‌ها به‌طور مداوم از سانتروزوم شروع به رشد نموده و به‌طور تصادفی در فضای سیتوپلاسمی پراکنده می‌شوند. فرکانس فروگشت و رهایش به همراه سرعت‌های رشد و کوتاه شدن میکروتوبول، تعیین‌کننده طول هر میکروتوبول می‌باشد ـ اگر در یک میکروتوبول رهایش بسیار کم و فرکانس فروگشت بالا باشد، این میکروتوبول تا مرکز سلول کوتاه شده و نهایتاً ناپدید خواهد شد و در مقابل در صورتی که فروگشت کم و رهایش زیاد رخ دهد، آن میکروتوبول به‌طور مداوم رشد و افزایش طول خواهد داشت. اگر میکروتوبول به یک ساختار یا اندامکی برخورد نماید که انتهای (+) آن را پایدار و از فروگشت حفاظت نماید ـ و بدان وسیله آن را به دام بیندازد ـ این انتهای میکروتوبول به حالت متصل به آن ساختمان باقی خواهد ماند، در حالی که میکروتوبول‌های غیر متصل نشده دارای فرکانس بالایی برای کوتاه شدن هستند. بنابراین دینامیک انتهای میکروتوبول یک عامل تعیین‌کننده بسیار مهم در چرخه حیات و عملکرد میکروتوبول می‌باشد. «جستجو و به دام اندازی» بخشی از مکانیسم تعیین‌کننده سازمان‌دهی کلی میکروتوبول‌های یک سلول می‌باشد. به علاوه، یک سلول از طریق تغییر سرعت هسته‌ای شدن یا دینامیک موضعی محلی میکروتوبول و مکان‌های به دام‌اندازی آن، می‌تواند به سرعت توزیع کلی میکروتوبول‌های خود را تغییر دهد.

داروهای تغییردهنده پلیمریزاسیون توبولین از نظر آزمایشگاهی مفید بوده و در درمان بیماری‌ها کاربرد دارند

ماهیت حفظ شده توبولین‌ها و نقش ضروری آنها در فرایندهای حیاتی مانند میتوز، آنها را هدف اولیه برای داروهای طبیعی و سنتزی که پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون را تغییرمی‌دهند، قرار داده است. از نظر تاریخی، اولین داروی شناخته

1- Catastrophe
2- Torsional energy
3- Search and capture



▲ **شکل ۱۳ـ۱۸ رشد میکروتوبول‌ها از MTOC منشاء می‌گردد.** به منظور بررسی این‌که در *In Vivo* میکروتوبول‌ها از کجا شروع به رشد می‌کنند، یک سلول فیبروبلاست کشت داده شده توسط کلشی‌سین تیمار شد تا تقریباً تمامی میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی دپلیمریزه شدند. سپس این سلول توسط آنتی‌بادی‌های ضد توبولین رنگ‌آمیزی شد و در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس مشاهده گردید (شکل a). سپس به منظور بازسازی مجدد میکروتوبول‌ها، کلشی‌سین از محیط شسته شد. شکل (b) مراحل اولیه رشد میکروتوبول‌ها را نشان می‌دهد که در آن میکروتوبول‌ها از یک ناحیه مرکزی در بالای هسته (مناطق تیره) شروع به رشد می‌کند. توجه نمایید که در شکل (a) مژک باقی‌مانده اولیه (فلش) به سانتروزوم که توسط کلشی‌سین دپلیمریزه نشده است، اتصال دارد. هم‌چنین به فلورسانس ناحیه سیتوپلاسم که ناشی از دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ پلیمریزه نشده می‌باشد، توجه نمایید.

شده از این دسته، کلشی‌سین بوده که در عصاره زعفران علفی وجود دارد. این ماده به دایمرهای توبولین اتصال یافته و مانع پلیمریزاسیون آنها به شکل میکروتوبول می‌شود. از آنجایی که بیشتر میکروتوبول‌ها در یک حالت دینامیک بین دایمرها و پلیمرها می‌باشند، بنابراین افزودن کلشی‌سین باعث به دام انداختن تمامی دایمرهای آزاد سیتوپلاسم شده و به دلیل ماهیت رشد و کوتاه شدن مداوم میکروتوبول‌ها منجر به از بین رفتن آنها می‌شود. تیمار سلول‌های کشت داده شده با کلشی‌سین در بازه زمانی کوتاه منجر به دپلیمریزاسیون تمامی میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی شده و سانتروزوم حاوی توبولین که دارای پایداری بیشتری است، باقی می‌ماند (شکل ۱۳a ـ۱۸). هم‌چنین پس از تیمار با کلشی‌سین مشاهده شد که مژک اول در سطح سلول پایدار باقی می‌ماند. این مژک از یکی از سانتریول‌ها که به عنوان جسم پایه آن عمل می‌کند، سنتز شده است (در زیر بحث شده است). زمانی که کلشی‌سین از محیط شسته می‌شود تا امکان رشد دوباره میکروتوبول‌ها فراهم شود، مشاهده می‌شود که میکروتوبول‌ها قادر به رشد از ناحیه سانتروزوم می‌باشند که این امر نشان‌دهنده توانایی سانتروزوم برای شروع سنتز میکروتوبول می‌باشد (شکل ۱۳b ـ۱۸).

کلشی‌سین برای چندین قرن در درمان بیماری نقرس حاد مورد استفاده قرار می‌گرفت ـ یک بیمار معروف در این زمینه پادشاه هنری هشتم انگلستان بود. برای درمان بیماری او، از کلشی‌سین استفاده شد. یک مقدار اندکی کلشی‌سین التهاب ایجاد شده توسط نقرس را از طریق کاستن دینامیک میکروتوبول‌های سلول‌های سفید خون، که مانع مهاجرت زیاد آنها به ناحیه التهابی می‌شود، درمان می‌کند.

علاوه بر کلشی‌سین، تعدادی از داروهای دیگر نیز وجود دارند که با اتصال به دایمر توبولین مانع تشکیل پلیمرهای میکروتوبول می‌شوند. از جمله آنها پودوفیلوتوکسین (استخراج شده از گیاه عرعر) و نوکودازول (یک داروی سنتزی) را می‌توان نام برد.

تاکسول، یک آلکالوئید گیاهی درخت سرخدار اقیانوس آرام می‌باشد که به میکروتوبول‌ها اتصال یافته و از طریق تثبیت آن مانع دپلیمریزاسیون می‌شود. از آنجایی که تاکسول از طریق مهار میتوز مانع تقسیم سلول‌ها می‌شود، بنابراین در درمان برخی سرطان‌ها مانند سرطان سینه و رحم که به‌طور ویژه‌ای به دارو حساس هستند، استفاده می‌شود.

نکات کلیدی قسمت ۲-۱۸

دینامیک میکروتوبول

- میکروتوبول‌ها با استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز GTP قادر به تریدمیلینگ می‌باشند (شکل ۸ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- انتهای (+) میکروتوبول‌های منفرد متحمل ناپایداری دینامیکی می‌شوند که این امر همراه با دوره‌های متناوب رشد و کوتاه شدن می‌باشد (شکل ۱۰ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- توبولین β در تمامی میکروتوبول‌ها در ابتدا به GDP متصل است. با این وجود، انتهای (+) میکروتوبول‌های در حال رشد توسط β-GTP ـ توبولین پوشیده شده و دارای انتهاهای صاف هستند، در حالی که میکروتوبول‌های در حال کوتاه شدن کلاهک β-GTP ـ توبولین را از دست داده و پروتوفیلامنت‌ها شروع به تجزیه و کنده شدن می‌نمایند (شکل ۱۲ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- میکروتوبول‌های در حال رشد انرژی حاصل از هیدرولیز GTP را در شبکه میکروتوبول ذخیره کرده و بنابراین به هنگام دپلیمریزاسیون پتانسیل انجام کار دارند.

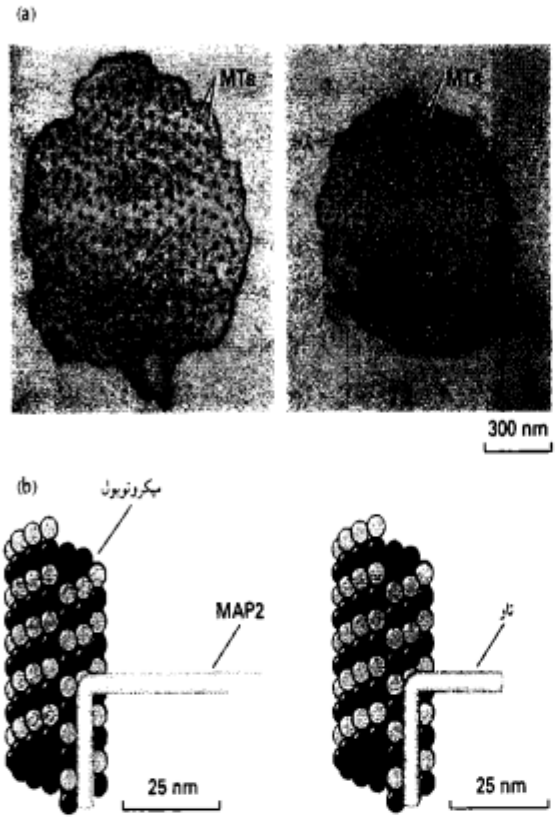
■ میکروتوبول‌هایی که از سانتروزوم شروع به رشد می‌کنند و آنهایی که ناپایداری دینامیکی دارند می‌توانند در درون سیتوپلاسم جستجو کرده و توسط ساختارها یا اندامک‌هایی که انتهای (+) آنها را پایدار می‌کند، به دام بیفتند. بدین طریق، سنتز میکروتوبول‌ها به همراه «جستجو و به دام اندازی» می‌تواند در توزیع کلی میکروتوبول‌ها در سلول نقش داشته باشد.

۱۸ـ۳ تنظیم ساختار و دینامیک میکروتوبول‌ها

اگرچه دیواره میکروتوبول‌ها از دایمرهای توبولین $\alpha\beta$ ساخته شده است، با این حال در *In Vitro* پلیمریزاسیون توبولین‌های $\alpha\beta$ کاملاً خالص به میکروتوبول‌ها، تنها تحت شرایط فیزیولوژیک ویژه امکان‌پذیر می‌باشد. پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در *In Vitro* تحت شرایط فیزیولوژیک نیازمند حضور پروتئین‌های پایدارکننده متصل به میکروتوبول‌ها یا MAPها می‌باشد. MAPهای تثبیت‌کننده تنها یک گروه از پروتئین‌ها را شامل می‌شوند که با توبولین‌های میکروتوبول‌ها میانکنش می‌دهند و بقیه گروه‌های پروتئینی ویژگی‌های رشدی آنها را تغییر داده یا آنها را ناپایدار می‌کنند. ماگروه‌های مختلف آنها را به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار می‌دهیم.

میکروتوبول‌ها توسط پروتئین‌های متصل‌شونده جانبی و انتهایی پایدار می‌شوند

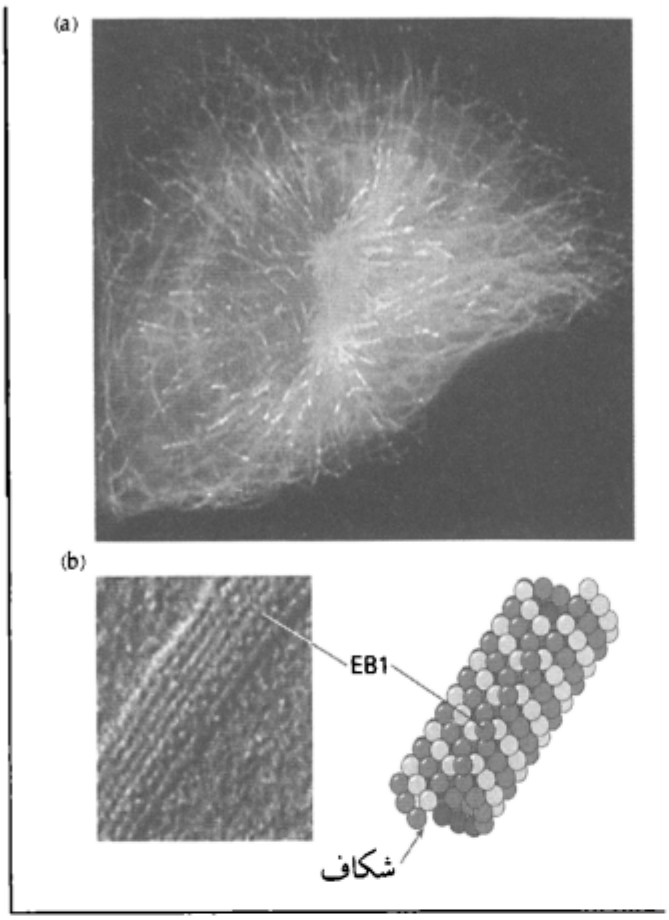
چندین گروه متفاوت از پروتئین‌ها سبب استحکام میکروتوبول‌ها می‌شوند که بسیاری از آنها دارای بیان ویژه سلولی می‌باشد. از بین پروتئین‌های این گروه که به‌طور کامل مطالعه شده است، می‌توان پروتئین‌های خانواده ***tau*** را نام برد که شامل پروتئین MAP2, tau و MAP4 می‌باشند. این پروتئین‌ها دارای ساختار چندقسمتی هستند که شامل یک توالی ۱۸ اسید آمینه‌ای که دارای بار مثبت بوده و ۳ الی ۴ بار تکرار شده و به سطح توبولین‌های دارای بار منفی اتصال می‌یابد و یک دُمین که از دیواره میکروتوبول به سمت خارج امتداد می‌یابد، می‌باشند (شکل ۱۴ـ۱۸). عقیده بر این است که پروتئین‌های tau میکروتوبول‌ها را پایدار نموده و به عنوان فاصله انداز[1] بین آنها عمل می‌کند (شکل ۱۴ـ۱۸). MAP2 تنها در دندریت‌ها وجود دارد که پل‌های عرضی بین میکروتوبول‌ها تشکیل داده و میکروتوبول‌ها را به فیلامنت‌های حد واسط متصل می‌کند. پروتئین tau، که بسیار کوچک‌تر از دیگر پروتئین‌های MAP می‌باشد، در آکسون‌ها و دندریت‌ها وجود دارد، ولی علت این‌که چرا در هر دو مورد وجود دارد، هنوز مشخص نشده است.



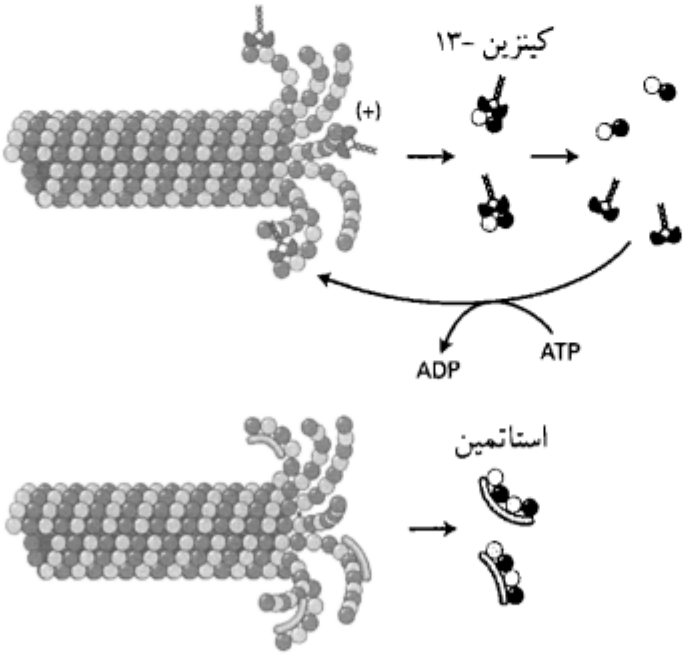
▲ **شکل ۱۴ـ۱۸** فاصله میکروتوبول‌ها از هم وابسته به طول دُمین بیرونی پروتئین‌های متصل‌شونده به میکروتوبول می‌باشد. سلول‌های حشره به منظور بیان پروتئین MAP2 که دارای یک بازوی دراز می‌باشد و یا به منظور بیان پروتئین tau، که دارای یک بازوی کوتاه می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. (a) میکروگراف‌های الکترونی از برش‌های عرضی فرایندهای القا شده توسط بیان MAP2 (چپ) یا tau (راست)، در سلول‌های تغییر شکل یافته حشره. توجه نمایید که فاصله بین میکروتوبول‌ها (MTs) در سلول‌های حاوی پروتئین MAP2 بیشتر از سلول‌های حاوی پروتئین tau می‌باشد. هر دو نوع سلول‌ها حاوی تقریباً تعداد یکسانی از میکروتوبول‌ها می‌باشند، ولی در اثر پروتئین MAP2 فاصله میکروتوبول‌ها بیشتر می‌باشند. (b) دیاگرام‌هایی از ارتباط بین میکروتوبول‌ها و MAPها. به تفاوت طول بین بازوهای بیرونی شده در MAP2 و پروتئین tau توجه کنید.

زمانی که پروتئین‌های پایدارکننده MAP دیواره خارجی یک میکروتوبول را می‌پوشانند، باعث افزایش سرعت رشد میکروتوبول‌ها و یا مهار فرکانس تخریب آنها می‌شوند. در بسیاری از موارد، فعالیت پروتئین‌های MAP از طریق فسفریلاسیون برگشت‌پذیر دُمین

1- Spacer



◀ شکل ۱۵-۱۸(شکل رنگی) پروتئین TIP+، EB1 به انتهای (+) میکروتوبول‌ها متصل می‌شود. (a) یک سلول کشت داده شده که توسط آنتی‌بادی ضد توبولین (سبز) و پروتئین TIP+، EB1 (قرمز) رنگ‌آمیزی شده است. EB1 به‌طور فراوانی در انتهای (+) میکروتوبول وجود دارد. (b) مطالعات *In Vitro* با استفاده از میکروگراف‌های الکترونی و مدل نشان می‌دهد که EB1 به‌طور اختصاصی به رشته میکروتوبول متصل می‌شود، ولی این‌که چگونه این اتصال منجر به تجمع این پروتئین در انتهای (+) میکروتوبول می‌شود، هنوز ناشناخته می‌باشد.



◀ شکل ۱۶-۱۸ پروتئین‌هایی که انتهای میکروتوبول‌ها را ناپایدار می‌کنند. (a) یک عضو از خانواده کینزین - ۱۳ که در انتهای میکروتوبول به مقدار زیاد وجود دارد می‌تواند باعث افزایش تخریب آن ناحیه می‌شود. این پروتئین‌ها خاصیت ATPase داشته و ATP فعالیت آنها را از طریق جدا نمودن آنها از دایمر توبولین $\alpha\beta$ افزایش می‌دهد. (b) استاتمین به‌طور انتخابی به پروتوفیلامنت‌های منحنی‌شکل اتصال یافته و جدا شدن آنها از انتهای میکروتوبول را افزایش می‌دهند. فعالیت استاتمین توسط فسفریلاسیون مهار می‌شود.

بیرونی آنها تنظیم می‌شود. پروتئین‌های MAP فسفریله شده قادر به اتصال به میکروتوبول‌ها نمی‌باشند؛ بنابراین فسفریلاسیون سبب افزایش سرعت جدا شدن توبولین‌ها و کاهش رشد میکروتوبول می‌شود. به عنوان مثال، کیناز تنظیم‌کننده تمایل میکروتوبول[1] (MARK/ Par-1) یک تنظیم‌کننده کلیدی پروتئین‌های tau می‌باشد. برخی از پروتئین‌های MAP توسط **کیناز وابسته به**

1- Microtubul-affinity-regulating kinase

سیکلین (CDK) که نقش مهمی در کنترل فعالیت پروتئین‌ها در طی چرخه سلولی دارند، فسفریله می‌شوند (بخش ۲۰).

اخیراً برخی از پروتئین‌های MAP شناسایی شده‌اند که توانایی فوق‌العاده‌ای در اتصال به انتهای (+) میکروتوبول‌ها دارند. (شکل ۱۵-۱۸). این گروه از پروتئین‌ها تحت عنوان TIPs+ نامیده می‌شوند و زمانی که در نوک میکروتوبول قرار می‌گیرند، عملکردهای مختلفی انجام می‌دهند. برخی از TIPs+ها به‌طور انتخابی سبب افزایش پایداری انتهای (+) در مقابل فروگشت شده و یا فرکانس رشد میکروتوبول را افزایش داده و بنابراین منجر به رشد مداوم میکروتوبول می‌شوند. برخی دیگر از TIPsها پروتئین‌های اتصالی هستند، به‌طوری که وقتی میکروتوبول در حال رشد به یک ساختار یا اندامک برخورد می‌کند، توانایی اتصال به آن را پیدا می‌کند. به عنوان مثال، میکروتوبول‌هایی که به سمت لبه پیشرو یک سلول در حال مهاجرت امتداد می‌یابند از طریق اتصال به اجزاء موجود در آنجا، پایدار می‌شوند.

میکروتوبول‌ها توسط پروتئین‌های متصل‌شونده به انتها و پروتئین‌های جداکننده، تجزیه می‌شوند.

مانند میکروفیلامنت‌ها، مکانیسم‌هایی برای افزایش تجزیه میکروتوبول‌ها نیز وجود دارد. اگرچه بیشتر تنظیمات دینامیکی میکروتوبول‌ها به نظر می‌رسد که در انتهای (+) رخ می‌دهد، ولی در برخی مواقع مانند میتوز، این تنظیم در هر دو انتها انجام می‌شود. سه مکانیسم برای ناپایدار کردن میکروتوبول شناخته شده است. در یکی از این مکانیسم‌ها خانواده پروتئینی کینزین- ۱۳ نقش دارد (شکل ۱۶-۱۸). پروتئین‌های کینزین - ۱۳ با اتصال به توبولین‌ها باعث انحنادار شدن توبولین‌های انتهای پروتوفیلامنت می‌شوند که شبیه ساختمان فضایی GDP-β- توبولین می‌باشد. سپس این پروتئین سبب تسهیل برداشت دایمرهای توبولین انتهایی شده و بدین طریق به‌طور زیادی فرکانس تخریب میکروتوبول را افزایش می‌دهد. این پروتئین‌ها از نظر کاتالیزی طوری عمل می‌کنند که برای برداشت متوالی دایمرهای توبولین انتهایی نیازمند هیدرولیز ATP باشند (شکل ۱۶-۱۸). پروتئین دیگر Op18 / استاتمین برای اولین بار به صورت یک پروتئین با بیان بسیار بالا در برخی سرطان‌ها شناسایی شد؛ بنابراین بخشی از نام آن انکوپروتئین ۱۸ اخذ شده است. این پروتئین اندازه کوچکی دارد و به دایمرهای توبولین خمیده که ساختمان فضایی شبیه به GDP-β- توبولین دارند، متصل می‌شود و باعث افزایش سرعت تجزیه می‌شود. این پروتئین از طریق افزایش هیدرولیز GTP در دایمرهای توبولین انتهایی عمل کرده و به جداسازی آنها از انتهای میکروتوبول کمک می‌کند. همان‌طور که برای یک ترکیب تنظیم‌کننده انتهاهای میکروتوبول انتظار می‌رود، فعالیت آن به‌طور منفی توسط فسفریلاسیون تعداد گوناگونی از کینازها تنظیم می‌شود. در حقیقت مشخص شده است که Op18 / استاتمین به وسیله فسفریلاسیون در لبه پیشرو سلول‌های متحرک غیر فعال می‌شود که این امر در رشد سریع میکروتوبول‌های ناحیه جلو سلول نقش دارد.

سومین مکانیسم در ناپایدار کردن میکروتوبول‌ها، عمل یک پروتئین تحت عنوان کاتانین (گرفته شده از لغت ژاپنی «شمشیر») انجام می‌شود. کاتانین دارای نقش مهمی در MTOCs بوده که در رهاسازی میکروتوبول‌های قلاب شده نقش دارد.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۸

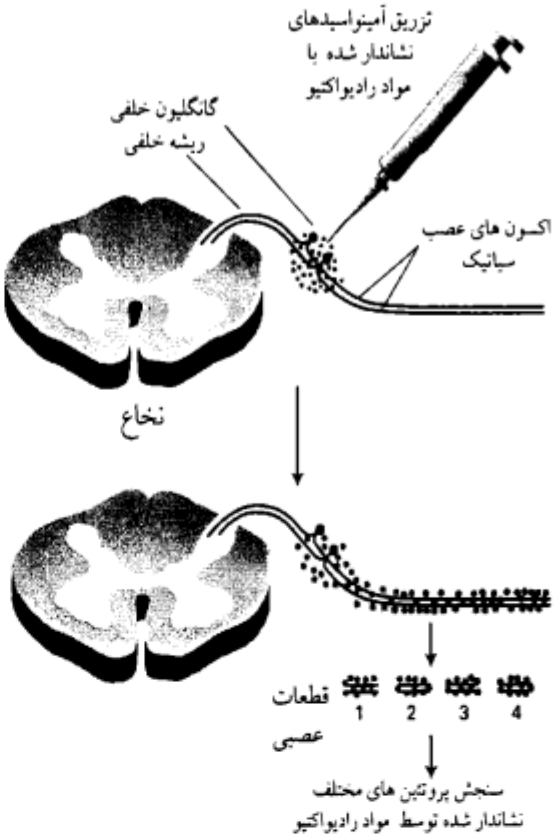
تنظیم ساختار و دینامیک میکروتوبول

- میکرتوبول‌ها از طریق اتصال جانبی با پروتئین‌های متصل به میکروتوبول، MAPs پایدار می‌شوند (شکل ۱۴-۱۸ را ملاحظه کنید).
- برخی MAPها، تحت عنوان TIPs+ به‌طور انتخابی به انتهای (+) میکروتوبول‌ها اتصال یافته و قادر به تغییر ویژگی‌های دینامیکی میکروتوبول یا جابجایی ترکیبات در راستای انتهای (+) میکروتوبول می‌باشد. شکل ۱۵-۱۸ را ملاحظه کنید).
- انتهاهای میکروتوبول‌ها به وسیله برخی پروتئین‌ها، از قبیل خانواده پروتئینی کینزین - ۱۳ و استاتمین، ناپایدار می‌شوند که این امر سبب افزایش تخریب میکروتوبول‌ها می‌شود (شکل ۱۶-۱۸ را ملاحظه کنید).

۴-۱۸ کینزین‌ها و دایینئین‌ها: پروتئین‌های موتوری وابسته به میکروتوبول

اندامک‌های درون سلول به‌طور مداوم فواصل طولانی در حد چند میکرومتر را در مسیرهای مشخص طی می‌کنند و در مکان‌های ویژه‌ای قرار می‌گیرند. در این موارد انتشار، تنها دلیل سرعت، جهت‌گیری معین و مقصد این‌گونه فرایندهای انتقالی نمی‌باشد. یافته‌های حاصل از آزمایشات اولیه به کمک سلول‌های رنگدانه‌ای فلس ماهی و سلول‌های عصبی نشان‌داد که میکروتوبول‌ها به عنوان مسیرهای حرکت نقل و انتقالات انواع محموله‌ها عمل می‌کنند.

پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها با استفاده از



▲ **شکل ۱۷ـ۱۸ (شکل رنگی) سرعت انتقالی اکسونی را می‌توان در *In Vitro* به وسیله نشان‌دار کردن با مواد رادیواکتیو و الکتروفورز ژل تعیین کرد.** اجسام سلولی نورون‌های عصب سیاتیک در گانگلیای ریشه - خلفی (نزدیک طناب نخاعی) قرار دارند. اسیدهای آمینه رادیواکتیو تزریق شده به درون این گانگلیاها در موجودات آزمایشگاهی در سنتز پروتئین‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرندکه این پروتئین‌ها نهایتاً از طریق آکسون به سیناپس انتقال داده می‌شوند. سپس حیوانات مورد آزمایش در زمان‌های گوناگون پس از تزریق، تکه‌تکه شده و عصب سمپاتیک به قطعات کوچک‌تر بریده می‌شود و بدین طریق می‌توان تشخیص داد که پروتئین‌های نشان‌دار شده چه مسافتی طی کرده‌اند. این پروتئین‌ها را پس از الکتروفورز ژل و اتورادیوگرافی می‌توان شناسایی کرد. نقاط قرمز، آبی و ارغوانی نشان‌دهنده گروه‌های پروتئینی هستند که در سرعت‌های مختلف در طول اکسون انتقال داده می‌شوند. قرمز بیشترین سرعت و ارغوانی کمترین سرعت را دارند.

انرژی حاصل از هیدرولیز GTP انجام می‌شود. به علاوه حرکت **پروتئین‌های موتوری** در طول میکروتوبول‌ها به کمک انرژی حاصل از هیدرولیز ATP می‌باشند. مشخص شده است که دو خانواده عمده از پروتئین‌های موتوری ـ **کینزین‌ها و داینئین‌ها** ـ در انتقال محموله در طول میکروتوبول‌ها نقش دارند. در این قسمت، چگونگی عملکرد این پروتئین‌ها و وظایفی که آنها در سلول‌های اینترفازی انجام می‌دهند را مورد بررسی قرار خواهیم داد. در بخش‌های بعدی عملکردهای آنها را در مژک و تاژک و در میتوز مورد بحث قرار می‌دهیم.

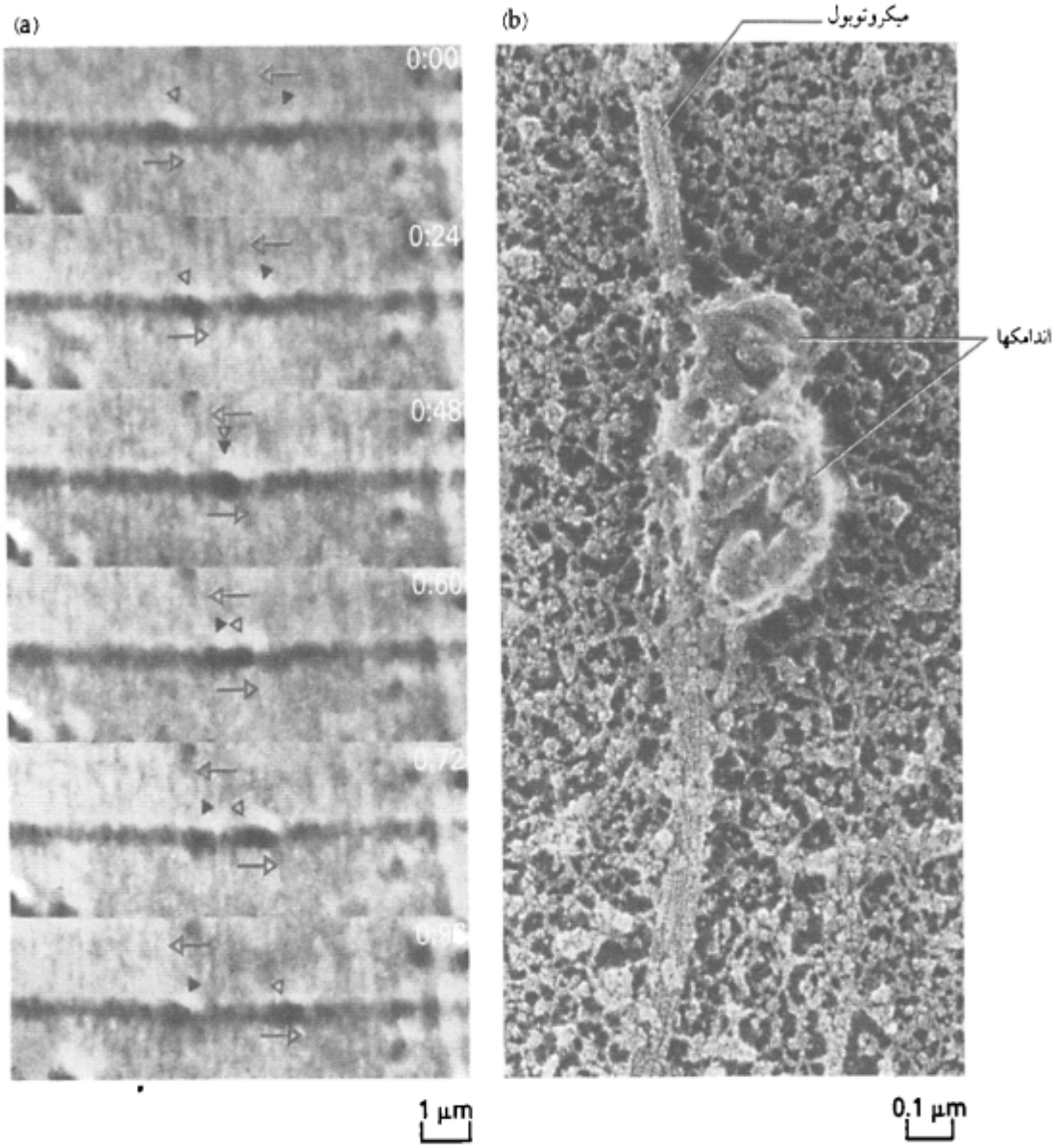
در اکسون‌ها، اندامک‌ها در طول میکروتوبول‌ها در هر دو جهت انتقال داده می‌شوند

یک نورون بایستی به‌طور مداوم مواد جدید ـ پروتئین‌ها و غشاها ـ را برای یک پایانه اکسونی تأمین نماید تا بتواند مواد از دست رفته در طی فرایند اگزوسیتوز میانجی‌های عصبی در محل اتصال با سلول دیگر (سیناپس) را تأمین کند (بخش ۲۳). از آن جایی که پروتئین‌ها و غشاها ابتدا در درون جسم سلولی سنتز می‌شوند، در نتیجه بایستی از طریق آکسون که گاهی طول آن به یک متر هم می‌رسد، به ناحیه سیناپس منتقل شوند. این حرکت مواد بر روی میکروتوبول‌هایی انجام می‌شود که انتهای (+) تمامی آنها به سمت انتهای آکسون جهت‌گیری نموده‌اند (شکل ۵c ـ ۱۸ را ملاحظه کنید).

نتایج حاصل از آزمایشات کلاسیک تعقیب ضربان[1] که در آن پیش‌سازهای رادیواکتیو به درون گانگلیای ریشه خلفی نزدیک نخاع تزریق شد و سپس در طول آکسون‌های عصبی ردیابی شده‌اند، نشان داد که **انتقال اکسونی** در دو جهت رخ می‌دهد. انتقال رو به جلو[2] از جسم سلولی تا پایانه‌های سیناپس انجام می‌شود و با رشد آکسونی و آزادسازی وزیکول‌های سیناپسی همراه می‌باشد. در مقابل، در انتقال برگشتی[3] مواد قدیمی و فرسوده از پایانه‌های سیناپسی به سمت جسم سلولی می‌روند و در آنجا در درون لیزوزوم تجزیه می‌شوند. یافته‌های حاصل از این قبیل آزمایشات هم‌چنین نشان داده که مواد مختلف با سرعت‌های متفاوت حرکت می‌کنند (شکل ۱۷ـ۱۸). بالاترین سرعت انتقال مربوط به وزیکول‌های محصور شده با غشاء می‌باشد که دارای سرعتی حدود ۳ $\mu m/s$، یا ۲۵۰ $\frac{mm}{روز}$ می‌باشند. بدین ترتیب برای انتقال ماده از یک جسم سلولی پشت بدن شما به یک آکسون که به انگشت بزرگ پای شما ختم می‌شود، چیزی حدود ۴ روز زمان نیاز است. کمترین سرعت انتقال مربوط به زیرواحدهای توبولین و نوروفیلامنت‌ها (فیلامنت‌های حد واسط موجود در نورون‌ها) می‌باشد که چیزی حدود ۱ میلی‌متر در روز می‌باشد. اندامک‌هایی مانند میتوکندری‌ها در طول آکسون با سرعت متوسط حرکت می‌کنند.

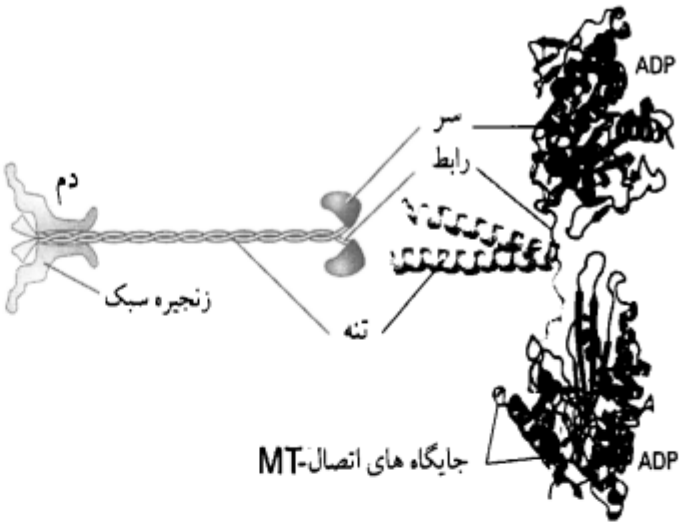
1- Pulse-chase

2- Anterograde 3- Retrograde



▲ **شکل ۱۸-۱۸ میکروسکوپیDIC انتقال وابسته به میکروتوبول وزیکول را در *In Vivo* نشان می‌دهد.** (a) سیتوپلاسم از اکسون بزرگ ماهی مرکب بر روی یک لامل شیشه انتقال داده شد. پس از این‌که بافر حاوی ATP به محلول مربوطه اضافه شد، توسط میکروسکوپ اختلاف تداخلی افتراقی (DIC) مشاهده شد و تصاویر حاصل بر روی نوار ویدئو ضبط گردید. در تصاویر متوالی نشان داده شده، دو اندامک که با مثلث‌های توخالی و توپُر نشان داده شده‌اند در خلاف جهت یکدیگر حرکت می‌کنند (توسط فلش‌های رنگی جهت حرکت آنها مشخص شده است). این حرکت در طول یک فیلامنت انجام می‌شود و دو اندامک از یکدیگر عبور کرده و به حرکت خود در جهت اصلی ادامه می‌دهند. زمان سپری شده برحسب ثانیه در گوشه سمت راست بالای هر تصویر نشان داده شده است. (b) ناحیه‌ای از سیتوپلاسم مشابه با آنچه که در بخش (a) نشان داده شد، فریزدرای شده و توسط پلاتینیوم سایه‌دهی شد و در زیر میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد. دو ساختمان بزرگ که به میکروتوبول متصل شده‌اند، قابل مشاهده می‌باشند. این ساختارها به احتمال زیاد وزیکول‌های کوچکی هستند که در امتداد میکروتوبول در حال حرکت بوده‌اند و در زمانی که محلول منجمد شد تثبیت شدند.

انتقال آکسونی به‌طور مستقیم از طریق ویدئو میکروسکوپی عصاره‌های سیتوپلاسمی حاصل از آکسون بزرگ یک ماهی مرکب قابل مشاهده می‌باشد. حرکت وزیکول‌ها در طول میکروتوبول‌ها در



◀ شکل ۱۹ـ۱۸ ساختار کینزین -1. (a) نمایش کینزین -1، با دو زنجیره سنگین آن که هر یک دارای یک دُمین موتوری بوده و به زنجیره‌های سبک اتصال یافته‌اند. ناحیه سری به وسیله یک دمین رابط انعطاف‌پذیر به تنه مارپیچ‌شکل اتصال یافته است. (b) ساختار اشعه X سرهای کینزین به همراه میکروتوبول و جایگاه‌های اتصال نوکلئوتید.

این سیستم فاقد سلول[1] نیازمند ATP بوده و سرعت آن مشابه سرعت انتقال آکسونی در سلول‌های سالم می‌باشد و این عمل در هر دو جهت پیشرونده و برگشتی قابل انجام می‌باشد (شکل ۱۸a ـ۱۸). تصاویر میکروسکوپ الکترونی همان ناحیه در سیتوپلاسم آکسون نشان می‌دهد که اندامک‌ها به میکروتوبول‌های ویژه اتصال دارند (شکل ۱۸b ۱۸). این آزمایشات اولیه *In Vitro* دقیقاً ثابت نمود که اندامک‌ها در طول میکروتوبول‌های منفرد ویژه حرکت می‌کنند و حرکت آنها نیازمند ATP می‌باشد.

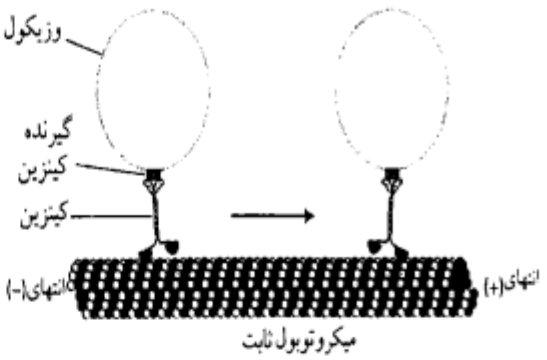
نتایج حاصل از یک سری آزمایشات که در آنها نوروفیلامنت‌ها با پروتئین فلورسانس سبز (GFP) نشان‌دار شده و سپس به درون سلول‌های کشت داده شده تزریق شده بود، نشان داد که نوروفیلامنت‌ها در طی حرکت در آکسون متحمل توقف‌های پی در پی می‌شوند. اگرچه سرعت حداکثر نوروفیلامنت‌ها مشابه سرعت وزیکول‌های سریع است، با این حال توقف‌های فراوان آنها میانگین سرعت انتقال را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها حاکی از این است که تفاوت مهمی بین انتقال کند و سریع آکسونی وجود ندارد، با وجود این، هنوز علت این توقف‌های دوره‌ای در انتقال نوروفیلامنت‌ها شناخته نشده است.

کینزین- 1 وزیکول‌ها را در آکسون‌ها به سمت جلو و انتهای (+) میکروتوبول‌ها جابجا می‌کند

اولین بار پروتئین مسئول انتقال اندامک‌ها از عصاره اکسونی تخلیص و جداسازی شد. محققین مشاهده کردند که از طریق مخلوط نمودن سه ترکیب ـ اندامک‌های خالص شده از آکسون‌های ماهی مرکب، عصاره سیتوپلاسمی بدون اندامک آکسونی و میکروتوبول‌های پایدار شده توسط تاکسول ـ اندامک‌ها طی فرایند وابسته به ATP قادر به حرکت بر روی میکروتوبول‌ها می‌شوند. با این وجود، هرگاه آنها عصاره اکسونی را حذف کردند، اندامک‌ها نه قادر به اتصال و نه قادر به حرکت در امتداد میکروتوبول‌ها بودند. این امر نشان می‌دهد که عصاره مربوطه حاوی یک پروتئین موتوری می‌باشد. استراتژی تخلیص پروتئین موتوری بر اساس مشاهدات حرکت اندامک‌ها بر روی میکروتوبول‌ها می‌باشد. مشخص شده است که اگر ATP به ADP هیدرولیز شود، اندامک‌ها از میکروتوبول جدا می‌شوند. با این حال، اگر آنالوگ ATP یعنی AMPPNP که غیر قابل هیدرولیز شدن می‌باشد، اضافه شود اندامک‌ها به صورت متصل به میکروتوبول باقی مانده ولی قادر به حرکت نمی‌باشند. این یافته نشان می‌دهد که پروتئین موتوری اندامک‌ها را در زمانی که AMPPNP وجود دارد به طور محکمی به میکروتوبول متصل نموده، اما زمانی که AMPPNP با ATP جایگزین شود و به دنبال آن ATP به ADP هیدرولیز شود، اندامک از میکروتوبول جدا می‌شود. محققین با استفاده از این سرنخ پروتئین موتوری را تخلیص کردند.

کینزین -۱ تخلیص شده از آکسون‌های ماهی مرکب شامل یک پروتئین با دو زنجیره سنگین می‌باشد که هر یک از آنها به یک زنجیره کوچک اتصال یافته است و دارای وزن مولکولی حدود ۳۸۰/۰۰۰ می‌باشد. این مولکول متشکل از یک جفت دُمین سر کروی بوده که توسط دُمین رابط کوتاهی، که انعطاف‌پذیر بوده، به یک تنه مرکزی بلند اتصال یافته و در انتها دارای یک جفت دُمین دمی

1- Cell-free system



▲ **شکل ۲۰ـ۱۸ مدل انتقال وزیکول که توسط کینزین -1 کاتالیز می‌شود.** مولکول‌های کینزین -1، متصل به گیرنده‌های سطح وزیکول، سبب انتقال وزیکول‌ها از انتهای (-) به انتهای (+) یک میکروتوبول ثابت می‌شوند. برای انجام این حرکت نیاز به ATP می‌باشد.

کوتاه کروی می‌باشد که به زنجیره‌های سبک چسبیده است (شکل ۱۰ـ۱۸). هر دُمین عمل ویژه‌ای را انجام می‌دهد: دُمین سری که به میکروتوبول‌ها و ATP متصل می‌شود، مسئول فعالیت موتوری کینزین می‌باشد؛ دُمین رابط در حرکت به سمت جلو ضروری می‌باشد؛ دُمین تنه در دایمر شدن دو زنجیره سنگین نقش دارد و دُمین دمی مسئول اتصال به گیرنده‌های موجود در غشاء محموله می‌باشد.

حرکت وابسته به کینزین -۱ وزیکول‌ها را می‌توان از طریق آزمایشات حرکتی در *In Vitro* مشابه آزمایشات مورد استفاده در مطالعه حرکات وابسته به میوزین ردیابی کرد (شکل ۲۱ـ۱۷ را ملاحظه کنید). در این نوع آزمایشات، یک وزیکول یا یک دانه پلاستیکی پوشیده شده با کینزین -۱ به یک سطح شیشه‌ای حاوی میکروتوبول‌های تثبیت شده اضافه می‌شود. در حضور ATP، با استفاده از میکروسکوپ می‌توان حرکت این دانه‌ها را در امتداد میکروتوبول‌ها و در یک جهت مشاهده نمود. محققین کشف نموده‌اند که دانه‌های پوشیده شده با کینزین -۱ همیشه از انتهای (-) به سمت انتهای (+) یک میکروتوبول حرکت می‌کنند (شکل ۲۰ـ۱۸). بنابراین کینزین -۱ یک پروتئین موتوری بوده که به سمت انتهای (+) میکروتوبول حرکت می‌کند و شواهد دیگر نشان می‌دهد که این پروتئین انتقال آکسونی را تنظیم می‌کند.

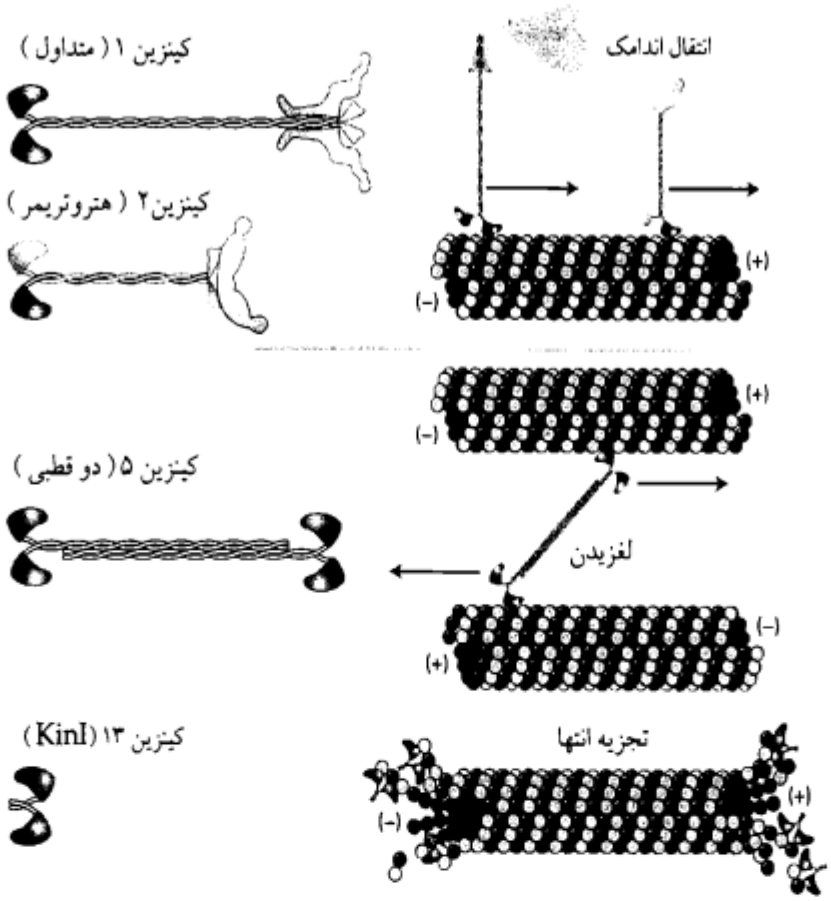
کینزین‌ها خانواده پروتئینی بزرگ هستند که دارای به عملکردهای مختلف می‌باشند

به دنبال کشف کینزین -۱، با استفاده از غربال‌گری‌های ژنتیکی و روش‌های بیولوژی مولکولی، تعداد زیادی از پروتئین‌هایی که دارای دُمین‌های موتوری شبیه کینزین بودند، کشف گردید. در حال حاضر ۱۴ دسته مهم از کینزین‌ها در جانوران وجود دارند که دارای توالی اسید آمینه‌ای هومولوگ با دُمین موتوری کینزین 1 می‌باشند. این خانواده پروتئینی توسط ۴۵ ژن کد می‌شوند. اگرچه عملکرد تمامی این پروتئین‌ها هنوز مشخص نشده است، با این حال تعدادی از کینزین‌هایی که به‌طور کامل مطالعه شده‌اند، در فرایندهایی از قبیل انتقال اندامک، mRNA، و کروموزوم و لغزش میکروتوبول‌ها بر روی هم و دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها نقش دارند.

همانند گروه‌های مختلف موتورهای میوزینی، دُمین موتوری کینزین با گروه‌های متفاوت دُمین‌های غیر موتوری ترکیب می‌شود (شکل ۲۱ـ۱۸). در حالی که کینزین-۱ دارای ۲ زنجیره سنگین و ۲ زنجیره سبک می‌باشد، اعضای خانواده کینزین -۲ که در انتقال اندامک نقش دارند، دارای دو دُمین موتوری متفاوت با زنجیره سنگین و یک زنجیره پلی‌پپتیدی سوم می‌باشند که این زنجیره به ناحیه دم چسبیده و در انتقال محموله نقش دارد. اعضای خانواده دوقطبی کینزین -۵ دارای چهار زنجیره سنگین بوده و تشکیل موتورهای دوقطبی می‌دهند که میکروتوبول‌های ناهمسو را به سمت انتهاهای (+) می‌کشند. موتورهای کینزین-۱۴ تنها کلاس پروتئینی شناخته شده هستند که به سمت انتهای (-) یک میکروتوبول حرکت می‌کنند ودر فرایند میتوز نقش دارند. نوع دیگر این پروتئین‌ها، یعنی خانواده کینزین- ۱۳ دارای دو زیرواحد و یک دُمین مرتبط به کینزین در میانه پلی‌پپتید می‌باشند. پروتئین‌های کینزین- ۱۳ خاصیت موتوری ندارند ولی خاطر نشان می‌شود که اینها، پروتئین‌های هیدرولیزکننده ATP هستند و پلیمریزاسیون انتهاهای میکروتوبول را افزایش می‌دهند (شکل ۱۶ـ۱۸ را ملاحظه کنید).

کینزین ـ۱ یک موتور پروتئینی بسیار پردازشگر می‌باشد

چگونه کینزین ـ ۱ بر روی یک میکروتوبول حرکت می‌کند؟ عموماً از تکنیک‌های نوری و نشان‌دار کردن توسط مواد فلورسانس، مشابه با روش‌های استفاده شده برای شناسایی میوزین (شکل‌های ۲۶ـ۱۷، ۲۷ـ۱۷ و ۲۸ـ۱۷ را ملاحظه کنید) برای مطالعه این‌که چگونه کینزین ـ ۱ بر روی یک میکروتوبول حرکت می‌کند و این‌که چگونه انرژی حاصل از هیدرولیز ATP به کار مکانیکی تبدیل می‌شود، استفاده شده است. این قبیل آزمایشات نشان می‌دهد که کینزین یک موتور پروتئینی با قدرت پردازش بالا می‌باشد، به‌گونه‌ای که بدون جدا شدن از سطح میکروتوبول قادر به طی مسافت‌های

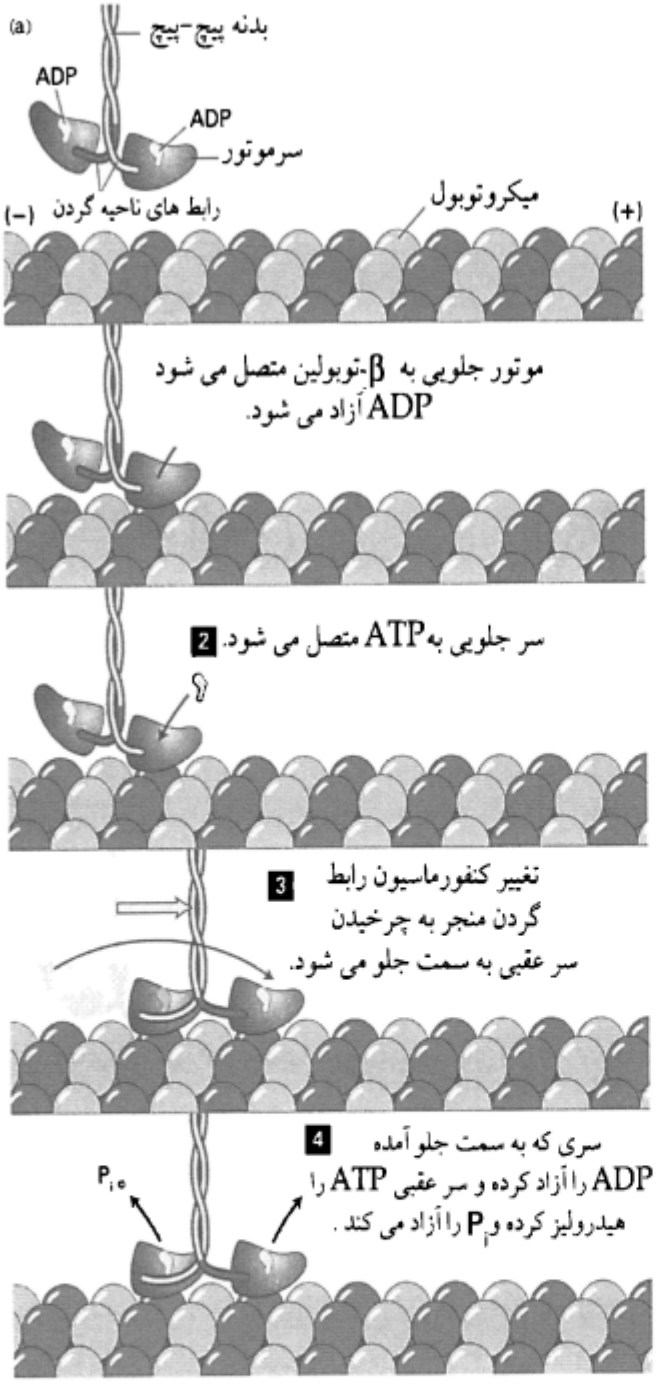


▲ **شکل ۲۱ـ۱۸ ساختار و عملکرد اعضای مهم فوق خانواده پروتئین کینزین.** کینزین-۱ که اولین کینزین جدا شده از آکسون‌های ماهی مرکب می‌باشد، یک موتور جهت‌دهی شده به سمت انتهای (+) میکروتوبولی می‌باشد که در انتقال اندامک نقش دارد. خانواده کینزین ۲ دارای دو زنجیره سنگین متفاوت، ولی بسیار نزدیک به هم و یک زیرواحد متصل‌شونده به محموله می‌باشد. این گروه پروتئینی نیز اندامک‌ها را در جهت (+) میکروتوبول انتقال می‌دهند. خانواده کینزین - ۵ دارای چهار زنجیره سنگین می‌باشد که دارای ساختار دوقطبی بوده و بدین ترتیب با دو میکروتوبول ناهمسو میانکنش داده و به سمت انتهای (+) حرکت می‌کند. اعضای خانواده کینزین- ۱۳ دارای دُمین موتوری در ناحیه میانی زنجیره‌های سنگین‌شان هستند و فاقد فعالیت موتوری هستند، اما انتهاهای میکروتوبول‌ها را ناپایدار می‌کنند. اعضای دیگر خانواده کینزین در متن آورده شده‌اند. کینزین‌های مختلف دارای اسامی متفاوتی هستند که تعدادی از آنها در داخل پرانتزها نشان داده شده‌اند.

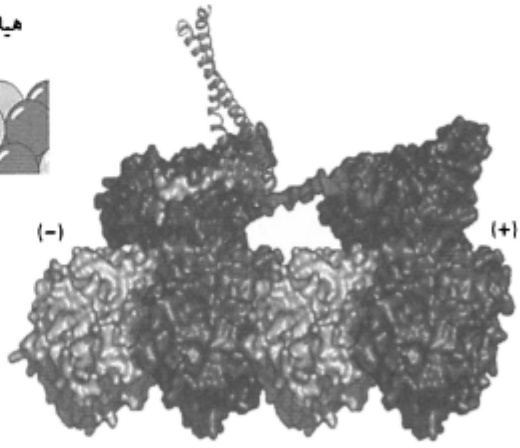
طولانی و پشت سر هم بر روی یک میکروتوبول می‌باشد. در طی این فرآیند، مولکول دو سر[1]، گام‌های ۸ نانومتری از یک زیرواحد توبولین β تا توبولین β بعدی را در طول یک پروتوفیلامنت میکروتوبول طی می‌کند. این امر هر سر را ملزم می‌کند که گام‌های ۱۶ نانومتری بردارد. این دو سر به طریقی کاملاً هماهنگ با دم کار می‌کنند به گونه‌ای که همواره یکی از آنها به حالت متصل به میکروتوبول می‌باشد.

چرخه ATP حرکت کینزین-۱ به سادگی با شروع از سر جلویی بدون نوکلئوتید قابل مشاهده می‌باشد. تحت این شرایط آن به‌طور محکم به زیرواحد β پروتوفیلامنت متصل می‌باشد و سر عقبی دارای که دارای ADP می‌باشد دارای اتصال ضعیف با پروتوفیلامنت است (شکل ۲۲ـ۱۸). انرژی حاصل از اتصال ATP به سر جلویی سبب حرکت رو به جلو دُمین رابط آن ناحیه می‌شود که سپس به‌طور فیزیکی این دُمین به دُمین مرکزی سر قلاب می‌شود. این حرکت منجر به حرکت دُمین رابط به سمت جلو شده و به‌طور فیزیکی سبب نوسان سر عقبی ـ همانند پرتاپ، رقاص بالت ـ به موقعیتی می‌شود که آن خود سر جلویی می‌شود. سر جلویی جدید زیرواحد β-توبولین بعدی را پیدا کرده و با جدا نمودن ADP به‌طور محکمی به آن متصل می‌شود. ضرورتاً این مرحله هم‌چنین سبب هیدرولیز ATP به ADP و آزادسازی P_i توسط سر عقبی جدید شده و اتصال آن را تضعیف می‌کند. سر جلویی اکنون آماده اتصال به

1- Double- headed

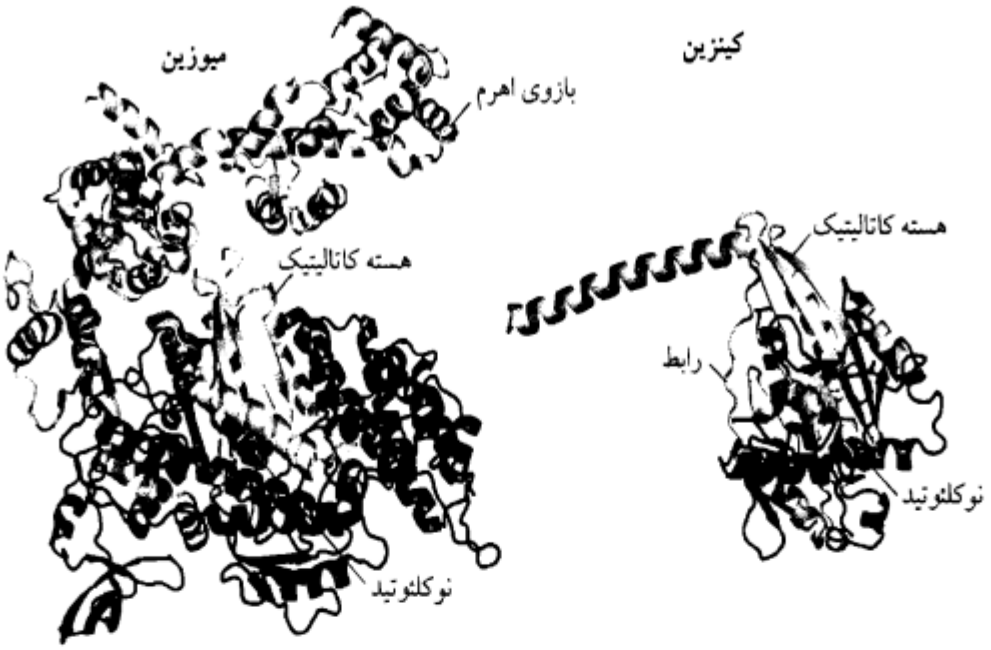


شکل ۲۲-۱۸ (شکل رنگی) کینزین -۱ با استفاده از ATP بر روی میکروتوبول قدم می‌زند. (a) چرخه با اتصال ADP به هر کدام از سرهای کینزین -۱ نشان داده شده است. اتصال یکی از سرها به زیرواحد β - توبولین میکروتوبول باعث جدا شدن ADP و در نتیجه سر بدون نوکلئوتید بطور محکم به میکروتوبول متصل می‌شود (مرحله ❶). سپس سر جلویی به ATP متصل می‌شود (مرحله ❷)، که این اتصال باعث القا تغییر کنفورماسیونی شده و سبب می‌شود ناحیه رابط به جلو حرکت کند و در دُمین سری قلاب شود و در نتیجه سر عقبی را به جلو پرتاب کند (مرحله ❸). سر جلویی به میکروتوبول متصل شده و ADP آزاد می‌شود که باعث می‌شود سر عقبی ATP را به ADP و P_i هیدرولیز کند (مرحله ❹). حال P_i آزاد شده است و سر عقبی می‌تواند از میکروتوبول جدا شود و چرخه تکرار شود. (b) مدل ساختاری سرهای کینزین (ارغوانی) که به زیرواحدهای β پروتوفیلامنتی در میکروتوبول متصل شده است. سر عقبی، در سمت چپ، به ATP متصل است و سر دیگر را به موقعیت جلو پرتاب می‌کند. توجه شد که چگونه دُمین رابط (زرد) در سر عقبی قلاب شده است در حالیکه دُمین رابط (قرمز) سر جلویی هنوز آزاد است.



مولکول ATP و نوسان سر عقبی به سمت جلو بوده و بدین ترتیب چرخه تکرار می‌شود. از آن‌جایی که این چرخه نیازمند اتصال محکم یکی از سرها به زیرواحد β- توبولین یک پروتوفیلامنت می‌باشد، بنابراین کینزین -۱ زمانی که بر روی یک میکروتوبول حرکت می‌کند به صورت پروتئین پردازشگر عمل می‌کند.

زمانی که ساختار اشعه X ناحیه سر کینزین تعیین گردید، یک مسئله بسیار شگفت‌انگیز آشکار شد و آن این بودکه هسته کاتالیتیک آن دارای ساختار کاملاً مشابه با میوزین می‌باشد (شکل ۲۳-۱۸). این مشاهده، علی‌رغم این‌که هیچ‌گونه توالی آمینواسیدی حفاظت شده‌ای وجود ندارد، قویاً دلالت بر وجود تکامل همگرا دارد که بر اساس آن می‌توان از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP در تولید کار استفاده نمود. به علاوه، ساختار سه بُعدی مشابهی در پروتئین‌های کوچک اتصالی به GTP، از قبیل Ras، نیز مشاهده شده است که در طی



▲ **شکل ۲۳ـ۱۸ (شکل رنگی) تکامل ساختاری همگرای هسته متصل‌شونده به ATP سرمیوزین و کینزین.** هسته‌های کاتالیتیک معمول میوزین و کینزین به رنگ زرد نشان داده شده‌اند، نوکلئوتید به رنگ قرمز و بازوی اهرم (برای میوزین II) و دمین رابط (برای کینزین 1) به رنگ ارغوانی روشن نشان داده شده است.

عمل هیدورلیز GTP دچار یک تغییر ساختمان فضایی می‌شوند (شکل ۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید).

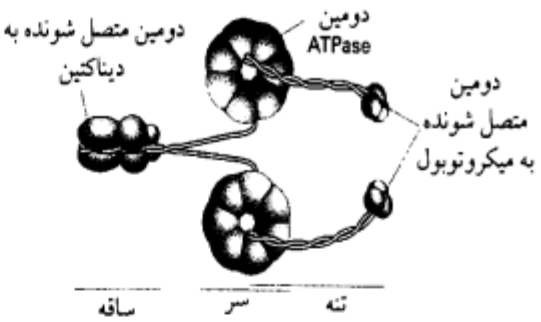
موتورهای دایـنئین اندامک‌ها را به سمت انتهای (-) میکروتوبول‌ها انتقال می‌دهند.

علاوه بر موتورهای کینزین که عموماً به صورت روبه جلو اندامک‌ها را در جهت (+) میکروتوبول‌ها را انتقال می‌دهند، سلول‌ها نیازمند نوع دیگری از موتورها، تحت عنوان دایئنین سیتوپلاسمی می‌باشند که اندامک‌ها را به طریق برگشتی و در جهت (-) میکروتوبول‌ها را انتقال دهند. این پروتئین موتوری بسیار بزرگ بوده و متشکل از دو زیرواحد بزرگ (>۵۰۰kDa)، دو زیرواحد متوسط و دو زیرواحد کوچک می‌باشد. آن مسئول انتقال برگشتی اندامک‌ها به سمت انتهای (-) میکروتوبول‌های موجود در آکسون‌ها و وابسته به ATP می‌باشد که در قسمت‌های بعدی بررسی می‌شوند. در مقایسه با میوزین‌ها و کینزین‌ها، خانواده پروتئینی دایئنین بسیار متنوع نیستند.

مانند کینزین -۱، دایئنین سیتوپلاسمی یک مولکول دو سر می‌باشد که از دو زنجیره سنگین یکسان یا تقریباً یکسان ساخته شده است. با این وجود، به دلیل اندازه بزرگ دُمین موتوری، دایئنین از نظر فعالیت مکانیکی کمتر شناخته شده است. یک زنجیره سنگین پروتئین دایئنین متشکل از یک تنه و یک دُمین سر کروی می‌باشد که دارای فعالیت ATPase بوده که از آن تنه خارج شده است (شکل ۲۴ـ۱۸). در انتهای این دم یک ناحیه اتصال برای میکروتوبول وجود دارد. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که قدرت حرکت دایئنین ناشی از چرخش دُمین سر کروی‌شکل باشد (شکل ۲۵ـ۱۸).

برخلاف کینزین 1، دایئنین به تنهایی قادر به انتقال مواد نمی‌باشد. درمقابل، انتقال توسط دایئنین نیازمند یک کمپلکس پروتئینی بزرگ تحت عنوان **دایناکتین**[1] می‌باشد که هم باعث اتصال دایئنین به محموله بار شده و هم فعالیت آن را تنظیم می‌کند (شکل ۲۶ـ۱۸). دایناکتین متشکل از ۱۱ زیرواحد می‌باشد که از نظر عملکردی به صورت دو دُمین سازماندهی شده‌اند. یکی از این دُمین‌ها از حدود هشت نسخه از پروتئین Arp1 ساخته شده که ساختاری اکتین مانند داشته و به شکل یک فیلامنت کوتاه می‌باشد. این انتها که شبیه انتهای (+) فیلامنت اکتین می‌باشد، به وسیله کلاهکی پوشیده شده است و تعدادی از زیرواحدهای آن با انتهای (-) اتصال دارند. این دُمین Arp مسئول اتصال به محموله بار می‌باشد. دُمین دُمین دایناکتین متشکل از یک پروتئین طویل به نام نمودن

1- Dynactin



▲ **شکل ۲۴-۱۸ ساختار دُمین داینئین سیتوپلاسمی.** هر دُمین داینئین که خاصیت ATPase دارد، متشکل از هفت موتیف تکرارشونده شبیه گلبرگ‌های گل می‌باشد. از این دُمین یک دُمین مارپیچی، که در انتهای خود دارای جایگاه اتصال به میکروتوبول می‌باشد، منشعب می‌شود. در قسمت چپ شکل تعدادی زیرواحد اضافی نشان داده شده است که در ارتباط با زنجیره‌های سنگین بوده و داینئین را از طریق دیناکتین به محموله بار متصل می‌کنند.

$p150^{Glued}$ می‌باشد که حاوی مکان اتصال به داینئین بوده و در یک انتهای خود دارای جایگاه اتصال برای میکروتوبول می‌باشد. پروتئین نگهدارنده دو دُمین دیناکتین در کنار هم تحت عنوان دینامیتین[1] نامیده می‌شود ـ که علت این نامگذاری بدین خاطر است که زمانی که بیان آن افزایش می‌یابد، باعث جدا شدن دو دُمین از یکدیگر شده و یک کمپلکس پروتئینی تولید می‌کند که فاقد عملکرد می‌باشد. این خاصیت از نظر آزمایشگاهی بسیار مفید می‌باشد، زیرا این امکان را به محققین می‌دهد تا فرآیندهایی را که وابسته به کمپلکس داینئین ـ دیناکتین هستند را تعیین کنند این فرآیندها در سلول‌هایی که دارای بیان بالا دینامیتین می‌باشند رخ نمی‌دهند.

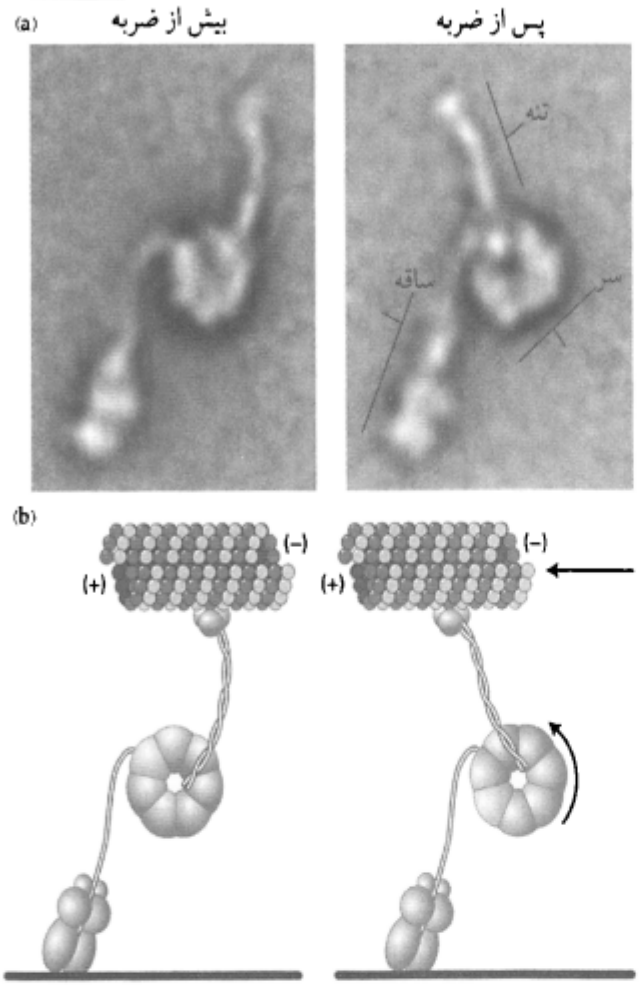
کینزین‌ها و داینئین‌ها در انتقال اندامک‌ها در سلول با یکدیگر همکاری می‌کنند.

اعضای هر دو خانواده پروتئینی داینئین و کینزین نقش‌های مهمی را در سازماندهی وابسته به میکروتوبول اندامک‌های درون سلول ایفا می‌کنند (شکل ۲۷-۱۸). از آن‌جایی که جهت‌گیری میکروتوبول‌ها توسط MTOC تثبیت می‌شود، جهت انتقال - به سمت مرکز سلول یا در خلاف آن ـ وابسته به پروتئین موتوری می‌باشد. به عنوان مثال، دستگاه گلژی در مجاورت سانتروزوم قرار گرفته است. جایی که انتهاهای (-) میکروتوبول‌ها در آنجا قرار دارند، و توسط داینئین ـ دیناکتین به آنجا هدایت می‌شوند. بعلاوه، محموله‌های ترشحی که از شبکه اندوپلاسمی منشا می‌گیرند توسط داینئین- دیناکتین به گلژی انتقال داده می‌شوند. در مقابل، شبکه ـ آندوپلاسمی در سرتاسر سیتوپلاسم انتشار یافته و توسط کینزین -۱ که در جهت انتهاهای (+) و محیطی میکروتوبول‌ها حرکت می‌کند، در سیتوپلاسم جابجا می‌شود. برخی از اندامک‌های مسیرهای آندوسیتوزی مانند اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌های تأخیری نیز با کمپلکس داینئین ـ دیناکتین در ارتباط می‌باشند. هم‌چنین مشخص شده است که در انتقال میتوکندری‌ها و محموله‌های غیر غشایی از قبیل mRNAهای ویژه کدکننده پروتئین‌های مورد نیاز در تکامل کینزین‌ها نقش دارند.این mRNAها بایستی در مکان خاصی از سلول قرار گیرند و ترجمه شوند.

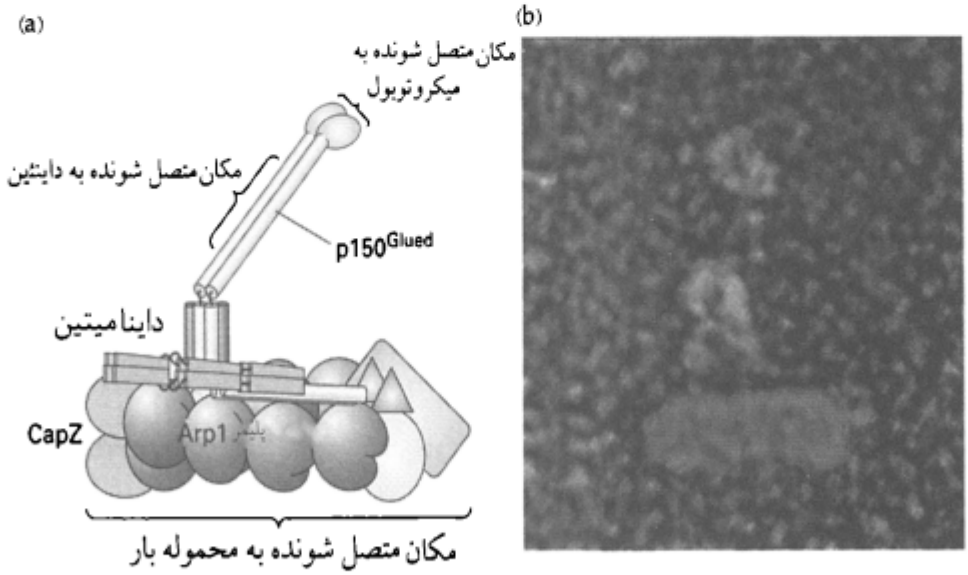
قبلاً دیدیم که چگونه کینزین-۱ اندامک‌ها را به طریق روبه جلو در امتداد آکسون‌ها منتقل می‌کند. حال این سئوال مطرح است زمانی که پروتئین موتوری به انتهای آکسون می‌رسد، چه اتفاقی رخ می‌دهد؟ جواب این سئوال این است که کینزین به طریق برگشتی و بر روی اندامک‌هایی که توسط داینئین سیتوپلاسمی انتقال داده شده‌اند، برمی‌گردد. بنابراین کینزین-۱ و داینئین توانایی اتصال به یک اندامک را دارند و بایستی یک مکانیسم واحدی وجود داشته باشد تا مادامی که یک پروتئین فعال است به‌طور همزمان پروتئین دیگر را خاموش نماید. اگرچه این قبیل مکانیسم‌ها هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند.

بیشتر اطلاعاتی که ما در مورد چگونگی تنظیم انتقال اندامک‌ها توسط میکروتوبول می‌دانیم، حاصل مطالعات انجام شده بر روی ملانوفورهای ماهی (به عنوان مثال نوعی کوسه ماهی[2]) یا قورباغه می‌باشد. ملانوفورها سلول‌های پوست مهره‌داران می‌باشند که حاوی صدها گرانول سیاه غنی از رنگدانه ملانین بنام ملانوزوم می‌باشند. ملانوفورها ممکن است دارای گرانول‌های رنگی پراکنده باشند که در این مورد باعث تیرگی بیشتر پوست شده و یا این‌که گرانول‌های مجتمع باشند که باعث رنگ‌پریدگی و مات شدن پوست می‌شوند (شکل ۲۸-۱۸). این تغییرات در رنگ پوست ماهی توسط میانجی‌های عصبی و در قورباغه به وسیله هورمون‌ها تنظیم می‌شود که می‌تواند در استتار ماهی یا افزایش برهمکنش‌های جمعی در قورباغه مؤثر می‌باشد. حرکت این گرانول‌ها به وسیله تغییر در میزان cAMP درون سلولی تنظیم می‌شود و وابسته به حضور میکروتوبول‌ها می‌باشد. مطالعات انجام شده در راستای تعیین این‌که کدامیک از پروتئین‌های موتوری در این عمل نقش دارند نشان داده

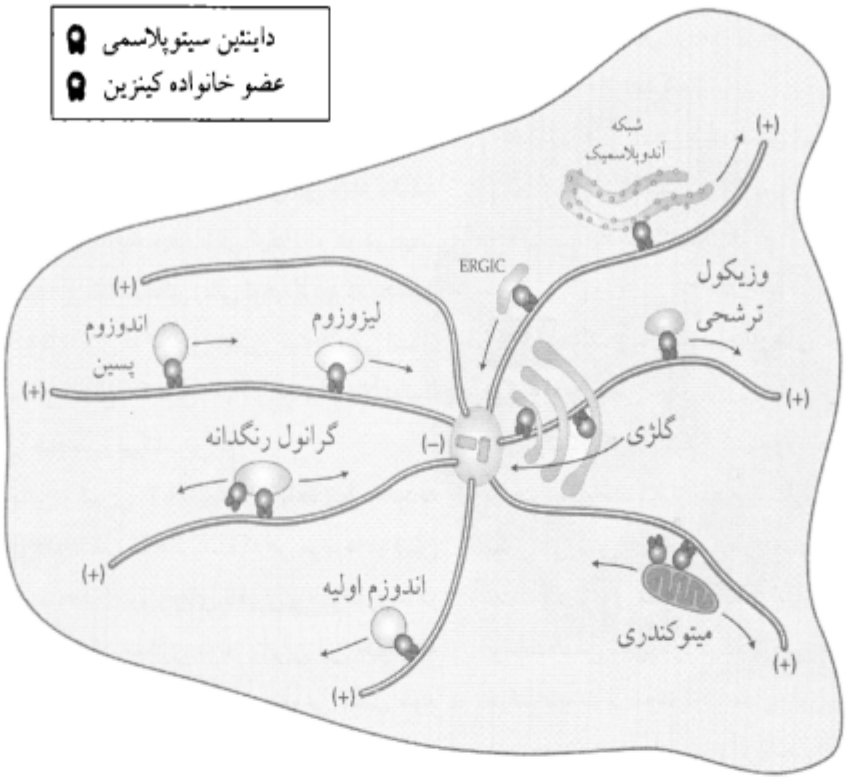
1- Dinamitin 2- Angelfish



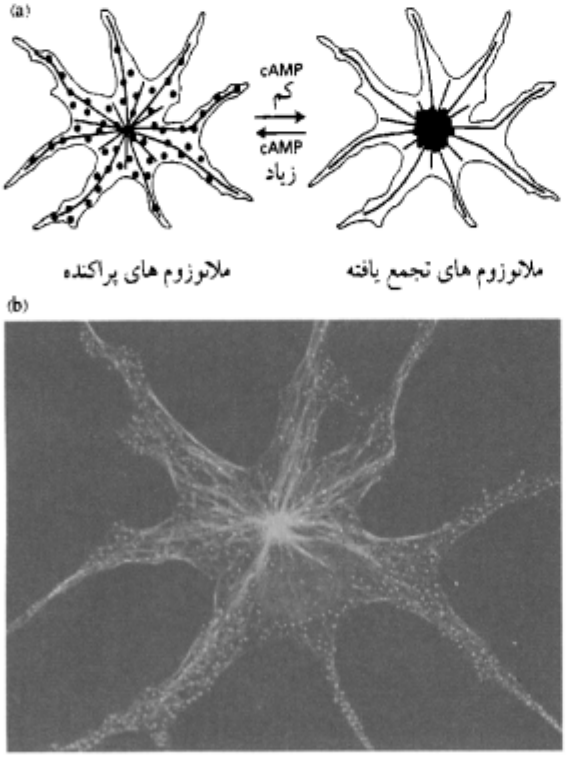
◀ **شکل ۲۵-۱۸ حرکت قدرتمند داینئین.** (a) تصاویر از مولکول‌های داینئین تک سر خالص شده، در حالات قبل و بعد از حرکت آنها، توسط میکروسکوپ الکترونی گرفته شده است. تصویر سمت چپ داینئین را در حالت متصل به ADP-Pi نشان می‌دهد که نشانگر حالت قبل از حرکت می‌باشد و تصویر راست در حالت بعد از حرکت را نشان می‌دهدکه فاقد نوکلئوتید می‌باشد. (b) مقایسه تصاویر نشان می‌دهد که مکانیسم تولید انرژی نیازمند تغییر جهت‌گیری سر نسبت به تنه می‌باشد که باعث حرکت تنه متصل به میکروتوبول می‌شود.



▲ **شکل ۲۶-۱۸ (شکل رنگی) کمپلکس داینا‌کتین که داینئین را به محموله بار مرتبط می‌کند.** (a) یکی از دُمین‌های کمپلکس که به محموله بار متصل می‌شود از یک فیلامنت نسبتاً کوتاه ساخته شده که متشکل از حدود هشت زیرواحد پروتئین شبه اکتین Arp1 می‌باشد که به وسیله پروتئین CapZ پوشیده شده است. دُمین بعدی شامل پروتئین $p150^{Gluad}$ می‌باشد که در انتهای دور خود دارای جایگاه اتصال برای میکروتوبول بوده و در اتصال سیتوپلاسمیک داینئین به کمپلکس نقش دارد. داینامیتین دو بخش کمپلکس داینا‌کتین را در کنار یکدیگر نگه می‌دارد. (b) میکروگراف الکترونی از رپلیکای فلزی کمپلکس داینا‌کتین از مغز جداسازی شده است. فیلامنت کوچک Arp1 (ارغوانی) و زنجیره جانبی داینامیتین/ $p150^{Gluad}$ (آبی) مشخص شده‌اند.



▲ **شکل ۱۸ـ۲۷ (شکل رنگی) انتقال اندامک توسط موتورهای میکروتوبولی.** دایینئین‌های سیتوپلاسمی (قرمز) باعث انتقال رو به جلو اندامک‌ها در راستای انتهای (-) میکروتوبول‌ها (مرکز سلول) می‌شوند؛ کینزین‌ها (ارغوانی) باعث انتقال برگشتی اندامک‌ها در راستای انتهای (+) میکروتوبول‌های (محیط اطراف سلول) می‌شوند. بیشتر اندامک‌ها به یک یا چندین موتور پروتئینی وابسته به میکروتوبول متصل می‌شوند. بایستی توجه شود که ارتباط موتورها با اندامک‌ها بسته به نوع سلول متفاوت می‌باشد، به‌طوری که برخی از این ارتباط‌ها ممکن است در تمامی سلول‌ها وجود نداشته باشند، حال آن‌که برخی دیگر از ارتباطات که در اینجا نشان داده نشده‌اند ممکن است در تمامی سلول وجود داشته باشند.. ER = ERGIC به ترکیب حد واسط گلژی.



◄ **شکل ۱۸ـ۲۸ (شکل رنگی) حرکت گرانول‌های رنگدانه‌ای در ملانوفورهای قورباغه.** (a) دیاگرام سازماندهی مجدد ملانوزوم‌های وابسته به میکروتوبول‌ها که با توجه به سطح cAMP تعیین می‌شود. ملانوزوم‌ها توسط دایینئین سیتوپلاسمی تجمع یافته و توسط کینزین 2 پراکنده می‌شوند.(b) مشاهده میکروسکوپ ایمونوفلورسانس ملانوزوم‌ها در حالت پراکنده، که میکروتوبول‌ها (سبز)، DNA هسته (آبی) و گرانول رنگدانه (قرمز) نشان داده شده‌اند.

است که پراکنش گرانول رنگی نیازمند حضور کینزین-۲ می‌باشد، حال آن‌که تجمع گرانول‌ها نیازمند کمپلکس سیتوپلاسمی داینئین / داینا‌کتین می‌باشد. اولین نشانه‌ها در مورد این‌که چه‌طور بایستی این‌فعالیت‌ها با یکدیگر هماهنگ شوند حاصل این یافته بود که افزایش بیان داینامیتین باعث مهار انتقال گرانول در هر دو جهت می‌گردد. این یافته‌های شگفت‌انگیز زمانی توجیه گردید که محققین کشف نمودند که داینا‌کتین نه تنها به داینئین سیتوپلاسمی اتصال می‌یابد بلکه توانایی اتصال به کینزین-۲ را نیز دارد و احتمالاً فعالیت این دو موتور را هماهنگ می‌کند.

ارتباط داینئین و کینزین-۲ با یک اندامک واحد تنها محدود به ملانوزوم‌ها نمی‌باشد؛ اخیراً مشخص شده که این موتورها در تعیین جایگاه اصلی آندوزوم‌ها / لیزوزوم‌های تاخیری و میتوکندری‌ها در برخی سلول‌ها با یکدیگر همکاری دارند. بنابراین این مفهوم که اندامک‌ها می‌توانند با پروتئین‌های موتوری متنوعی متصل شوند یک استثناء نیست، بلکه یک موضوع جدید می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۸

کینزین‌ها و داینئین‌ها، پروتئین‌های موتوری وابسته به میکروتوبول

- کینزین -۱ یک موتور وابسته به ATP بوده که در راستای انتهای (+) یک میکروتوبل حرکت کرده و اندامک‌های محصور با غشاء را جابجا می‌کند (شکل ۲۰-۱۸ را ملاحظه کنید).
- کینزین -۱ متشکل از دو زنجیره سنگین بوده که هر یک حاوی یک دُمین موتوری در N- ترمینال بوده و دو زنجیره سبک که با محموله بار در ارتباط می‌باشند (شکل ۱۹-۱۸ را ملاحظه کنید).
- فوق خانواده کینزین شامل موتورهایی می‌باشد که در سلول‌های اینترفازی و میتوزی، در جابجایی اندامک‌ها و لغزش میکروتوبول‌های ناهمسو بر روی یکدیگر عمل کرده و حتی یک گروه از آنها فاقد حرکت بوده، ولی در ناپایدار کردن انتهاهای میکروتوبول نقش دارند (شکل ۲۱-۱۸ را ملاحظه کنید).
- کینزین -۱ موتوری با قدرت پردازشگری بالا می‌باشد که هیدرولیز ATP بین دو سر خود را به گونه‌ای هماهنگ می‌کند که همواره یکی از سرها دارای اتصال محکم با یک میکروتوبول می‌باشد (شکل ۲۲-۱۸ را ملاحظه کنید).
- داینئین سیتوپلاسمی یک موتور وابسته به ATP بوده که در راستای انتهای (-) میکروتوبول حرکت کرده و با اتصال به کمپلکس داینا‌کتین در جابجایی محموله بار نقش دارد. (شکل ۲۵-۱۸ را ملاحظه کنید).
- کینزین‌ها و داینئین‌ها از طریق اتصال به اندامک‌های مختلف در سازماندهی جایگاه سلولی آنها نقش دارند (شکل ۲۷-۱۸ را ملاحظه کنید).

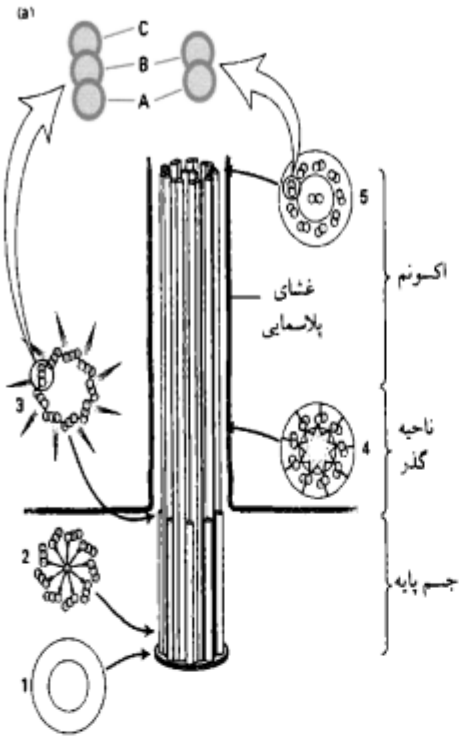
۵-۱۸ مژک و تاژک: ساختارهای سطحی وابسته به میکروتوبول‌ها

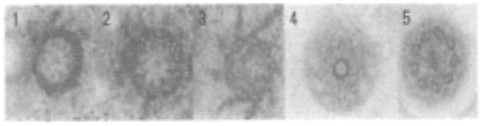
مژک و تاژک ساختارهای کشیده وابسته به میکروتوبول و متصل به غشاء می‌باشند که از سطح بسیاری از پروتوزوآها و بیشتر سلول‌های جانوری به سمت خارج منشعب می‌شوند. مژک‌های با تحرک بالا بر روی سطح سلول‌های اپیتلیال ویژه از قبیل سلول‌های پوشاننده سطح شُش وجود دارند و با زنش موزون موج‌مانند خود سبب حرکت مایعات می‌شوند. تاژک سلول جانوری، دارای ساختاری بسیار شبیه به مژک بوده ولی بلندتر می‌باشد و قادر به جلو بردن سلول، مانند اسپرم، توسط مایع می‌باشد. مژک و تاژک حاوی انواع مختلفی از موتورهای وابسته به میکروتوبول می‌باشند: داینئین‌های آکسونی مسئول زنش تاژک و مژک هستند، حال آن‌که کینزین-۲ و داینئین سیتوپلاسمی در انسجام و نوسازی آنها نقش دارند.

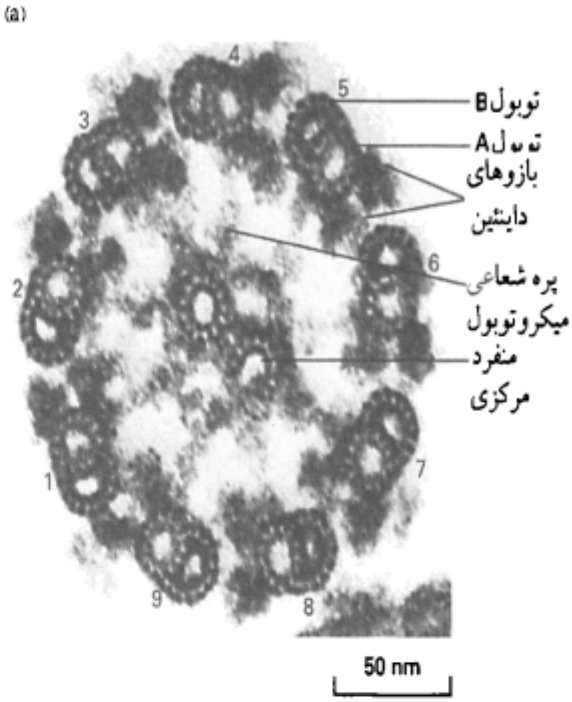
مژک و تاژک‌های یوکاریوتی حاوی میکروتوبول‌های طویل و دوتایی هستند که توسط موتورهای داینئین به همدیگر اتصال یافته‌اند

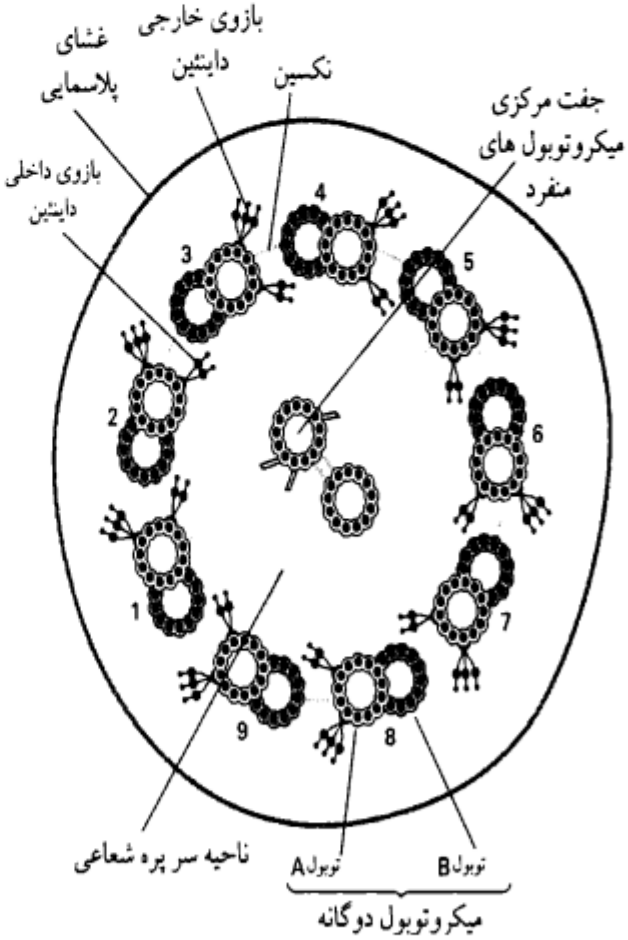
طول مژک و تاژک دارای اندازه متفاوت از چند میکرومتر تا بیش از ۲ میلی‌متر در تاژک اسپرم برخی حشرات می‌باشد. آنها دارای یک دسته از میکروتوبول مرکزی تحت عنوان **آکسونم**[1] می‌باشند که متشکل از یک آرایش به اصطلاح ۲+۹ از ۹ میکروتوبول دو تایی بوده که یک جفت مرکزی میکروتوبول منفرد که از نظر ساختاری متفاوت است، را احاطه می‌کنند (شکل ۲۹b,a-۱۸). هر یک از این ۹ جفت میکروتوبول متشکل از یک میکروتوبول A با ۱۳ پروتوفیلامنت و یک میکروتوبول B با ۱۰ پروتوفیلامنت می‌باشند. تمامی میکروتوبول‌های موجود در مژک و تاژک دارای قطبیت یکسان می‌باشند به گونه‌ای که انتهاهای (+) همواره در نوک آنها قرار می‌گیرد. در محل اتصال مژک و تاژک در درون سلول، آکسونم به **جسم پایه** که یک ساختمان پیچیده متشکل از ۹ دسته میکروتوبول

1- Axoneme









▲ **شکل ۱۸-۲۹ سازماندهی ساختاری مژک و تاژک.** (a) مژک و تاژک از یک جسم پایه که از ۹ میکروتوبول سه تایی متصل به هم تشکیل شده است، منشأ می‌گیرند. در امتداد میکروتوبول‌های A و B جسم پایه توبول‌های A و B اکسونومی محصور با غشاء مژک و تاژک قرار دارند. بین جسم پایه و اکسونم یک ناحیه گذار وجود دارد. دیاگرام و مقاطع عرضی هماهنگ از جسم پایه، ناحیه گذر و اکسونم نشان‌دهنده ساختارهای پیچیده و ظریف آنها می‌باشد. (b) بخش نازکی از یک برش عرضی از یک مژه (که غشا پلاسمایی آن برداشته شده است) به همراه یک دیاگرام که ماهیت ساختارها را نشان می‌دهد.

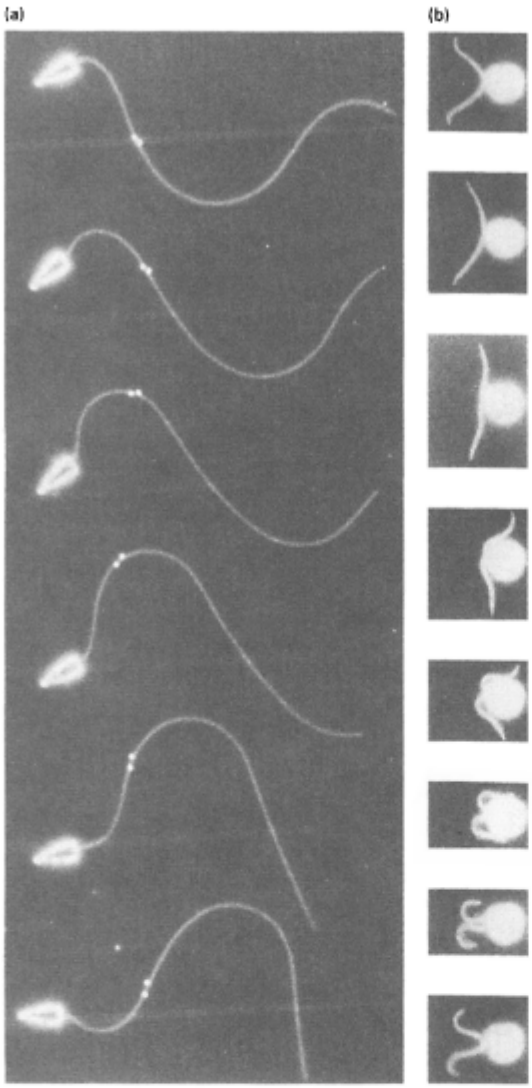
سه تایی می‌باشد، اتصال یافته است (شکل ۱۸ـ۲۹a را ملاحظه کنید).

ساختار آکسونم توسط سه مجموعه پروتئین رابط عرضی حفظ می‌شود (شکل ۱۸-۲۹b را ملاحظه کنید). دو میکروتوبول منفردمرکزی توسط پل‌های متناوب، مانند پله‌های نردبان به یکدیگر متصل شده‌اند. مجموعه دیگری از رابط‌ها که از پروتئین نکسین ساخته شده‌اند، میکروتوبول‌های دو تایی مجاور خارجی را به هم متصل می‌کنند. **پره‌های شعاعی**[1] از هر یک از توبول‌های A میکروتوبول‌های خارجی به سمت جفت مرکزی امتداد یافته است.

پروتئین موتوری مهم موجود در مژک و تاژک، داینئین آکسونومی نام دارد که یک پروتئین بزرگ با چندین زیرواحد بوده و به داینئین سیتوپلاسمی شباهت دارد. دو ردیف از موتورهای داینئین به‌طور متناوب در طول هر یک از توبول‌های A جفت میکروتوبول‌های خارجی اتصال یافته‌اند و تحت عنوان داینئین‌های بازوی داخلی و بازوی خارجی[2] نامیده می‌شوند (شکل ۱۸ـ۲۹b را ملاحظه کنید). در حقیقت میانکنش این داینئین‌ها با توبول B مجاور سبب خم شدن مژک و تاژک می‌شود.

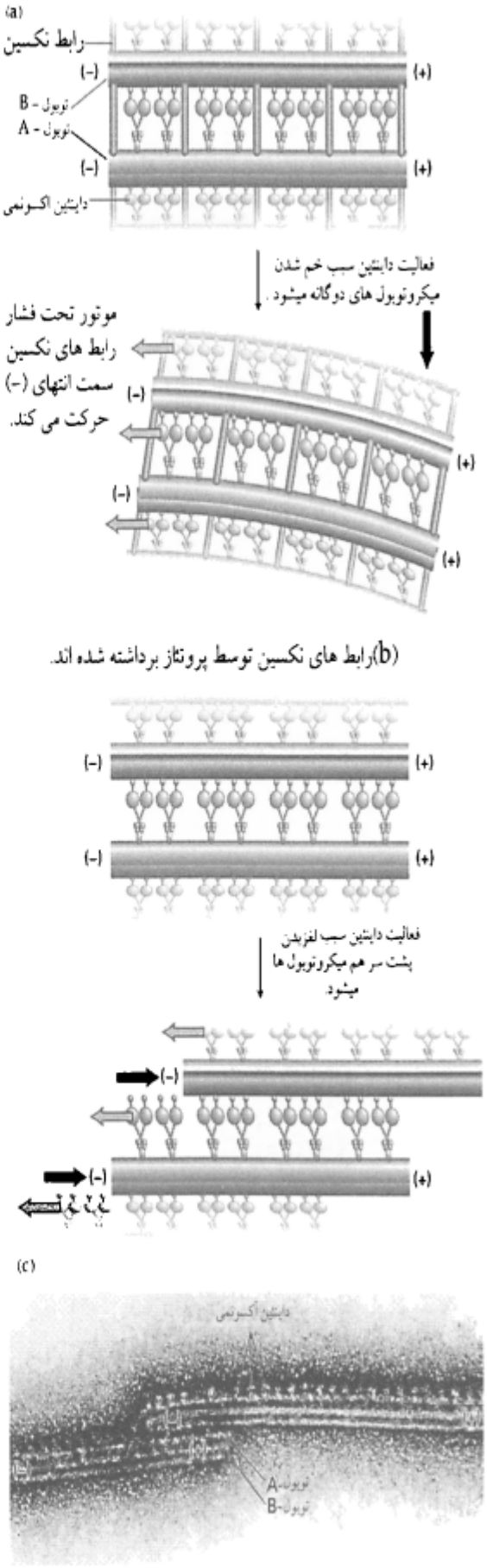
زنش مژک و تاژک توسط لغزش کنترل شده میکروتوبول‌های دوتایی خارجی ایجاد می‌شود

مژک و تاژک به واسطه فعالیت موتورهای داینئین اکسونومی که سبب القاء خمش در آنها می‌شوند، ساختارهای متحرک هستند. بررسی تحرک مژک و تاژک به کمک میکروسکوپی ویدئو نشان می‌دهد که خمیدگی ابتدا از پایه مژک یا تاژک شروع شده و سپس در طول ساختار آن پیش می‌رود (شکل ۳۰ـ۱۸). مطالعات انجام شده بر روی اکسونوم‌های استخراج شده از سلول نحوه خمیدگی را نشان می‌دهد. در آزمایشات کلاسیک، اکسونم‌ها با یک پروتئاز که اتصالات نکسین را باز می‌کند، تیمار شدند. زمانی که به اکسونم‌های تیمار شده ATP اضافه گردید، میکروتوبول‌های دوتایی بر روی یکدیگر حرکت لغزشی کردند. این حرکت ناشی از گام زدن داینئین متصل که به توبول A یک میکروتوبول دوتایی برروی توبول B میکروتوبول دوتایی مجاور می‌باشد (شکل ۱۸ـ۳۱c,b). اکسونمی که دارای اتصالات نکسین سالم می‌باشد، زمانی که میکروتوبول‌های دوگانه به یکدیگر متصل هستند، عملکرد داینئین سبب القاء خمش تاژک می‌شود (شکل ۱۸ـ۳۱a). اما این‌که چگونه زیرمجموعه‌های ویژه داینئین فعال شده و این‌که چگونه موج فعال‌سازی در طول آکسونم پیش می‌رود هنوز درک نشده است.



▲ **شکل ۳۰ـ۱۸ میکروسکوپی ویدئو حرکات تاژکی که منجر به حرکت رو به جلو اسپرم و کلامیدوموناس می‌شود را نشان می‌دهند.** در هر دو مورد سلول‌ها به سمت چپ حرکت می‌کنند. (a) در تاژک اسپرم معمولی، امواج متوالی از خمش‌ها در پایه ایجاد شده و به سمت نوک گسترش می‌یابند؛ این امواج بر خلاف آب حرکت کرده و سلول را به سمت جلو پیش می‌برند. در یک‌سری از عکس‌های متوالی گرفته شده، یک خمیدگی در پایه اسپرم (تصویر بالا) بوجود می‌آید و به طریق دورشونده در طول تاژک حرکت می‌کند. یک جفت دانه طلایی بر روی تاژک دیده می‌شوند که زمانی که خمیدگی از آن ناحیه می‌گذرد بر روی تاژک حرکت می‌کنند. (b) زنش دو تاژک در کلامیدوناس در دو مرحله که تحت عنوان **ضربه مؤثر**[3] (سه شکل بالایی) و **ضربه بازیابی**[4] (شکل‌های بعدی) نامیده می‌شوند، رخ می‌دهند. ضربه مؤثر موجود زنده را در درون آب سمت خود می‌کشد. در طی ضربه بازیابی، یک موج متفاوت از خمیدگی از پایه‌های تاژک به سمت خارج شروع شده و تا زمانی که تاژک به موقعیتی برسد که ضربه مؤثر دیگری آغاز شود تاژک را در سطح سلول هل می‌دهد. این زنش‌ها معمولاً هر ۵ الی ۱۰ بار در ثانیه رخ می‌دهند.

1- Radial spokes
2- Iner-arm and outer-arm
3- Effective stroke
4- Recovery stroke



◀ شکل ۳۱-۱۸ خم شدن مژک و تاژک به واسطه دایئین اکسونوم انجام می‌شود. (a) دایئین اکسونومی متصل به توبول A جفت میکروتوبول خارجی در راستای حرکت به سمت انتهای (-)، توبول B جفت میکروتوبول مجاور را به سمت خود می‌کشد. از آن‌جایی که توبول‌های مجاور توسط نکسین مهار شده‌اند بنابراین نیروی تولید شده توسط دایئین سبب خم شدن مژه یا تاژک می‌شود. (b) شواهد آزمایشگاهی برای مدل ارائه شده در شکل (a). زمانی که اتصالات نکسین توسط یک پروتئاز شکسته شد و به منظور القا فعالیت دایئین ATP اضافه شود، میکروتوبول‌های دوتایی بر روی یکدیگر می‌لغزند. (c) میکروگراف الکترونی از دو میکروتوبول دوتایی در یک اکسونم تیمار شده توسط پروتئاز که با ATP انکوبه شده است. در عدم حضور پروتئین‌های رابط عرضی، میکروتوبول‌های دوتایی به‌طور مکرر حرکت می‌کنند. بازوهای دایئین که به توبول A متصل هستند و با توبول‌های B میکروتوبول دوتایی در سمت چپ میانکنش می‌دهند را نیز می‌توان مشاهده کرد.

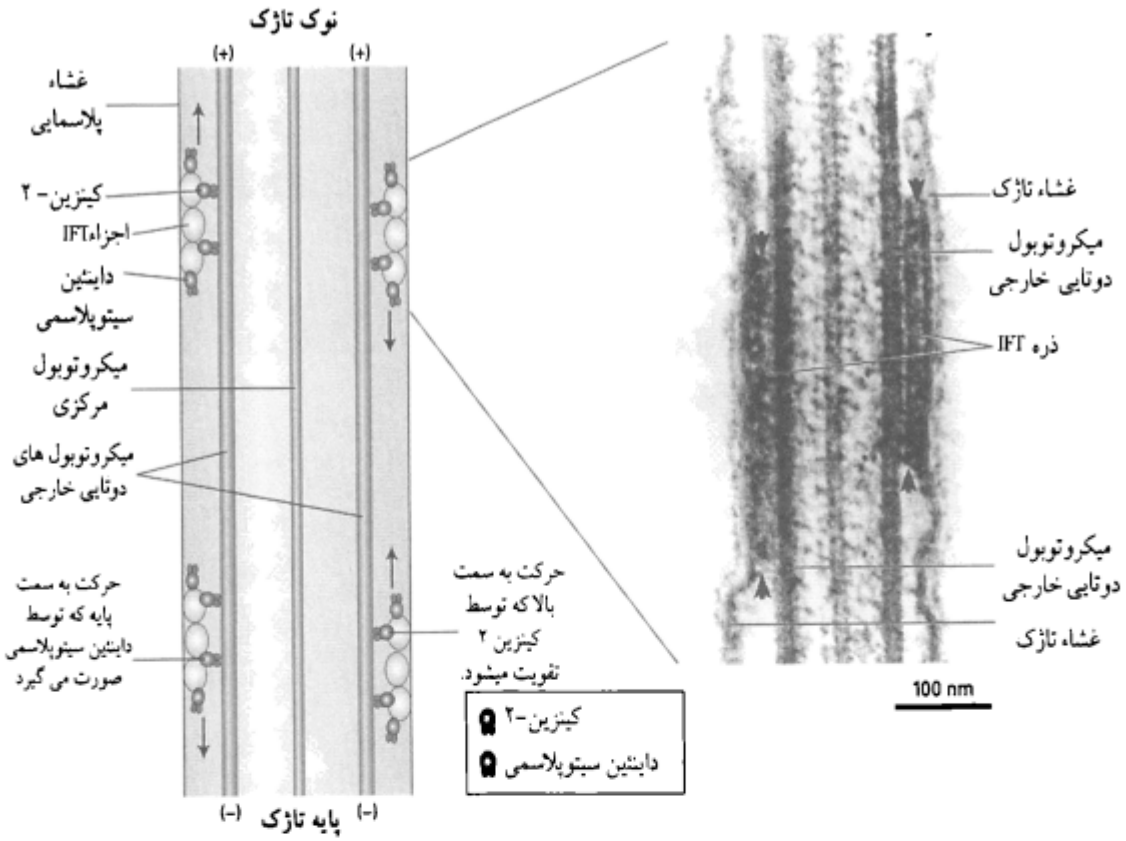
انتقال درون تاژکی باعث حرکت مواد به سمت بالا و پایین مژک و تاژک می‌شود

اگرچه دایئین اکسونوم در خم شدن تاژک نقش دارد، بااین حال یک نوع حرکت دیگری اخیرا مشاهده شده است. آزمایشات دقیق بر روی تاژک جلبک سبز دو تاژکی به نام کلامیدوموناس رینباردی[1] نشان داد که ذرات با سرعت ثابت تقریباً ۲/۵μm/s به سمت نوک (حرکت روبه جلو) تاژک و در مقابل ذرات دیگر با سرعت تقریباً ۴μm/s از نوک به سمت پایه (حرکت برگشتی) حرکت می‌کنند. این انتقال تحت عنوان انتقال **درون‌تاژکی**[2] (IFT) نامیده شده و در هر دو مورد مژک و تاژک رخ می‌دهد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ نوری و الکترونی نشان می‌دهد که ذرات بین میکروتوبول‌های دوتایی خارجی و غشای و پلاسمایی حرکت می‌کنند (شکل ۳۲-۱۸). آنالیز جلبک‌های جهش یافته نشان می‌دهد که حرکت روبه جلو توسط کینزین-۲ و حرکت برگشتی توسط دایئین سیتوپلاسمی هدایت می‌شوند.

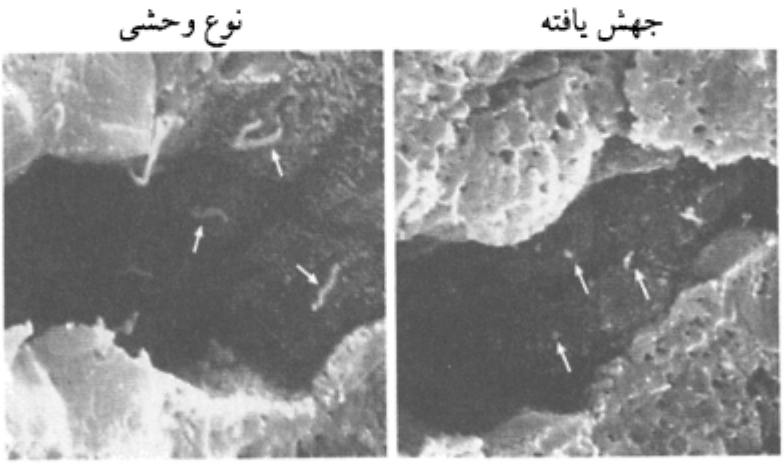
حال این سئوال مطرح می‌شود که عملکرد IFT چیست؟ از آن‌جایی که انتهاهای در حال رشد (+) تمامی میکروتوبول‌ها در نوک تاژک قرار دارند، بنابراین زیرواحدهای توبولین جدید به این ناحیه اضافه می‌شوند. در سلول‌هایی که در کینزین- ۲ دارای نقص هستند کوچک شدن تاژک رخ می‌دهد. این امر نشان می‌دهد که IFT مواد جدید را برای رشته تاژک به نوک آن انتقال می‌دهد. از آن‌جایی که IFT یک فرایندی است که به‌طور متوالی رخ می‌دهد، حال این سئوال مطرح می شود که زمانی که مولکول‌های کینزین- ۲ به نوک

1- Chlamydomonas reinbardtic

2- Intraflagellar transport (IFT)



▲ **شکل ۳۲-۱۸ انتقال درون تاژکی.** (a) ذرات بین غشای پلاسمای و میکروتوبول‌های دوتایی خارجی انتقال داده می‌شوند. انتقال مواد به نوک تاژک وابسته به کینزین-۲ می‌باشد، در حالی که انتقال به سمت نوک تاژک به واسطه داینئین سیتوپلاسمی انجام می‌شود. (b) مقطع تاژک میکروگراف الکترونی ذرات IFT را دربرشی از تاژک کلامیدوناس نشان می‌دهد.



▲ **شکل ۳۳-۱۸ مژک اولیه ناقص در موش جهش یافته‌ای که فاقد اجزاء ذره IFT می‌باشد.** میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره سلول‌های اپی‌تلیال یک لوله جمع‌کننده مربوط به یک نوع موش وحشی (چپ) و یک موش جهش یافته که در یکی از اجزاء ذرات IFT دچار اختلال می‌باشد. فلش‌ها، مژک‌های اولیه را نشان می‌دهد که در موش جهش یافته دارای ریشه کوتاه می‌باشد.

تاژک می‌رسند چه اتفاقی برای آنها رخ می‌دهد و این‌که موتورهای داینئین که در انتقال برگشتی ذرات نقش دارند از کجا می‌آیند؟ به‌طور بارزی، داینئین به شکل محموله بار و توسط انتقال روبه جلو که توسط کینزین- ۲ هدایت می‌شود به نوک تاژک حمل می‌شود و سپس کینزین- ۲ تبدیل به محموله بار می‌شود که همانند دیگر ذرات توسط داینئین به پایه تاژک انتقال داده می‌شود.

ذرات انتقال داده شده به طریق روبه جلو و برگشتی بر روی تاژک کلامیدوناموس جداسازی و ترکیبشان مشخص شده است.

تمامی آنها دارای هومولوگ‌هایی در موجودات مژک‌دار، مانند نمادتودها، مگس سرکه، موش و انسان می‌باشند، ولی این ذرات در ژنوم مخمرها و گیاهان که فاقد مژک هستند وجود ندارند. این امر نشان می‌دهد که این ذرات مختص IFT هستند.

نقص در انتقال درون تاژکی به واسطه تأثیر بر روی مژک‌های اولیه حسی سبب بروز بیماری می‌گردد

بیشتر سلول‌های مهره‌داران حاوی یک مژک منفرد غیر متحرک تحت عنوان مژک اولیه می‌باشند (شکل ۳۳ـ۱۸؛ شکل ۱۳ـ۱۸ را ملاحظه کنید). این مژک فاقد جفت میکروتوبول‌های مرکزی و بازوی جانبی داینئین می‌باشد. مژک اولیه از سانتروزوم که در آن یکی از سانتریول‌ها به عنوان جسم پایه عمل می‌کند، منشاء می‌گیرد. یافته‌ها در مورد عملکرد این مژک اولیه حاصل این کشف می‌باشد که حذف پروتئین هومولوگ IFT کلامیدموناس در پستانداران سبب نوعی بیماری تحت عنوان بیماری کلیوی پلی‌سیستیک اتوزومی پیشرونده[1] (ADPKD) می‌شود. عقیده بر این است که مژک اولیه در سلول‌های اپی‌تلیال توبول‌های جمع‌کننده کلیه به عنوان حس‌گرهای مکانیکی عمل می‌کند که از روی میزان خم شدن‌شان سرعت جریان مایعات را اندازه‌گیری می‌کنند.

مژک اولیه دارای نقش‌های حسی دیگری نیز می‌باشد. احساس بو به واسطه گیرنده‌های بویایی موجود در مژک اولیه نورون‌های حسی بویایی بینی می‌باشد. مثال دیگر، سلول‌های مخروطی و استوانه‌ای چشم می‌باشد که دارای یک مژک اولیه با نوک بسیار توسعه یافته بود که پروتئین‌های دخیل در دریافت نور را فراهم می‌کند. توسط کینزین-۲ که بخشی از سیستم انتقال درون تاژکی می‌باشد، در هر دقیقه ۲۰۰۰ پروتئین شبکه‌ای اپسین در مژک جابجا می‌شود. اختلال در این جابجایی سبب تخریب شبکیه می‌شود. با توجه به نقش‌های زیاد مژک اولیه در سیستم حسی، تعجب‌آور نخواهد بود که نقص در آن، عواقب زیادی را در برداشته باشد. به عنوان مثال، بیماران دارای سندرم باردت بیدل[2] که جسم پایه و مژک آنها دچار اختلال می‌باشد، دارای تخریب شبکیه‌ای بوده و علاوه بر عدم توانایی در بویایی، دارای چندین اختلال دیگر نیز می‌باشند که این امر دلالت بر این دارد که مژک‌های اولیه در بسیاری از فرایندهایی که هنوز شناخته نشده‌اند، نیز نقش دارد.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۸

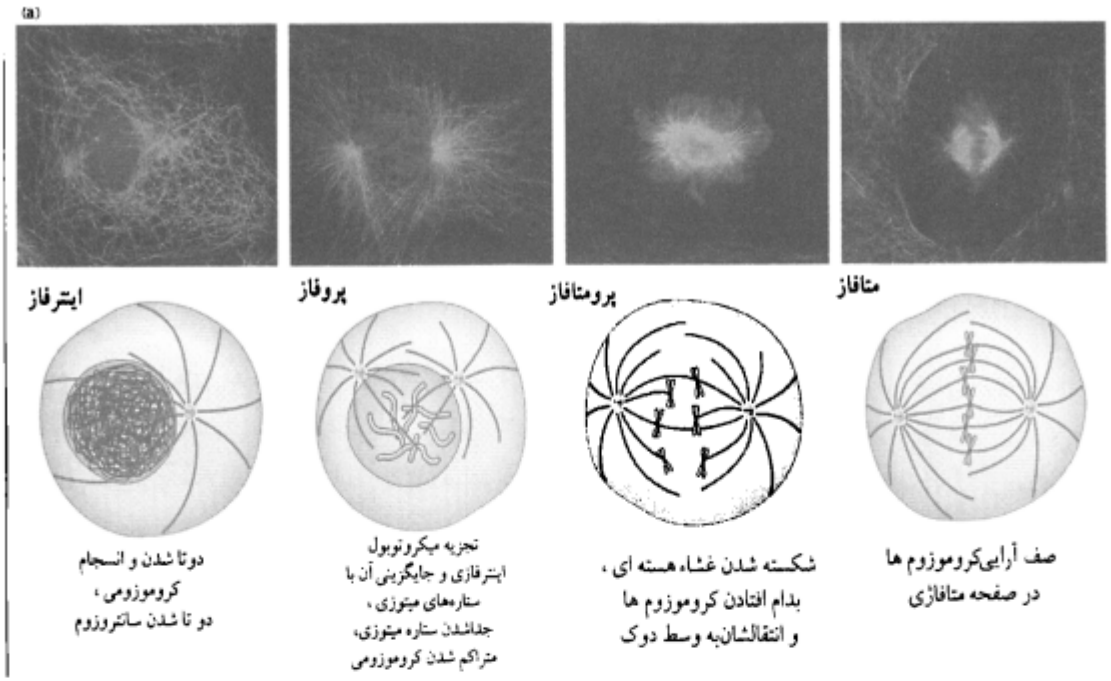
مژک‌ها و تاژک‌ها ساختارهای سطحی وابسته به میکروتوبول

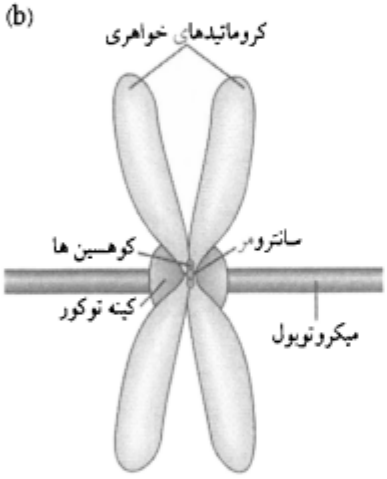
- مژک‌ها و تاژک‌های متحرک ساختارهای سطح سلولی وابسته به میکروتوبول می‌باشند که حاوی یک جفت میکروتوبول منفرد مرکزی و ۹ مجموعه میکروتوبول دوتایی خارجی می‌باشند (شکل ۲۹ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- تمامی مژک‌ها و تاژک‌ها از اجسام پایه، ساختارهای متشکل از ۹ دسته از میکروتوبول‌های سه‌تایی خارجی و بسیار شبیه به سانتریول‌ها منشأ می‌گیرند.
- داینئین‌های اکسونومی متصل به توبول A در یک میکروتوبول دوتایی؛ با توبول B میکروتوبول دیگر میانکنش می‌دهد که این امر منجر به خم شدن مژک‌ها و تاژک‌ها می‌شود.
- مژک‌ها و تاژک‌ها دارای یک مکانیسم تحت عنوان انتقال درون تاژکی، برای انتقال اندامک‌ها به نوک تاژک توسط کینزین-۲ و از نوک به پایه توسط داینئین سیتوپلاسمی می‌باشند. این انتقال‌عملکرد و طول مژک‌ها و تاژک‌ها را تنظیم کند.

۶ـ۱۸ میتوز

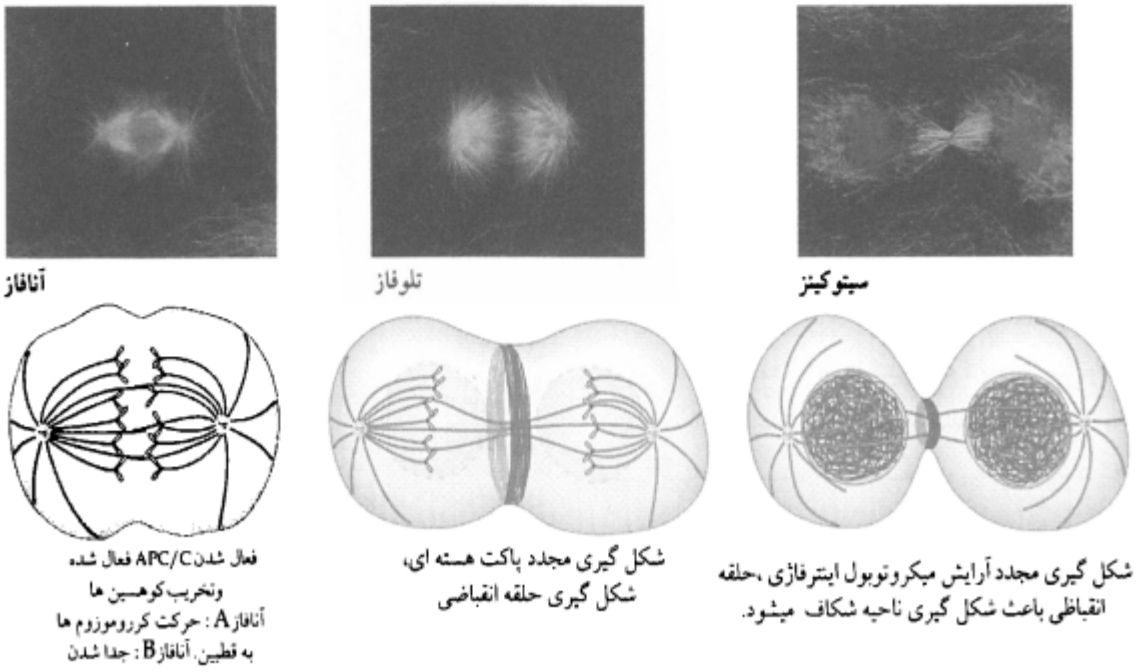
از بین تمامی عواملی که امکان و تداوم حیات را فراهم می‌کنند، شاید مهم‌ترین آنها توانایی سلول‌ها برای دو برابر شدن به‌طور صحیح و سپس تفکیک صحیح کروموزوم‌های آنها بین سلول‌های در حال تقسیم باشد. در طول **چرخه سلولی**، کروموزوم‌های سلول‌ها در یک فرایند بسیار تنظیم شده که در بخش ۲۰ بحث شده است تحت عنوان فاز S (به دلیل این‌که فاز سنتزی می‌باشد) دقیقاً دو برابر می‌شود. زمانی که کروموزوم‌های منفرد دو برابر می‌شوند، آنها در راستای طول خود توسط پروتئین‌هایی تحت عنوان **چسبنده**[3] در کنار یکدیگر نگه داشته می‌شوند.این سلول‌ها سپس از یک دوره تحت عنوان G_2 (گرفته شده از وقفه ۲[4]) گذر کرده و وارد **میتوز** می‌شوند. میتوز فرایندی است که بدان وسیله کروموزوم‌های دو برابر شده بین سلول‌های دختری تقسیم می‌شوند. این فرایند بایستی به‌طور دقیقی انجام شود به گونه‌ای که حذف یا اضافه شدن یک کروموزوم می‌تواند کشنده (که تا کنون هنوز چنین اختلالی شناخته نشده است) یا سبب اختلالات شدید گردد. تخمین زده شده است که

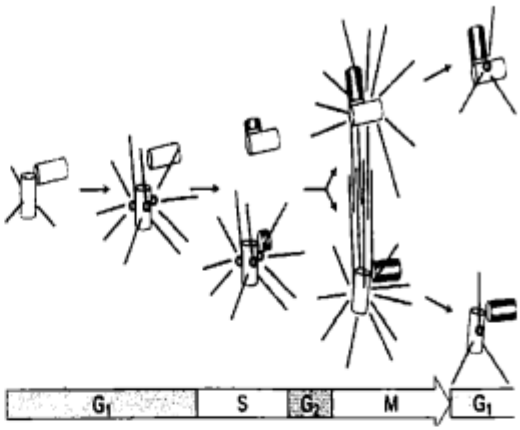
1- Autosomal recessive polycystic kindey disease
2- Bardet-Biedl
3- Cohesin
4- Gap 2





▲ **شکل ۱۸-۳۴ (شکل رنگی) مراحل میتوز.** (a) اشکال بالایی مراحل میتوز را در سلول‌های کشت داده شده PtK2 نشان می‌دهد. DNA به رنگ آبی و توبولین به رنگ سبز رنگ‌آمیزی شده است. دیاگرام‌های پایین مراحل مختلف و حوادثی را که در این مراحل رخ می‌دهد، نشان می‌دهند. میتوز یک فرایند متوالی بوده و برای سهولت به دو مرحله تقسیم شده است. (b) بخش‌های مختلف یک کروموزوم متراکم شده در میتوز. کروموزوم مضاعف شده دارای دو کروماتید خواهری می‌باشد (که هر یک حاوی یکی از رونوشت‌های DNA دو رشته‌ای می‌باشد) که این دو کروماتید در ناحیه‌ای فشرده تحت عنوان سانترومر توسط پروتئین‌های چسبنده به یکدیگر اتصال یافته‌اند. سانترومر همچنین جایگاهی است که کینه توکور تشکیل شده و محل اتصال میکروتوبول کینه‌توکوری می‌باشد.





▲ **شکل ۱۸ـ۳۵(شکل رنگی) رابطه مضاعف شدن سانتروزوم با چرخه سلولی.** پس از این‌که جفت سانتریول‌های پدری (سبز) به‌طور دقیق از هم جدا شدند، یک سانتریول دختری (آبی) از سانتریول دیگر جوانه زده و رشد می‌کند. در مرحله G_2 رشد سانتریول‌های دختری کامل می‌شود، اما دو جفت سانتریول به صورت یک کمپلکس سانتروزومی منفرد باقی می‌مانند. در اوایل میتوز، سانتروزوم شکافته شده و هر جفت سانتریول به سمت مخالف هسته مهاجرت می‌کنند. مقدار ماده پری‌سانتریولی و میزان فعالیت سنتز و رشد میکروتوبول به‌طور زیادی در میتوز افزایش می‌یابد. در میتوز، این MTOCs ها قطبین دوک میتوزی نامیده می‌شوند.

در مخمر از هر ۱۰۰۰۰۰ تقسیم سلولی که انجام می‌شود، تنها یکی از ۱۶ کروموزم آن دچار اشتباه می‌شود. این امر نشان می‌دهد که این فرایند یکی از دقیق‌ترین فرایندهای موجود در زیست‌شناسی به شمار آید.

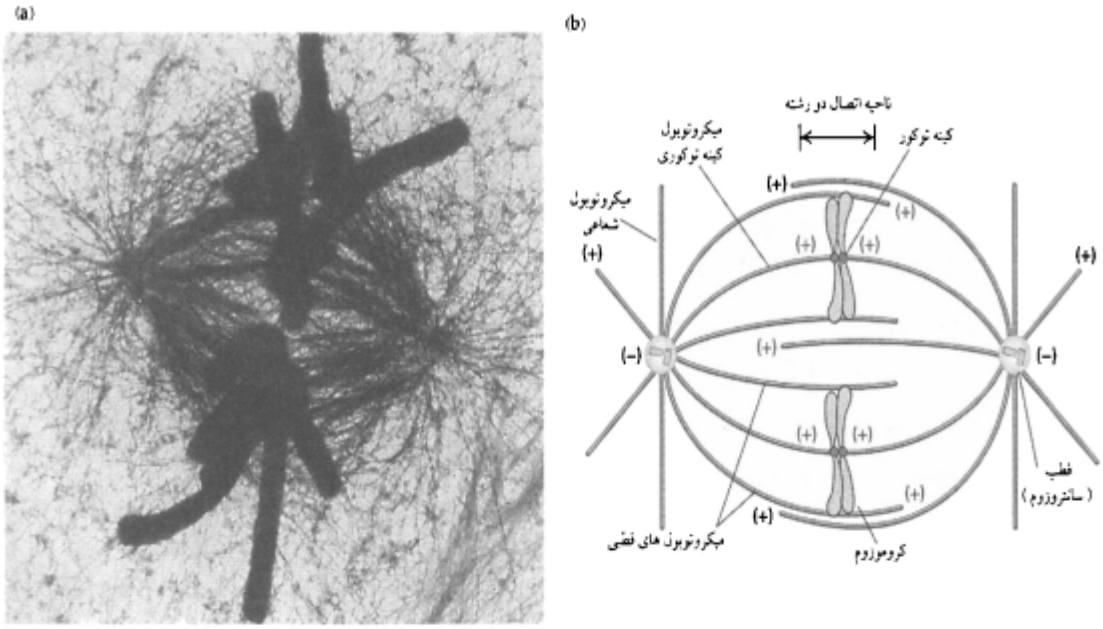
میتوز را می‌توان به شش مرحله تقسیم نمود

برای سهولت کار معمولاً میتوز را می‌توان به چندین مرحله تقسیم نمود (شکل ۱۸ـ۳۴a). ولی در حقیقت میتوز یک فرایند مداوم می‌باشد. اولین مرحله میتوز که تحت عنوان **پروفاز** نامیده می‌شود، توسط تعدادی از رویدادهای هماهنگ و برجسته تشخیص داده می‌شود. ابتدا، زمانیکه سانتروزوم‌های دوتایی از نظرهسته‌زایی میکروتوبول فعال می‌گردد آرایش اینترفازی میکروتوبول‌ها تغییر می‌کند. این فرایند سبب ایجاد دو جایگاه برای رشد میکروتوبول‌های دینامیک تحت عنوان **ستاره**[1] می‌شود. سپس این دو ستاره در دو جهت مخالف هسته حرکت کرده و به صورت دو قطب **دوک میتوز** عمل می‌کنند. دوک میتوزی ساختار وابسته به میکروتوبول می‌باشد که سبب جدا شدن کروموزوم‌ها می‌شود. دوم؛ مکان‌های سنتز پروتئین و نظم درونی سیستم‌های غشایی که به‌طور معمول وابسته به آرایش اینترفازی میکروتوبول‌ها می‌باشد، تخریب و تجزیه می‌شود. به علاوه، اندوسیتوز و اگزوسیتوز متوقف شده و سازمان میکروتوبول‌ها به گونه‌ای جدید آرایش می‌یابد که منجر به ایجاد یک سلول کروی می‌شود. در درون هسته، هستک شکسته شده و کروموزم‌ها شروع به متراکم شدن می‌کنند. کروموزوم‌های دوتایی یا **کروماتیدهای** دختر که در این مرحله تحت این نام خوانده می‌شوند که توسط پروتئین‌های چسبنده در کنار یکدیگر نگه داشته می‌شوند، به جز در ناحیه سانترومر در نواحی دیگر شروع به تجزیه شدن می‌نمایند (شکل ۱۸ـ۳۴b). همان‌طور که به‌طور دقیق در بخش ۲۰ بحث شد، تمامی این حوادث از طریق یک افزایش سریع در فعالیت کمپلکس سیکلین ـ CDK میتوزی که یک کیناز بوده و سبب فسفریلاسیون چندین نوع پروتئین می‌شود، هماهنگ می‌شوند.

مرحله بعدی میتوز، **پرومتافاز**، با شکسته شدن غشای هسته و منافذ هسته‌ای و تخریب لامینای هسته که وابسته به لامین می‌باشد، شروع می‌شود. میکروتوبول‌های نشأت گرفته از قطبین دوک تقسیم شروع به حرکت و به «دام انداختن» جفت‌های کروموزومی در ساختارهای ویژه‌ای تحت عنوان **کینه‌توکورها**[2] می‌نمایند. هر کروماتید خواهری دارای یک کینه توکور، و بنابراین کروماتیدهای خواهری دارای دو کینه توکور می‌باشند که در طی مرحله پرومتافاز هر یک از آنها به قطبین دوک تقسیم اتصال می‌یابند. زمانی کروماتیدهای خواهری به دو قطب دوک تقسیم اتصال یافتند، طی فرایندی تحت عنوان **گردهمایی**[3] به فواصل مساوی از قطبین دوک صف آرایی می‌کنند. تا زمانی که تمامی کروموزوم‌ها تجمع یابند، پرومتافاز ادامه می‌یابد که در این زمان سلول وارد مرحله بعد یعنی **متافاز** می‌شود. متافاز تحت عنوان مرحله‌ای تعریف می‌شود که در آن تمامی کروموزوم‌ها در صفحه متافازی صف‌آرایی می‌کنند.

مرحله بعد یعنی **آنافاز** توسط فعال شدن **کمپلکس پیش‌برنده آنافاز**[4]/ سیکلوزوم (APC/C) القا می‌شود. APC/C فعال شده منجر به تخریب چسبنده‌ها، پروتئین‌های نگهدارنده و متصل‌کننده کروماتیدهای خواهر به یکدیگر می‌شود به‌طوری که هر کروموزم توسط میکروتوبول‌های متصل شده به ناحیه کینه توکورآن به سمت قطب مربوطه کشیده می‌شود. این انتقال کروموزوم‌ها تحت عنوان آنافاز A نامیده می‌شود. یک حرکت مجزا و منحصر به فرد نیز رخ می‌دهد که شامل حرکت قطبین دوک تقسیم به فواصل نسبتاً دور از یکدیگر طی فرایندی تحت عنوان آنافاز B می‌باشد. زمانی که کروموزوم‌ها جدا شدند، سلول وارد مرحله **تلوفاز** می‌شود. طی این مرحله غشاء هسته دوباره شکل گرفته، کروموزوم‌ها به صورت رشته

1- Aster
2- Kinetochores
3- Congression
4- Anaphase- promoting complex



▲ **شکل ۳۶ـ۱۸ دوک تقسیم میتوزی دارای سه گروه میکروتوبول مشخص می‌باشد.** (a) در این میکروگراف الکترونی با ولتاژ بالا، به منظور افزایش اندازه، میکروتوبول‌ها آنها با آنتی‌بادی‌های ضد توبولین نشاندار با بیوتین رنگ‌آمیزی شدند. اشیاء استوانه‌ای شکل بزرگ کروموزم‌ها هستند. (b) در این دیاگرام سلول متافازی شکل (a) بصورت شماتیک نشان داده شده است. سه گروه میکروتوبول (MTs) دستگاه میتوزی را تشکیل می‌دهند. انتهای (-) تمامی این میکروتوبول‌ها در قطبین قرار دارد. میکروتوبول‌های ستاره‌ای به سمت کورتکس سلول امتداد یافته و به آن متصل هستند. میکروتوبول‌های کینه‌توکوری با کروموزوم‌ها اتصال دارند. میکروتوبول‌های قطبی به سمت مرکز سلول امتداد یافته، به‌طوری که انتهاهای (+) آنها با یکدیگر هم‌پوشانی دارند. قطب دوکی به همراه میکروتوبول‌های مرتبط با آن تحت عنوان ستاره میتوزی[1] نامیده می‌شود.

غیر متراکم درآمده و سلول از وسط فشرده شده و توسط حلقه انقباضی و طی فرایند **سیتوکینز** به دو سلول دختر تقسیم می‌شود.

برای انجام میتوز سانتروزوم‌ها در اوایل چرخه سلولی مضاعف می‌شوند

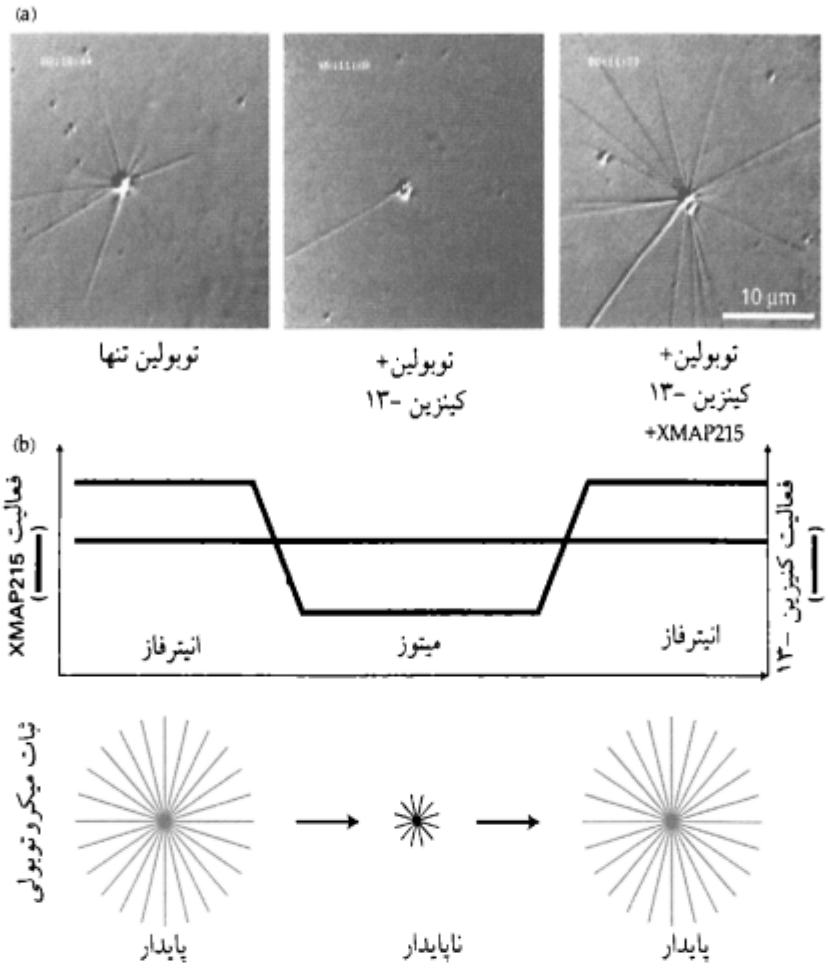
به منظور جدا شدن کروموزوم‌ها در میتوز، سلول‌ها به‌طور هماهنگ با مضاعف شدن کروموزم‌های‌شان در فاز S، MTOCs های خودشان - سانتروزوم‌ها - را نیز مضاعف می‌کنند (شکل ۳۵ـ۱۸). سپس این سانتروزوم‌های مضاعف شده جدا شده و تبدیل به دو MTOCs شده که به عنوان قطبین دوک میتوزی عمل می‌کنند. تعداد سانتروزوم‌ها در سلول‌های جانوری بایستی به‌طور دقیقی کنترل شود. در حقیقت بسیاری از سلول‌های توموری دارای بیش از دو سانتروزوم می‌باشند بطوریکه این عمل باعث ناپایداری ژنتیکی شده که منجر به جدا شدن نادرست کروموزوم‌ها و نهایتاً **آنوپلوئیدی** (تعداد نامساوی از کروموزوم‌ها) می‌شود.

زمانی که سلول‌ها وارد میتوز می‌شوند، میزان فعالیت دو MTOCs ـ یا به عبارتی توانایی آنها در هسته‌زایی میکروتوبول‌ها ـ شدیداً افزایش می‌یابد به‌طوری که آنها بیشتر مواد پری‌سانتریول را انباشته می‌کنند. از آن‌جایی که میکروتوبول‌های در حال رشد از این دو MTOCs شبیه ستاره هستند آنها اغلب تحت عنوان ستاره‌های میتوزی نامیده می‌شوند.

دوک میتوزی متشکل از سه گروه میکروتوبول می‌باشد

قبل از این‌که ما مکانیسم‌های دخیل در این فرایند مهم را مورد بحث قرار دهیم، لازم است که سه گروه مجزا از میکروتوبول‌ها راکه از قطبین دوک میتوزی منشأ می‌گیرند و انتهای (-) آنها در آنجا قرار دارد را مورد بررسی قرار دهیم. اولین گروه شامل میکروتوبول‌های ستاره‌ای می‌باشند که از قطبین دوک تقسیم به سمت کورتکس سلولی انتشار می‌یابند (شکل ۳۶ـ۱۸). این میکروتوبول‌های به واسطه میانکنش با کورتکس، نقش مهمی در جهت‌گیری دوک تقسیم با محور تقسیم سلولی دارند. دُمین گروه باعث اتصال قطبین دوک تقسیم به کینه توکورهای کروموزومی شده و بنابراین تحت

1- Mitotic aster



▲ **شکل ۱۸ـ۳۷ دینامیک میکروتوبول در میتوز به واسطه از دست دادن یک پروتئین پایدارکننده مرتبط با میکروتوبول افزایش می‌یابد.** (a) این سه شکل توانایی سانتروزوم‌ها را در سنتز میکروتوبول‌ها از توبولین‌های خالص (چپ)، توبولین و پروتئین ناپایدارکننده کینزین-۱۳ (وسط) یا توبولین، کینزین-۱۳ و پروتئین پایدارکننده XMAP215 (MAP باوزن مولکولی ۲۱۵kD از زنوپوس) (راست) نشان می‌دهد. مطالعات بیشتر نشان می‌دهد که مهمترین تأثیر XMAP215 مهار فروگشت‌های القا شده توسط کینزین ۱۳ می‌باشد. (b) افزایش دینامیک میکروتوبول‌ها در میتوز به واسطه غیر فعال شدن XMAP215 بواسطه فسفریلاسیون می‌باشد. (c) دیاگرام مربوط به پایداری متفاوت میکروتوبول‌ها در اینترفاز و میتوز. توجه کنید که علاوه بر پایداری متفاوت میکروتوبول‌ها در اینترفاز و میتوز، توانایی MTOCها در هسته‌زایی میکروتوبول‌ها نیز به‌طور شدیدی در میتوز افزایش می‌یابد (شکل ۱۸ـ۳۵).

عنوان میکروتوبول‌های کینه‌توکوری نامیده می‌شوند. این گروه از میکروتوبول‌ها ابتدا کروموزوم‌ها را شناسایی کرده و سپس به وسیله کینه توکورها، آنها را به قطبین دوک تقسیم متصل کرده و در آنافاز A کروموزوم‌ها را به دو قطب منتقل می‌کنند. گروه سوم میکروتوبول‌ها از هر یک از دو قطب دوک میتوزی به سمت قطب مخالف کشیده شده و به طریق ناهمسو با یکدیگر میانکنش می‌دهند؛ این میکروتوبول‌ها تحت عنوان میکروتوبول‌های قطبی نامیده می‌شوند. این میکروتوبول‌ها مسئول اولاً دور کردن سانتروزوم‌های مضاعف شده از یکدیگر در طول پروفاز، دوماً حفظ ساختار دوک و نهایتاً هل دادن قطبین جدا از هم دوک تقسیم در آنافاز B می‌باشند.

در هنگام میتوز دینامیک میکروتوبولی به‌طور شگفت‌انگیزی افزایش می‌یابد

اگرچه ما تصاویر ثابتی از مراحل مختلف میتوز ترسیم کرده‌ایم، اما میکروتوبول‌ها در تمامی مراحل میتوز بسیار دینامیک می‌باشند. همان‌طور که در بالا دیدیم، زمانی که سلول‌ها وارد میتوز می‌شوند، توانایی سانتروزوم‌های آنها در افزایش تجمع و رشد میکروتوبول‌ها به‌طور شدیدی افزایش می‌یابد (شکل ۱۸ـ۳۵ را ملاحظه کنید). علاوه بر این، میزان تحرک و دینامیک میکروتوبول‌ها نیز افزایش می‌یابد. حال این سئوال مطرح است که چگونه می‌توان افزایش میزان دینامیک میکروتوبول‌ها را تعیین نمود؟ در اصل، شما می‌توانید میکروتوبول‌ها را ملاحظه کنید و رفتارهای ویژه آنها را دنبال کنید. با

این وجود، معمولاً مقدار میکروتوبول‌ها در دوک تقسیم میتوزی آن‌قدر زیاد است که نمی‌توان این کار را کرد. به منظور به دست آوردن میانگینی از میزان دینامیک میکروتوبول‌ها، محققین توبولین‌های نشان‌دار شده توسط مواد فلورسانس را وارد سلول کردند. این توبولین‌ها به‌طور تصادفی در ساختمان میکروتوبول‌ها وارد می‌شوند. سپس آنها مواد فلورسانس را در ناحیه کوچکی از دوک میتوزی بی‌رنگ نمودند و سرعت برگشت فلورسانس را توسط تکنیکی تحت عنوان **بازیابی فلورسانسی پس از بی‌رنگ شدن توسط نور**[1] (FRAP) (شکل ۱۲ـ۱۰ را ملاحظه کنید) اندازه‌گیری نمودند. از آن‌جایی که برگشت مجدد فلورسانس به دلیل سنتز و رشد میکروتوبول‌های جدید از دایمرهای محلول توبولین فلورسنت می‌باشد، بدین طریق می‌توان میانگین سرعت جابجایی میکروتوبول‌ها را نشان داد. در یک دوک تقسیم میتوزی، نیمه عمر میکروتوبول‌های آن حدود ۱۵ ثانیه می‌باشد، حال آن‌که در یک سلول اینترفازی این میانگین حدود ۵ دقیقه می‌باشد. بایستی خاطر نشان نمود که اینها اندازه‌گیری‌های کلی هستند و همان طور که خواهیم دید، جمعیت‌های ویژه میکروتوبول‌ها دارای استحکام و پایداری بالاتری هستند.

حال این سئوال مطرح است که چه عاملی سبب دینامیک بیشتر میکروتوبول‌ها در میتوز می‌شود؟ ناپایداری دینامیکی معیاری از سهم نسبی هر یک از عوامل زیر شامل سرعت‌های رشد، سرعت‌های تخریب، فروگشت‌ها و رهایش‌ها می‌باشد. تجزیه و تحلیل دینامیک میکروتوبولی در حالت *In Vivo* نشان می‌دهد که افزایش دینامیک میکروتوبول‌های منفرد در میتوز عموماً به دلیل افزایش فروگشت و کاهش رهایش و به مقدار جزئی ناشی از سرعت‌های زیاد رشد (طویل شدن) یا تخریب (کوتاه شدن) می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی عصاره اووسیت‌های قورباغه نشان می‌دهد که فاکتور عمده افزایش‌دهنده فروگشت‌ها در هر دو عصاره سلول اینترفازی و میتوزی، دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها توسط پروتئین‌های کینزین-۱۳ می‌باشد. این مطالب را می‌توان در یک آزمایش *In Vitro* که در آن سنتز میکروتوبول از توبولین خالص از سانتروزوم‌های تخلیص شده منشأ می‌گیرد، مشاهده نمود (شکل ۳۷a ـ۱۸). حال اگر پروتئین کینزین -۱۳ اضافه گردد، تعداد خیلی کمتری میکروتوبول تشکیل می‌شود. با این حال، اگر پروتئین پایدارکننده مرتبط با میکروتوبول که تحت عنوان XMAP215 نامیده می‌شود نیز به همراه کینزین -۱۳ اضافه شود، به واسطه کاهش شدید در فرکانس فروگشت‌ها، تعداد خیلی زیادی میکروتوبول تشکیل می‌شود. این امر نشان می‌دهد که فعالیت کینزین-۱۳ در طول چرخه سلولی تغییر چندانی نمی‌کند، در حالی که فعالیت XMAP215 در طی میتوز به وسیله فسفریلاسیون مهار می‌شود (شکل ۳۷b ـ۱۸). این امر در زمانی که سلول وارد میتوز می‌شود، منجر به ناپایداری بسیار زیاد میکروتوبول‌ها می‌گردد (شکل ۳۷c ـ۱۸).

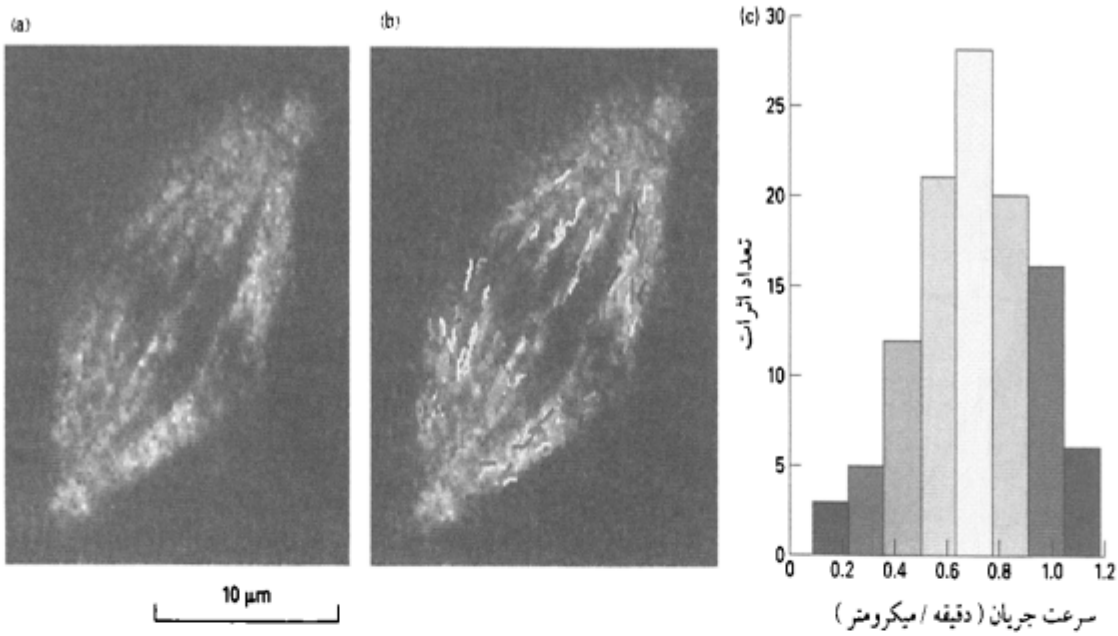
میکروتوبول‌ها در طی میتوز تریدمیل می‌کنند

علاوه بر این‌که میکروتوبول‌ها به واسطه افزایش و کاهش مکرر طول خود، ساختارهای بسیار دینامیکی هستند، میکروتوبول‌های موجود در دوک میتوز دارای تریدمیلینگ نیز می‌باشند ـ به‌طوری که دائما دایمرها در انتهای (+) میکروتوبول‌ها اضافه شده و از انتهای (-) آنها جدا می‌شوند. این حرکت یکنواخت میکروتوبول‌ها را می‌توان از طریق بیان مقادیر اندکی از توبولین متصل به GFP در درون سلول‌های میتوزی نشان داد بطوریکه این توبولین‌ها به‌طور تصادفی وارد میکروتوبول‌ها شده و منجر به ایجاد نقاط فلورسنت می‌شوند. در این نقاط غلظت توبولین‌های متصل به GFP بیشتر است. این نقاط به عنوان یک علامت بر روی میکروتوبول‌ها عمل می‌کنند، بنابراین از طریق دنبال کردن آنها در یک سلول زنده می‌توان تعیین نمود که آیا میکروتوبول‌ها نسبت به قطب‌های دوک تقسیم ثابت هستند یا این‌که حرکت می‌کنند (شکل ۳۸ـ۱۸). این قبیل آزمایشات نشان می‌دهد که میکروتوبول‌ها عموماً در پرومتافاز، متافاز و آنافاز دارای حرکت ترید میلینگ می‌باشند.

کینه‌توکور از طریق اتصال به کروموزوم‌ها به انتقال آنها کمک می‌کند

به منظور اتصال به میکروتوبول‌ها، هر کروموزوم دارای یک ساختار ویژه تحت عنوان کینه‌توکور می‌باشد. کینه‌توکور در **سانترومر**، یک ناحیه فشرده از کروموزوم متراکم که به صورت DNA سانترومر مشخص می‌شود، قرار گرفته است. ناحیه DNA سانترومر از نظر اندازه می‌تواند خیلی بزرگ باشد؛ در مخمر جوانه‌زن در حدود ۱۲۵bp می‌باشد در حالی که در انسان در حدود ۱Mbp می‌باشد. کینه‌توکورها حاوی کمپلکس‌های پروتئینی زیادی هستند که باعث اتصال DNA سانترومری به میکروتوبول‌ها می‌شوند. در سلول‌های جانوری یک کینه‌توکوری متشکل از یک سانترومر داخلی و لایه‌های داخلی و خارجی کینه‌توکور می‌باشد که در آن انتهای (+) میکروتوبول‌ها به

1- Fluorescence recovery after photobleaching



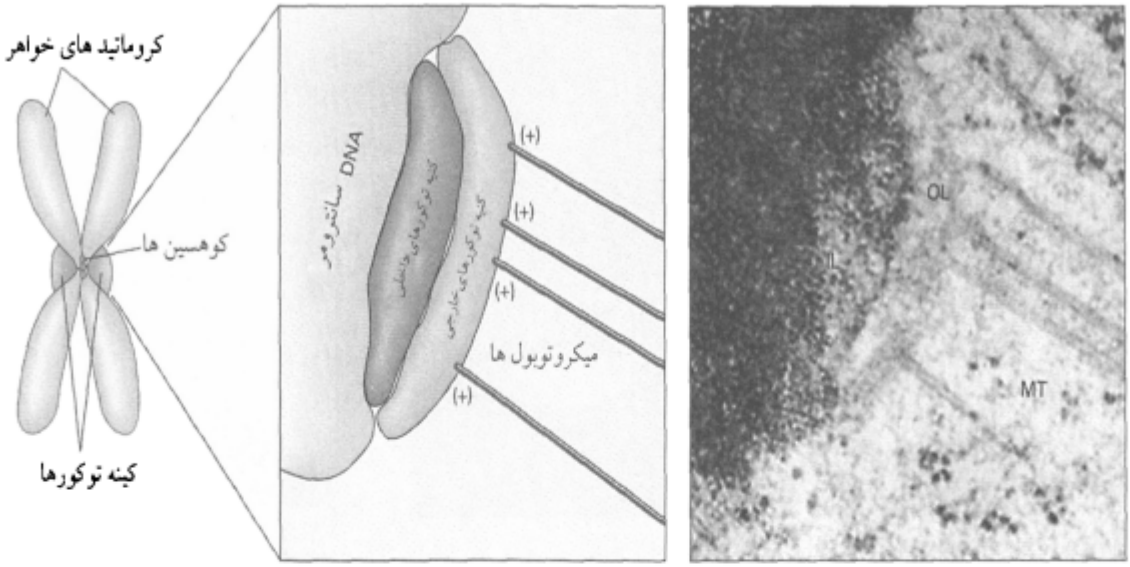
▲ **شکل ۱۸ـ۳۸ (شکل رنگی) در هنگام میتوز میکروتوبول‌ها دارای حرکت تریدمیلینگ به سمت قطبین دوک میتوزی می‌باشند.** (a) مقدار کمی از توبولین ـ GFP در سلول‌های کشت داده شده PtK1 بیان شد این امر به منظور نمایش میکروتوبول‌ها و تولید لکه‌هایی در روی آنها که حاصل امتزاج نابرابر توبولین GFP می‌باشد، صورت می‌گیرد. (b) از طریق دنبال نمودن این لکه‌ها، جهت و سرعت حرکت میکروتوبول‌ها را می‌توان تعیین کرد. رنگ‌ها با توجه به سرعت نشان داده شده در شکل c کدبندی شده است. این آنالیز نشان می‌دهد که میکروتوبول‌ها در این سلول‌ها با سرعت حدود ۰/۷ به سمت قطبین تریدمیل می‌کنند.

لایه خارجی آن ختم می‌شود (شکل ۱۸ـ۳۹). کینه‌توکورهای مخمر توسط یک میکروتوبول منفرد، کینه‌توکورهای انسان توسط حدود ۳۰ میکروتوبول و کروموزوم‌های گیاهی توسط صدها میکروتوبول به قطبین دوک اتصال یافته‌اند.

حال این سئوال مطرح می‌شود که چگونه یک کینه‌توکور در پرومتافاز به میکروتوبول‌ها اتصال می‌یابد؟ میکروتوبول‌های منشأ گرفته از دوک‌های تقسیم میتوزی بسیار دینامیک می‌باشند و زمانی که با کینه‌توکور تماس پیدا می‌کنند، چه به صورت جانبی و چه از طریق انتهاهای خود، این امر منجر به اتصال کروموزومی می‌شود (شکل ۱۸ـ۴۰a، مراحل 1a 1b)میکروتوبول‌های‌رام افتاده توسط این کینه توکورها به‌طور انتخابی از طریق کاهش دادن میزان فروگشت‌ها پایدار می‌شوند و بدین‌وسیله شانس اتصال پایدار را افزایش می‌دهند.

مطالعات اخیر منجر به شناسایی مکانیسمی شده است که در آن پروتئین کوچک Ran GTPase سبب افزایش احتمال برخورد میکروتوبول‌ها به کینه‌توکورها می‌شود. خاطر نشان می‌کنیم که چرخه پروتئین Ran GTPase در انتقال پروتئین‌ها به درون و خارج هسته، که از طریق منافذ هسته‌ای انجام می‌شود، نقش دارد (فصل ۱۳، شکل ۳۶-۱۳ را ملاحظه کنید). در طی میتوز، زمانی که غشای هسته و منافذ آن تخریب می‌شوند، یک فاکتور تبادل‌کننده برای Ran GTPase به کروموزوم‌ها متصل شده و بدین وسیله سبب افزایش غلظت موضعی Ran-GTP می‌شود. از آن‌جایی که آنزیمی که هیدرولیز GTP را در Ran GAP-Ran ـ تحریک می‌کند، یک آنزیم سیتوزولی می‌باشد، این امر سبب تولید یک شیبی از Ran-GTP می‌شود که مرکز آن روی کروموزوم‌ها می‌باشد. Ran-GTP سبب آزادسازی فاکتورهای پیش‌برنده رشد میکروتوبول‌ها شده و بدین طریق سبب جهت‌گیری رشد میکروتوبول‌های منشأ گرفته از قطبین دوک تقسیم به سمت کروموزوم‌ها می‌شوند.

پس از اتصال به میکروتوبول‌ها، پروتئین موتوری دایـنئین / داینا کتین موجود در کینه‌توکور، سبب حرکت جفت کروموزوم متصل به میکروتوبول به سمت قطب دوک تقسیم می‌شود (شکل ۱۸ـ۴۰a، مرحله 2). به همین ترتیب کینه‌توکور آزاد طرف مقابل در سمت قطب دوک تقسیم دیستال قرار می‌گیرد و سرانجام یک میکروتوبول موجود در قطب دوک دیستال به کینه‌توکور آزاد متصل خواهد شد. این



▲ **شکل ۳۹ـ۱۸. ساختار کینه‌توکور پستانداری.** دیاگرام و میکروگراف الکترونی از کینه‌توکور پستانداری

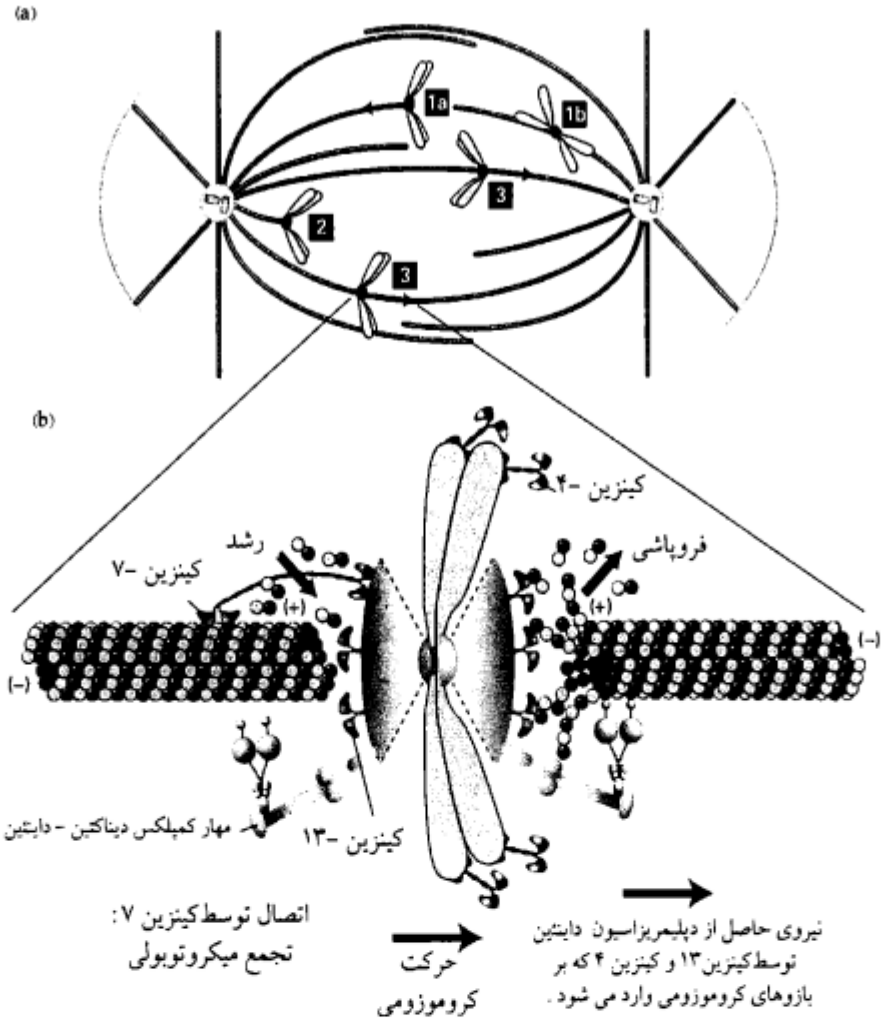
جفت کروموزومی هم‌اکنون اصطلاحاً **کروموزوم دو جهته**[1] گفته‌می‌شود (شکل ۴۰a ـ۱۸، مرحله ❸). وقتی که دو کینه‌توکور یک کروموزوم به قطبین مخالف متصل شده، کروموزوم‌های مضاعف شده تحت کشش قرار گرفته و به دو جهت کشیده[2] می‌شوند.

این کشش بخش کلیدی از مکانیسمی است که طی آن یک سلول به‌طور صحیح کروموزوم‌هایش را جدا می‌کند. زمانی که کروموزوم به‌طور صحیح دو جهته می‌شود، سلول این کشش ایجاد شده را حس می‌کند، و اتصالات کینه توکوری پایدار می‌شود. حال این سئوال مطرح می‌شود اگر هر دو کینه‌توکور به‌طور تصادفی به یک قطب اتصال یابند، چه اتفاقی رخ می‌دهد؟ در این وضعیت، کشش بسیار اندکی بر روی کینه‌توکور میکروتوبول‌ها اعمال شده، و نوسازی کینه‌توکور میکروتوبول‌ها افزایش می‌یابد. دقیقاً چه‌طور سلول این کشش را احساس می‌کند، هنوز نامشخص است.

کروموزوم‌های مضاعف شده توسط موتورها و تریدمیلینگ میکروتوبول‌ها صف آرایی می‌کنند

در طی مرحله پرومتافاز، کروموزوم‌ها طی فرایندی تحت عنوان گردهمایی کروموزومی، در نقطه‌ای بین دو قطب دوک تقسیم صف آرایی می‌کنند. در طی این فرایند، جفت‌های کروموزومی قبل از این‌که به نقطه وسط برسند، در جهت جلو و عقب مرتباً نوسان می‌کنند. گردهمایی کروموزومی نیازمند فعالیت هماهنگ چندین موتور وابسته به میکروتوبول به همراه تریدمیلینگ میکروتوبول‌ها می‌باشد (شکل ۴۰b ـ۱۸). این حرکت نوسانی نیازمند طویل شدن میکروتوبول‌های متصل به یک کینه‌توکور و کوتاه شدن میکروتوبول‌های متصل به کینه‌توکور دیگر، بدون این‌که اتصالات آنها از بین برود، می‌باشد. در متازوان، چندین موتور وابسته به میکروتوبول در این فرایند نقش دارند. در ابتدا، کمپلکس داینئین / داینا کتین سبب تولید نیروی کشش قوی جفت کروموزومی به سمت قطب دیستال می‌شود. این حرکت نیازمند تحریک کوتاه شدن میکروتوبول که به وسیله پروتئین کینزین-۱۳ موجود در کینه‌توکور افزایش می‌یابد، می‌باشد. میکروتوبول‌های متصل به کینه‌توکور دیگر زمانی که کروموزوم حرکت می‌کند، رشد می‌کنند. یک موتور مربوط به کینزین، کینزین-۷ به این کینه‌توکور قلاب شده است و در انتهای (+) میکروتوبول در حال رشد حفظ می‌شود. علاوه بر این، نوع دیگری از کینزین تحت عنوان کینزین -۴ نیز که با بازوهای کروموزومی ارتباط دارد، در ایجاد گردهمایی کروموزومی نقش دارد. پروتئین کینزین -۴ که یک موتورجهت‌گیری شده به سمت انتهای (+) می‌باشد، با میکروتوبول‌های قطبی میانکنش داده و بدین ترتیب سبب کشش کروموزوم‌ها به سمت مرکز دوک تقسیم می‌شود. زمانی که کروموزوم‌ها در صفحه متافازی گردهم آمدند، کمپلکس داینئین / داینا کتین از کینه‌توکورها رها شده و سبب حرکت میکروتوبول‌های کینه‌توکور به سمت قطبین می‌شود. این فعالیت‌های مختلف و

1- Bi-oriented 2- Tension



▲ **شکل ۴۰-۱۸ به دام افتادن و گردهمایی کروموزوم در پرومتافاز.** (a) در اولین مرحله پرومتافاز، کروموزوم‌ها به انتهای یک میکروتوبول (a❶) یا به کناره یک میکروتوبول (b❶) متصل می‌شوند. سپس کروموزوم مضاعف شده به وسیله موتور داینئین / داینا کتین متصل به کینه‌توکور که به سمت انتهای (-) یک میکروتوبول حرکت می‌کند، به سمت قطب‌های دوک تقسیم کشیده می‌شود (❷). سرانجام یک میکروتوبول از قطب مخالف پدیدار شده و به کینه‌توکور آزاد اتصال می‌یابد، و این کروموزوم اکنون کروموزوم دو جهته گفته می‌شود (❸). سپس کروموزوم دو جهته طی فرایندی تحت عنوان گردهمایی کروموزومی به سمت یک نقطه مرکزی بین قطبین دوک تقسیم حرکت می‌کند. توجه نمایید که در طی این مراحل، بازوهای کروموزوم در جهت خلاف نزدیک‌ترین قطب تقسیم جهت‌گیری می‌کنند که این به علت حضور موتورهای کروموکینزین / کینزین -۴ موجود بر روی بازوهای کروموزومی می‌باشد که به سمت انتهاهای (+) میکروتوبول‌های قطبی حرکت می‌کنند. (b) گردهمایی کروموزومی نیازمند ارتعاشات دو طرفه کروموزوم‌ها می‌باشد که در آن مجموعه‌ای از میکروتوبول‌های یک کینه‌توکور در یک جهت در حال کوتاه شدن هستند و دسته دیگر از آنها در جهت مخالف در حال طویل شدن هستند. در سمتی که در حال کوتاه شدن می‌باشد، یک پروتئین کینزین ۱۳ سبب تخریب و کوتاه شدن میکروتوبول‌ها شده و یک کمپلکس داینئین / داینا کتین این کروموزوم را به سمت قطب حرکت می‌دهد. در سمتی که میکروتوبول در حال طویل شدن می‌باشد، یک پروتئین CENP-E / کینزین -۷ بر روی میکروتوبول در حال رشد قراردارد. این کینه‌توکور هم‌چنین حاوی کمپکس‌های پروتئینی اضافه دیگری نیز می‌باشد که در این جا نشان داده نشده‌اند.

نیروهای مخالف هم به‌طور هماهنگ با یکدیگر عمل کرده و بدین ترتیب تمامی کروموزوم‌ها را به صفحه متافازی منتقل می‌کنند. زمانی که این کار با موفقیت انجام شد، سلول آماده آنافاز می‌باشد. همان‌طور که در بخش ۲۰ بحث می‌کنیم، سلول دارای یک مکانیسم **- نقطه کنترلی دوک تقسیم**[1] - می‌باشد که این امر تضمین می‌کند تا زمانی که تمامی کروموزومی‌ها به صفحه متافازی نرسند، آنافاز انجام نمی‌شود.

1- Spindle checkpoint

آنافاز A از طریق کوتاه شدن میکروتوبولی سبب حرکت کروموزوم‌ها به قطبین می‌شود

مرحله شروع آنافاز A یکی از شگفت‌انگیزترین حرکاتی است که در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده می‌باشد. در این مرحله به‌طور ناگهانی دو کروماتید دختری از یکدیگر جدا شده و به سمت قطبین مربوطه کشیده می‌شوند. از آن‌جایی که میکروتوبول‌های کینه‌توکوری تحت‌کشش می‌باشد، به نظر می‌آید که این فرایند بسیار سریع انجام می‌شود بعلاوه از آنجایی که اتصالات پروتئین چسبنده بین کروموزوم‌ها به سرعت از بین می‌رود کروموزوم‌ها قادر به حرکت می‌شوند.

آزمایشات انجام شده بر روی کروموزوم‌ها متافازی نشان داده که حرکت آنافاز A توسط کوتاه شدن میکروتوبول‌ها انجام می‌شود. این عمل با استفاده از کشش ساختاری ذخیره شده که به وسیله برداشت کلاهک GTP رها می‌شود، صورت می‌گیرد. این فرایند به خوبی در *In Vitro* قابل مشاهده می‌باشد. زمانی که کروموزوم‌های متافازی به میکروتوبول‌های تخلیص شده، اضافه شدند آنها عمدتاً به انتهاهای (+) میکروتوبول‌ها اتصال یافتند. رقیق نمودن این مخلوط که به منظور کاهش غلظت دایمرهای توبولین آزاد انجام می‌پذیرد منجر به حرکت کروموزوم‌ها به سمت انتهاهای (-) گردید که این عمل به واسطه دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در انتهای (+) متصل به کروموزوم انجام شد. بررسی‌های اخیر نشان داده که در دروزوفیلا دو پروتئین کینزین-۱۳، گروهی یک دسته از پروتئین‌های دپلیمریزه‌کننده میکروتوبول (شکل ۱۶ـ۱۸ را ملاحظه کنید)، در حرکت کروموزوم‌ها در آنافاز A نقش دارند. یکی از این پروتئین‌های کینزین -۱۳ در کینه‌توکور قرار داشته و تخریب و کوتاه شدن میکروتوبول را در آنجا افزایش می‌دهد (شکل ۴۱ـ۸ (B1 (A1)) و پروتئین دیگر در قطب دوک تقسیم قرار داشته و سبب افزایش دپلیمریزاسیون در آنجا می‌شود (شکل ۴۱ـ۱۸ـ (A2)). بنابراین حداقل در مگس، آنافاز A به نوبه خود توسط پروتئین‌های کینزین-۱۳ که به‌طور اختصاصی در کینه‌توکور و قطب دوک تقسیم قرار گرفته‌اند، انجام می‌شود. کینزین -۱۳ منجر به کوتاه شدن میکروتوبول‌های کینه‌توکوری در هر دو قطب (+) و (-) شده و باعث کشیده شدن کروموزوم‌ها به قطبین می‌شوند.

آنافاز B به واسطه عمل ترکیبی کینزین‌ها و داینئین سبب جدا شدن قطبین دوک تقسیم می‌شود

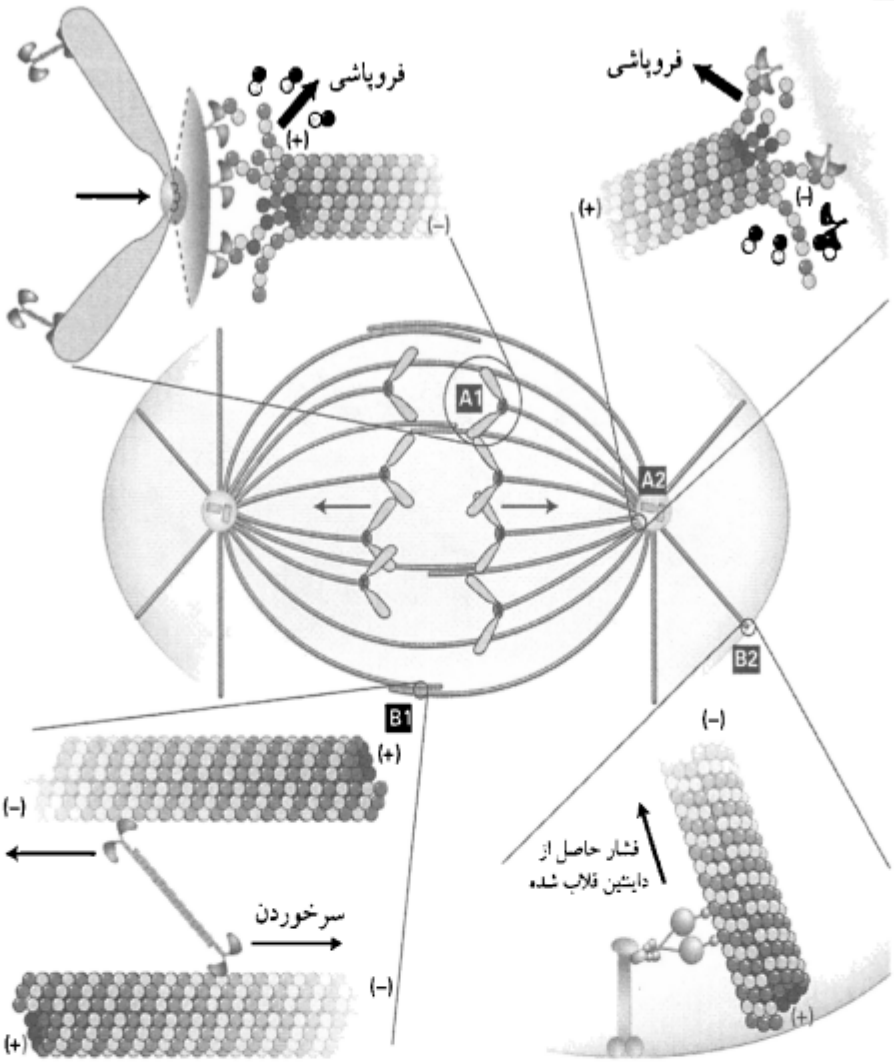
بخش دوم آنافاز شامل جدا شدن قطبین دوک‌های تقسیم طی فرآیندی تحت عنوان آنافاز B می‌باشد. یک عامل بسیار مهم در این حرکت مربوط به حضور پروتئین‌های دوقطبی کینزین -۵ می‌باشد (شکل ۴۱ـ۱۸). این موتورها با میکروتوبول‌های قطبی که با یکدیگر هم‌پوشانی دارند، ارتباط داشته و از آن‌جایی که این موتورها به سمت انتهای (+) جهت‌گیری می‌نمایند، سبب جدا شدن قطبین از یکدیگر می‌شوند. مادامی که این فرایند در حال انجام می‌باشد، میکروتوبول‌های قطبی به منظور جبران افزایش فاصله بین قطبین دوک تقسیم بایستی رشد نمایند ـ به‌طور همزمان میکروتوبول‌های کینه توری در آنافاز A در حال کوتاه شدن می‌باشند! موتور پروتئین دیگر ـ موتور سیتوپلاسمی داینئین که به سمت انتهای (-) میکروتوبول جهت‌گیری کرده است و در کورتکس سلولی قراردارد- باعث کشیده شدن میکروتوبول‌های ستاره‌ای شده و بنابراین به جدا شدن قطبین دوک تقسیم کمک می‌کند (شکل ۴۱ـ۱۸).

مکانیسم‌های دیگری در تشکیل دوک تقسیم نقش دارند

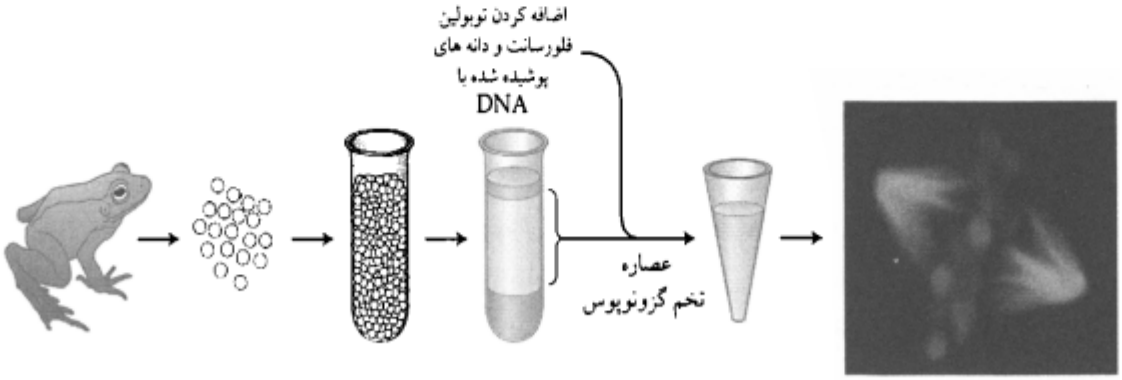
چندین مورد در *In Vivo* وجود دارد که در آن مکان‌ها دوک‌های تقسیم در غیاب سانتروزوم‌ها تشکیل می‌شود. این عمل نشان می‌دهد که هسته‌ای شدن میکروتوبول‌ها از سانتروزوم‌ها تنها راه تشکیل دوک تقسیم نمی‌باشد. مطالعات چشمگیر بر روی عصاره‌های میتوزی تخم‌های قورباغه ـ عصاره‌هایی که فاقد سانتروزوم می‌باشند ـ نشان می‌دهد که افزودن دانه‌های پوشیده شده با DNA برای سنتز و رشد یک دوک تقسیم میتوزی نسبتاً طبیعی کافی می‌باشد (شکل ۴۲ـ۱۸). در این سیستم، این دانه‌ها از میکروتوبول‌ها و فاکتورهای موجود در این عصاره استفاده کرده و باعث ساخت یک دوک تقسیم می‌شود. یکی از فاکتورهای لازم برای این واکنش داینئین سیتوپلاسمی می‌باشد که عقیده بر این است که به دو میکروتوبول متصل شده و به انتهای (-) آنها مهاجرت کرده و بدین طریق آنها را به‌طور همزمان می‌کشد.

سیتوکینز سلول مضاعف شده را به دو سلول مجزا تقسیم می‌کند

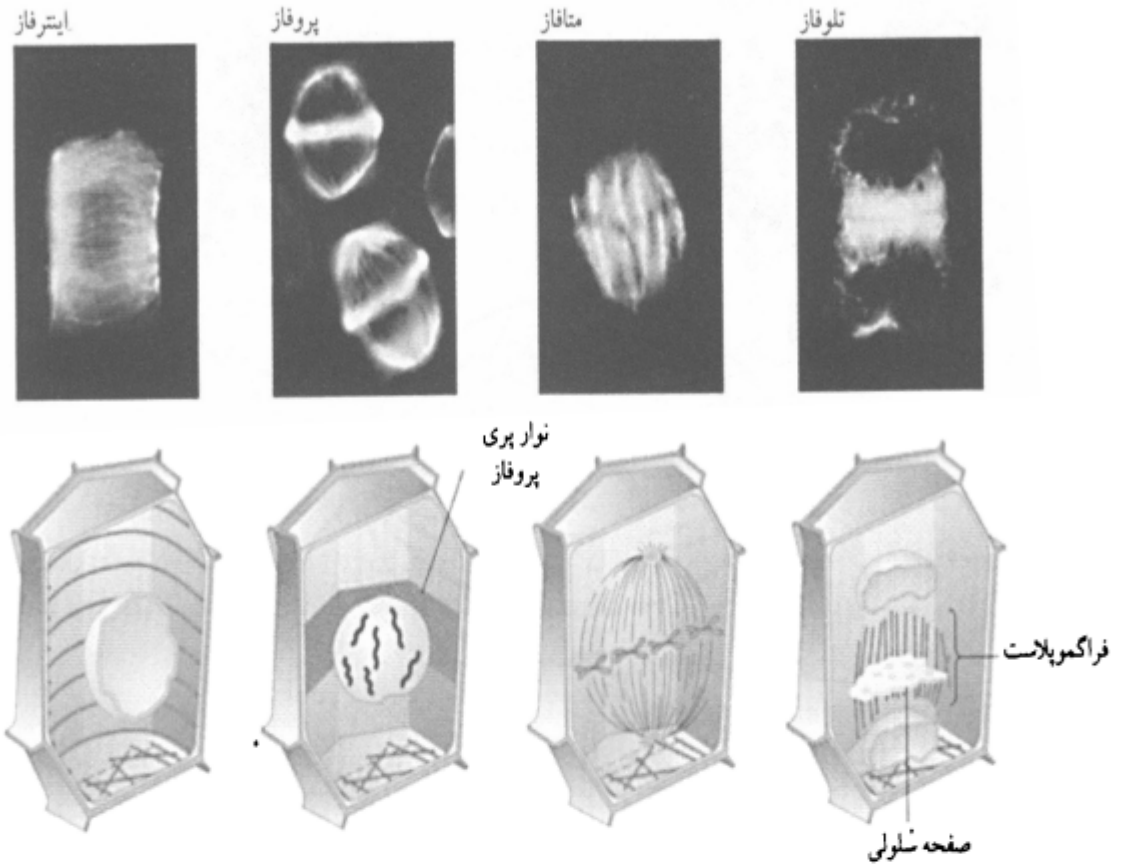
در سلول‌های جانوری در اواخر آنافاز و تلوفاز سلول یک حلقه انقباضی، که دارای ساختار میکروفیلامنتی متصل به غشای پلاسمایی می‌باشد، را سنتز می‌کند. این حلقه نهایتاً منقبض شده و طی فرایندی که تحت عنوان سیتوکینز نامیده می‌شود، سلول را به دو



▲ **شکل ۱۸ـ۴۱ حرکت کروموزومی و جدا شدن قطب دوک تقسیم در آنافاز.** حرکت آنافاز A توسط پروتئین‌های کوتاه‌کننده میکروتوبول تحت عنوان کینزین -۱۳ که در کینه‌توکور A1 و قطب دوک تقسیم A2 قرار دارند، هدایت می‌شود. توجه نمایید که بازوهای کروموزومی هنوز دور از قطبین دوک میتوزی قرار دارند که این امر به واسطه اعضای کمپلکس کروموکینزین / کینزین-۴ می‌باشد، بنابراین نیروی دپلمیریزه‌کننده بایستی قادر به غلبه کردن بر نیروی کشنده بازوهای کروموزومی به سمت مرکز دوک تقسیم باشد. آنافاز B نیز دارای دو بخش می‌باشد: لغزیدن میکروتوبول‌های قطبی ناهمسو که به وسیله موتور کینزین -۵ که در جهت (+) میکروتوبول‌ها حرکت می‌کند B1 و کمپلکس داینئین / داینا‌کتین که در کورتکس سلول قرار گرفته و سبب کشش مکروتوبول‌های ستاره‌ای می‌شود B2 انجام می‌شود.



▲ **شکل ۱۸ـ۴۲ (شکل رنگی) دوک‌های میتوزی در غیاب سانتروزوم‌ها نیز می‌توانند تشکیل شوند.** از طریق سانتریفیوژ کردن تخم‌های قورباغه که به منظور جدا کردن ماده محلول از اندامک‌ها و زرده آن به کار می‌رود، می‌توان عصاره‌های فاقد سانتروزوم را از اووسیت‌های قورباغه که در میتوز متوقف شده‌اند، جدا نمود. زمانی که توبولین نشان‌دار شده با مواد فلورسانس (سبز) به عصاره‌های حاوی دانه‌های پوشیده با DNA (قرمز) اضافه شد، دوک‌های میتوزی به‌طور خودبه‌خودی از میکروتوبول‌هایی که به‌طور تصادفی هسته‌زایی شده‌اند، در اطراف این دانه‌ها تشکیل می‌شوند.



▲ **شکل ۴۳ـ۱۸ میتوز در یک سلول گیاهی عالی.** میکروگراف‌های ایمونوفلورسانس (بالا) و دیاگرام‌های مربوط (پایین) نشان‌دهنده آرایش میکروتوبول‌ها در سلول‌های گیاهی اینترفازی و میتوزی گیاهی می‌باشد. ردیفی از میکروتوبول‌های کورتکسی در طول اینترفاز سلول را احاطه می‌کند. شبکه‌هایی از میکروتوبول‌ها انتهاهای در حال رشد سلول‌های گیاهی را پوشانده و در طی تقسیم سلولی به حالت دست‌نخورده باقی می‌مانند. زمانی که یک سلول وارد مرحله پروفاز می‌شود، میکروتوبول‌ها در اطراف هسته به صورت دستجاتی درآمده و به شکل دوک تقسیم، مشابه با دوک تقسیم مرحله متافازی سلول‌های جانوری، سازماندهی می‌شوند. در انتهای تلوفاز، غشای پلاسمایی دوباره در اطراف هسته سلول‌های دختر شکل گرفته و فراگموپلاست مشتق شده از گلژی در صفحه استوایی تشکیل می‌شود. وزیکول‌های کوچک اضافی که از کمپلکس گلژی مشتق شده‌اند در صفحه استوایی تجمع یافته و به منظور تشکیل صفحه سلولی جدید با فراگموپلاست ترکیب می‌شوند.

قسمت تقسیم می‌کند (شکل ۳۴ـ۱۸ را ملاحظه کنید). حلقه انقباضی یک دسته نازک از فیلامنت‌های اکتینی است که در بین فیلامنت‌های دو قطبی میوزین II پراکنده شده‌اند (شکل ۳۴ـ۱۷ را ملاحظه کنید). به هنگام رسیدن پیام، این حلقه ابتدا منقبض شده و تولید یک شیار تقسیم[1] می‌کند و سپس سلول را دو بخش تقسیم می‌کند. دو ویژگی حلقه انقباضی برای عملکرد آن ضروری می‌باشد. ابتدا این حلقه بایستی به طور اختصاصی در درون سلول وجود داشته باشد. مشخص شده است که این جایگاه به وسیله پیام‌های ایجاد شده توسط دوک تقسیم تعیین می‌شود. به‌گونه‌ای که حلقه انقباضی در فاصله مساوی بین دو قطبین دوک تقسیم تشکیل می‌شود. مطالعات اخیر بر روی جهش یافته‌های دروزوفیلا نشان می‌دهد که ترکیباتی که در نقطه مرکزی دوک تقسیم در طول آنافاز تجمع می‌یابند، تشکیل حلقه انقباضی را کنترل می‌کنند. با این حال، پیام‌های مولکولی دخیل در هماهنگ نمودن موقعیت دوک تقسیم و موقعیت حلقه انقباضی هنوز شناخته نشده‌اند.

خصوصیت مهم دوم حلقه انقباضی زمان انقباض آن می‌باشد ـ اگر این حلقه قبل از این‌که تمامی کروموزوم‌ها به سمت قطبین مربوطه‌شان حرکت کنند، منقبض شود، عوارض ژنتیکی زیان‌باری بوجود خواهد آورد. در این مورد نیز مکانیسمی که زمان دقیق انقباض را تعیین کند ناشناخته می‌باشد

1- Cleavage furrow

سلول‌های گیاهی میکروتوبول‌های خود را دوباره سازماندهی نموده و در هنگام میتوز یک دیواره سلولی جدید می‌سازند

سلول‌های اینترفازی گیاهان فاقد یک مرکز MTOC که میکروتوبول‌ها را به شکل ردیف‌های شعاعی اینترفازی مشابه سلول‌های حیوانی سازماندهی می‌کند، می‌باشند. در مقابل، در کورتکس سلول‌های گیاهی تعداد زیادی MTOCs قرار گرفته‌اند که هسته اولیه سنتز دستجات عرضی میکروتوبول‌ها را در زیر دیواره سلولی ایجاد می‌کنند (شکل ۴۳ـ۱۸، سمت چپ). میکروتوبول‌هایی که دارای قطبیت مختلط می‌باشند توسط عمل کاتانین، **پروتئین جداکننده میکروتوبولی**[1]، از MTOCs های موجود در کورتکس سلول آزاد می‌شوند؛ از بین رفتن کاتانین موجب تولید میکروتوبول‌های بسیار طویل و سلول‌های بدون شکل می‌شود. علت این امر این است که این میکروتوبول‌های کورتکسی که توسط MAP های ویژه سلول‌های گیاهی با اتصالات عرضی به هم متصل شده‌اند، در آرایش و شکل‌گیری میکروفیبریل‌های سلولزی خارج سلولی که جزء اصلی استحکام دیواره سلول گیاهی هستند، نقش دارند (شکل ۳۷-۱۹ را ملاحظه کنید).

اگرچه حوادث مربوط به میتوز در سلول‌های گیاهی عموماً مشابه سلول‌های جانوری می‌باشد؛ با این حال شکل‌گیری دوک تقسیم و سیتوکینز در گیاهان دارای ویژگی‌های منحصر به فردی باشد (شکل ۴۳ـ۱۸). سلول‌های گیاهی میکروتوبول‌های کورتکسی خود را به شکل دستجات پری‌پروفازی دسته‌بندی کرده و سپس آنها را در مرحله پروفاز به شکل یک دوک تقسیم بدون نیاز به سانتروزوم‌ها، مجدداً سازماندهی می‌کنند. در مرحله متافاز، دستگاه میتوزی سلول‌های گیاهی و جانوری بسیار شبیه به هم می‌باشد. با این حال، تقسیم سلول به دو سلول کاملاً متفاوت از سلول‌های جانوری می‌باشد. وزیکول‌های مشتق شده از گلژی که در مرحله متافاز ظاهر می‌شوند، در امتداد میکروتوبول‌هایی که از هر یک از انتهاهای دوک تقسیم منشعب شده‌اند به درون دستگاه میتوزی انتقال می‌یابند. در مرحله تلوفاز این وزیکول‌ها در نزدیک مرکز سلول در حال تقسیم با یکدیگر ترکیب شده و ساختاری تحت عنوان **فراگموپلاست** را بوجود می‌آورند. فراگموپلاست یک ساختار غشایی است که جایگزین حلقه انقباضی در سلول‌های جانوری می‌باشد. غشای وزیکول‌هایی که فراگموپلاست را می‌سازند تبدیل به غشای پلاسمایی سلول‌های دختری می‌شوند. محتویات این وزیکول‌ها، دارای پیش‌سازهای پلی‌ساکاریدی سلولز و پکتین می‌باشد که صفحه سلولی اولیه را تشکیل می‌دهند که سرانجام به شکل دیواره سلولی جدید بین سلول‌های دختری ظاهر می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۸

میتوز

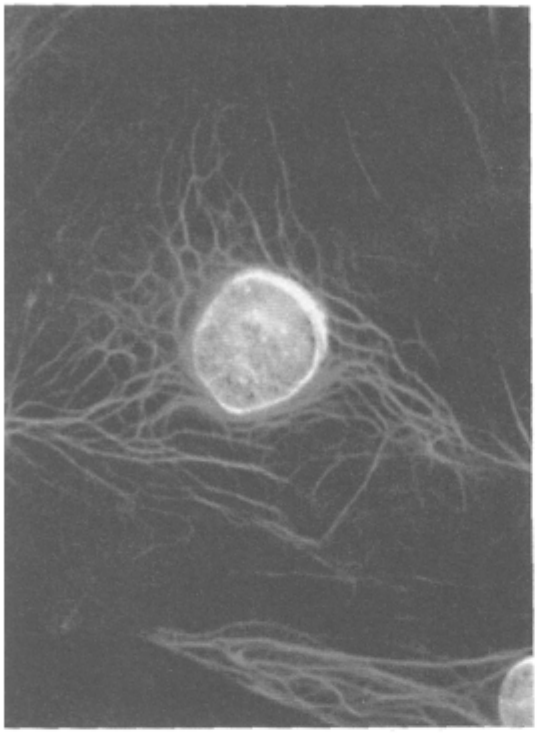
- میتوز ـ جدا شدن دقیق کروموزوم‌های مضاعف شده ـ نیازمند یک ماشین مولکولی متشکل از میکروتوبول‌های تریدمیلینگ دینامیک به همراه موتورهای مولکولی می‌باشد.
- دوک میتوزی دارای سه دسته از میکروتوبول‌ها می‌باشد که تمامی آنها از قطبین دوک تقسیم منشأ می‌گیرند و عبارتند از میکروتوبول‌های کینه‌توکوری که به کروموزوم‌ها متصل می‌شوند؛ میکروتوبول‌های قطبی منشعب شده از قطبین دوک میتوزی که در ناحیه میانی دوک تقسیم با یکدیگر همپوشانی دارند و میکروتوبول‌های ستاره‌ای که به کورتکس سلول گسترش می‌یابند (شکل ۳۶ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- در مرحله اول میتوز، پروفاز، کروموزوم‌های هسته‌ای متراکم شده و قطبین دوک تقسیم به دو طرف هسته حرکت می‌کنند (شکل ۳۴ـ۱۸ را ملاحظه کنید)
- در پرومتافاز، غشای هسته تخریب شده و میکروتوبول‌های منشأ گرفته از قطبین دوک تقسیم به جفت‌های کروموزومی ناحیه کینه‌توکور متصل می‌شوند. هر یک از دو کینه‌توکور به دو قطب دوک تقسیم متصل شده که این امر امکان تجمع کروموزوم‌ها را در ناحیه میانی دوک تقسیم فراهم می‌کند.
- در متافاز، کروموزوم‌ها در صفحه متافازی صف آرایی می‌کنند. سیستم کنترلی دوک تقسیم کینه‌توکورهای اتصال نیافته را شناسایی کرده و تا زمانی که تمامی کروموزوم‌ها اتصال یابند، مرحله آنافاز را به تأخیر می‌اندازد.
- در آنافاز، کروموزوم‌های مضاعف شده از یکدیگر جدا شده و به وسیله کوتاه شدن میکروتوبول‌های کینه‌توکوری در هر دو قسمت کینه‌توکور و قطب دوک تقسیم به سمت قطبین دوک حرکت می‌کنند (آنافاز A). قطبین دوک میتوزی نیز به وسیله پروتئین دو قطبی کینزین -۵ که به سمت انتهاهای (+) میکروتوبول‌های قطبی حرکت می‌کند، از یکدیگر جدا می‌شوند (آنافاز B). جدا شدن دوک تقسیم توسط دابنئین موجود در ناحیه کورتکس سلولی که توسط میکروتوبول‌های ستاره‌ای کشیده می‌شود، تسهیل می‌گردد (شکل‌های ۴۰ـ۱۸ و ۴۱ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- از آن‌جایی که دوک تقسیم میتوزی در غیاب MTOC ها نیز توانایی رشد و سنتز دارد، مکانیسم‌های دیگری در صحت میتوز نقش دارند.
- موقعیت شیار تقسیم ایجاد شده توسط اکتین ـ میوزین توسط موقعیت دوک میتوزی تعیین می‌شود و در مرحله سیتوکینز این شکافت منقبض شده و سلول را به دو قسمت تقسیم می‌کند.

1- Microtubule-severing protein

۷-۱۸ فیلامنت‌های حد واسط

سومین سیستم فیلامنتی عمده در یوکاریوت‌ها مجموعاً تحت عنوان **فیلامنت‌های حد واسط** نامیده می‌شود. این نام منعکس‌کننده قطر آنها می‌باشد که حدود ۱۰ نانومتر بوده و حد واسط بین قطر ۸-۶ نانومتری میکروفیلامنت‌ها و فیلامنت‌های ضخیم میوزین در ماهیچه اسکلتی می‌باشد. فیلامنت‌های حد واسط سراسر سیتوپلاسم شبکه غشاء داخلی هسته سلول‌های اینترفاز جانوران را پوشش می‌دهد. (شکل ۴۴-۱۸ را ملاحظه کنید). فیلامنت‌های حد واسط دارای چندین ویژگی منحصر به فرد می‌باشند که آنها را از میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها متمایز می‌کند. اول؛ این فیلامنت‌ها از نظر شیمیایی بسیار ناهمگن - یا به عبارتی، بسیار متفاوت هستند، اما از نظر تکاملی به یکدیگر وابسته‌اند، به گونه‌ای که اغلب به صورت ویژه در بافت‌های خاصی بیان می‌شوند. دوم؛ آنها دارای مقاومت کششی بالایی هستند که به وضوح در مو و ناخن، که عمدتاً متشکل از فیلامنت‌های حد واسط سلول‌های مرده هستند، دیده می‌شود. سوم؛ این فیلامنت‌ها فاقد قطبیت ذاتی موجود در میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها می‌باشند و زیرواحدهای سازنده آنها به نوکلئوتید اتصال نمی‌یابند. چهارم؛ از آن‌جایی که این فیلامنت‌ها فاقد قطبیت ذاتی هستند، این امر عجب نخواهد بود که هیچ موتوری شناخته نشده که از این فیلامنت‌ها به عنوان مسیر حرکت خود استفاده نمایند. پنجم؛ اگرچه آنها بر اساس تبادل زیرواحدها، ساختارهای دینامیک هستند، ولی چون سرعت تبادل بسیار آهسته‌تر می‌باشد، بنابراین آنها نسبت به میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها پایداری بیشتری دارند. در واقع، یک راه استاندارد برای تخلیص فیلامنت‌های حد واسط این هست که سلول‌ها را تحت شرایط استخراج شدید قرار دهیم، به گونه‌ای که تمامی غشاءها، میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها حل شده و در نتیجه آن چیزی که می‌ماند تقریباً به‌طور ویژه فیلامنت‌های حد واسط می‌باشند. نهایتاً فیلامنت‌های حد واسط در تمامی یوکاریوت‌ها وجود ندارند. قارچ‌ها و گیاهان فاقد فیلامنت‌های حد واسط هستند و حشرات تنها دارای یک رده از آنها می‌باشند که به وسیله دو ژن که لامین‌های A/C و B را بیان می‌کنند، مشخص می‌شوند.

این ویژگی‌ها فیلامنت‌های حد واسط را به ساختارهای مهم و منحصر به فرد در متازوان تبدیل می‌کند. اهمیت فیلامنت‌های حد واسط به واسطه شناسایی بیش از ۴۰ اختلال بالینی که تعدادی از آنها در زیر بحث شده است، و عمدتاً مرتبط با نقص در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های فیلامنت‌های حد واسط می‌باشد، مشخص

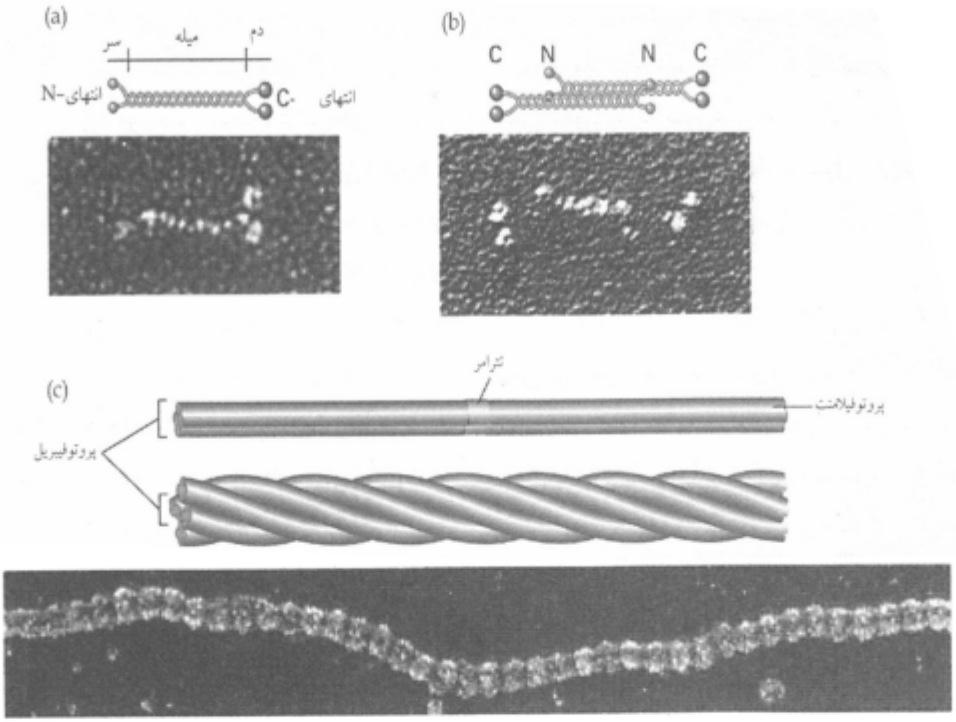


▲ **شکل ۴۴-۱۸ (شکل رنگی) مکان یابی دو نوع از فیلامنت‌های حد واسط در یک سلول اپی‌تلیال.** میکروگراف یک سلول PtK2 که توسط آنتی‌بادی‌های کراتین (قرمز) و لامین (آبی) رنگ‌آمیزی شده است. شبکه تورمانند فیلامنت‌های حد واسط لامین را در زیر غشاء هسته‌ای و کشیدگی فیلامنت‌های کراتین را از هسته تا سمت غشاء پلاسمایی می‌توان مشاهده کرد.

می‌شود. به منظور فهم مشارکت این فیلامنت‌ها در ساختار سلول و بافت، ما ابتدا ساختار پروتئین‌های فیلامنت‌های حد واسط و این‌که چه‌طور به شکل یک فیلامنت درمی‌آیند را مورد بررسی قرار می‌دهیم. سپس رده‌های مختلف فیلامنت‌های حد واسط و عملکردهایی را که انجام می‌دهند توصیف می‌کنیم.

فیلامنت‌های حد واسط حاصل تجمع زیرواحدهای دایمر می‌باشند

فیلامنت‌های حد واسط (IFs) در ژنوم انسان توسط ۷۰ ژن متفاوت کد می‌شود و حداقل شامل ۵ زیرخانواده می‌باشند. ویژگی منحصر به فرد پروتئین‌های IF وجود یک دُمین میله‌ای مارپیچ α بوده که متشکل از حدود ۶۱۰ ریشه اسید آمینه بوده و دارای ویژگی‌های مکانی شبیه به یک موتیف پیچ - پیچ می‌باشد (شکل ۹a-۳ را ملاحظه کنید). دو طرف دُمین میله‌ای، دُمین‌های N-ترمینال و C- ترمینال غیر مارپیچی با اندازه‌های مختلف می‌باشند



▲ **شکل ۱۸ـ۴۵ ساختار و تجمع فیلامنت‌های حد واسط.** میکروگراف‌ها و تصاویر الکترونی مربوط به دایمرهای پروتئینی IF، ترامرهای IF و فیلامنت‌های حد واسط بالغ آسکاریس، یک کرم انگل روده. (a) پروتئین‌های IF دایمرهای موازی تشکیل می‌دهند که دارای یک دُمین مرکزی پیچ - پیچ و بسیار حفظ شده می‌باشند. سرها و دم‌های کروی از نظر طول و توالی در بین رده‌های مختلف فیلامنت‌های حد واسط کاملاً متفاوت هستند. (b) یک ترامر به وسیله تجمع پهلو به پهلو و آنتی‌پارالل دو دایمر یکسان ایجاد می‌شود. (c) ترامرها به صورت انتها به انتها و به‌طور جانبی تجمع یافته و یک پروتوفیبریل را تولید می‌کنند. در یک فیلامنت دارای چهار پروتوفیبریل، دُمین‌های کروی تشکیل دستجات دانه‌ای‌شکل در سطح را می‌دهند.

که در دسته‌جات مختلف IF ویژه و اختصاصی می‌باشد.

بلوک ساختاری اولیه برای فیلامنت‌های حد واسط یک دایمر می‌باشد (شکل ۱۸ـ۴۵a) که توسط دُمین‌های میله‌ای که به شکل یک موتیف پیچ - پیچ اتصال یافته‌اند، در کنار یکدیگر نگه داشته می‌شوند. سپس این دایمرها به طریق متوازن با یکدیگر ارتباط داشته و یک ترامر را تشکیل می‌دهند که در آن دو دایمر دارای جهت‌گیری مخالف هم می‌باشند (شکل ۱۸ـ۴۵b). این ترامرها به شکل انتها به انتها تجمع یافته و تشکیل پروتوفیلامنت‌های طویل را می‌دهند. هر چهار پروتوفیلامنت یک پروتوفیبریل را تولید می‌کند و هر چهار پروتوفیبریل به صورت پهلو به پهلو به یکدیگر اتصال یافته و تولید فیلامنت ۱۰ نانومتری را می‌کند. بنابراین هر فیلامنت حد واسط حاوی ۱۶ پروتوفیلامنت می‌باشد. از آن‌جایی که این ترامر به صورت متقارن می‌باشد، فیلامنت‌های حد واسط فاقد قطبیت می‌باشند. این شرح و توصیف از فیلامنت بر پایه ساختار آن می‌باشد: در حال حاضر این‌که چه‌طور فیلامنت‌های حد واسط در *In Vivo* تجمع و سنتز می‌شوند، هنوز مشخص نشده است. بر خلاف میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها، تا کنون هیچ‌گونه پروتئین هسته‌ای کننده، حبس کننده، کلاهک‌دار کننده، یا پروتئین‌های جداکننده فیلامنت در مورد فیلامنت‌های حد واسط شناخته نشده است.

پروتئین‌های فیلامنت‌های حد واسط به صورت ویژه بافتی بیان می‌شوند

تجزیه و تحلیل توالی پروتئین‌های IF نشان می‌دهد که آنها حداقل در پنج دسته هومولوگ کاملاً مجزا قرار می‌گیرند که چهار دسته از آنها دارای یک شباهت قوی از نظر نوع توالی و منشأ تکاملی نوع سلولی که پروتئین IF در آن بیان می‌شود، می‌باشند (جدول ۱ـ۱۸).

کراتین‌ها که دسته‌جات I و II را تشکیل می‌دهند، در سلول‌های اپی‌تلیال یافت می‌شوند. دسته III فیلامنت‌های حد واسط عموماً در سلول‌هایی با منشأ مزودرمی یافت می‌شوند و دسته IV شامل **نوروفیلامنت‌ها** می‌باشند که در نورون‌ها یافت می‌شوند. **لامین‌ها** رده V را تشکیل می‌دهند که به صورت آستری هسته تمامی بافت‌های جانوری را پوشش می‌دهند. ما در اینجا به‌طور مختصر پنج دسته هومولوگ مختلف و نقش‌های آنها را در سلول‌های

مختلف را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

● **کراتین‌ها:** کراتین‌ها سبب استحکام سلول‌های اپی‌تلیال می‌شوند. اولین دو گروه هومولوگ اصطلاحاً کراتین‌های اسیدی و بازی نامیده می‌شوند. در ژنوم انسان در حدود ۵۰ ژن این کراتین‌ها را کد می‌نمایند. این زیرواحدهای کراتینی به شکل یک دایمر اجباری تجمع می‌یابند، به‌گونه‌ای که هر دایمر متشکل از یک زنجیره اسیدی و یک زنجیره بازی می‌باشد؛ سپس همانطور که در بالا توضیح داده شد، این دایمرها به شکل یک فیلامنت تجمع می‌یابند.

کراتین‌ها تقریباً متنوع‌ترین خانواده پروتئین‌های IF می‌باشند که در آن جفت‌های کراتینی دارای الگوهای بیان متفاوت در سلول‌های اپی‌تلیال متفاوت بوده و هم‌چنین دارای مکانیسم تنظیمی ویژه و متفاوت هستند. از میان آنها کراتین‌هایی که اصطلاحاً کراتین‌های سخت نامیده می‌شوند، در مو و ناخن‌ها یافت می‌شوند. این کراتین‌ها دارای تعداد فراوانی اسیدآمینه سیستئین می‌باشند که اکسید شده و تشکیل پل‌های دی‌سولفید داده و بدین‌وسیله باعث استحکام آنها می‌شوند. این ویژگی توسط افراد دارای صاحب سبک در مو بسیار مورد استفاده می‌باشد: اگر شما شکل موهایتان را دوست ندارید، باندهای دی‌سولفید در کراتین موی شما قابل احیاء شدن بوده و در نتیجه مو تغییر شکل داده و باندهای دی‌سولفید توسط اکسیداسیون مجدداً ایجاد می‌شوند ـ که این عمل معروف به فر دادن[1] می‌باشد.

هم‌چنین کراتین‌هایی تحت عنوان کراتین نرم یا سیتوکراتین‌ها، در سلول‌های اپی‌تلیال وجود دارند. لایه‌های سلول اپی‌درمال پوست مثال مناسبی از عملکرد کراتین‌ها می‌باشد. پایین‌ترین لایه سلولی که **لایه پایه**[2] نامیده می‌شود و در تماس با لامینای پایه می‌باشد، به‌طور مداوم تکثیر یافته و منجر به ایجاد سلول‌هایی تحت عنوان کراتینوسیت‌ها می‌شود. پس از این‌که کراتینوسیت‌ها لایه پایه‌ای را ترک می‌کنند، تمایز یافته و سیتوکراتین‌های زیادی را بیان می‌کنند. سیتوکراتین‌ها به دسموزوم‌ها که جایگاه‌های اتصالی ویژه در بین سلول‌ها می‌باشند، اتصال یافته و بدین وسیله ایجاد صفحات سلولی می‌نمایند که در برابر خراشیدگی مقاومت می‌کنند. این سلول‌ها سرانجام می‌میرند و منجر به ایجاد سلول‌های مرده‌ای می‌شوند که تمامی اندامک‌های سلولی در آنها ناپدید می‌شوند. لایه سلول‌های مرده یک مانع مؤثر در برابر تبخیر آب ایجاد می‌کند که بدون آن ما نمی‌توانیم زنده بمانیم. طول عمر یک سلول پوست، از زمان تولد تا زمانی که به صورت پوسته سلولی از سلول جانوری جدا می‌شود، حدود یک ماه می‌باشد.

در تمامی سلول‌های اپی‌تلیال، فیلامنت‌های کراتین با دسموزوم‌ها، که سلول‌های مجاور را به یکدیگر مرتبط می‌نمایند، و همی‌دسموزوم‌ها که سلول‌ها را به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌کنند، مرتبط بوده و بدین‌وسیله به سلول‌ها و بافت‌ها استحکام می‌دهند. این ساختارها به‌طور کامل‌تر در بخش ۱۹ شرح داده شده است.

علاوه بر این‌که فیلامنت‌های کراتین در استحکام ساختاری نقش دارند شواهد و مدارک زیادی وجود دارند که این فیلامنت‌ها در سازماندهی اندامک‌ها و مسیرهای انتقال پیام نیز مشارکت دارند. به عنوان مثال، در پاسخ به آسیب بافتی، رشد سریع سلول القا می‌شود. در سلول‌های اپی‌تلیال نشان داده شده است که پیام رشد نیازمند میانکنش سلول با یک کراتین ویژه می‌باشد.

● **دسمین:** دسته سوم پروتئین‌های فیلامنت‌های حد واسط شامل وایمنتین موجود در سلول‌های مزانشیم؛ پروتئین فیبری اسیدی گلیال[3] (GFAP) موجود در سلول‌های گلیال؛ و دسمین، موجود در سلول‌های ماهیچه می‌باشند. دسمین سبب استحکام و سازماندهی سلول‌های ماهیچه می‌شود.

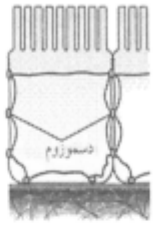
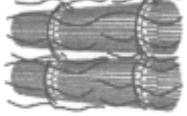
در ماهیچه صاف، فیلامنت‌های دسمین **اجسام متراکم**[4] سیتوپلاسمی، که به آن میوفیبریل‌های انقباضی نیز متصل شده‌اند، را به غشاء پلاسمایی متصل نموده و سبب مقاومت سلول‌ها در برابر کشیدگی زیاد می‌شوند. در ماهیچه اسکلتی، یک شبکه‌ای متشکل از یک دسته از فیلامنت‌های دسمین سارکومر را احاطه کرده است. فیلامنت‌های دسمین دیسک Z را احاطه نموده و دارای اتصالات عرضی با غشای پلاسمایی می‌باشند. فیلامنت‌های دسمین طولی با دیسک‌های Z مجاور موجود در میوفیبریل برخورد کرده و ارتباطات بین فیلامنت‌های دسمین اطراف دیسک‌های Z موجود در میوفیبریل‌های مجاور باعث برقراری اتصال عرضی میوفیبریل‌ها و تشکیل دستجات میوفیبریلی می‌گردد که در سلول ماهیچه نقش دارند. این شبکه هم‌چنین از طریق میانکنش با فیلامنت‌های ضخیم میوزین به سارکومر اتصال یافته است. از آن‌جایی که فیلامنت‌های دسمین سمت خارج سارکومر را می‌پوشانند، این فیلامنت‌ها در تولید نیروهای انقباضی نقش فعالی ندارند. در مقابل، دسمین یک نقش ساختاری ضروری در حفظ یکپارچگی ماهیچه بازی می‌کند. به عنوان مثال، در موش ترانس‌ژنیک فاقد دسمین، این استحکام

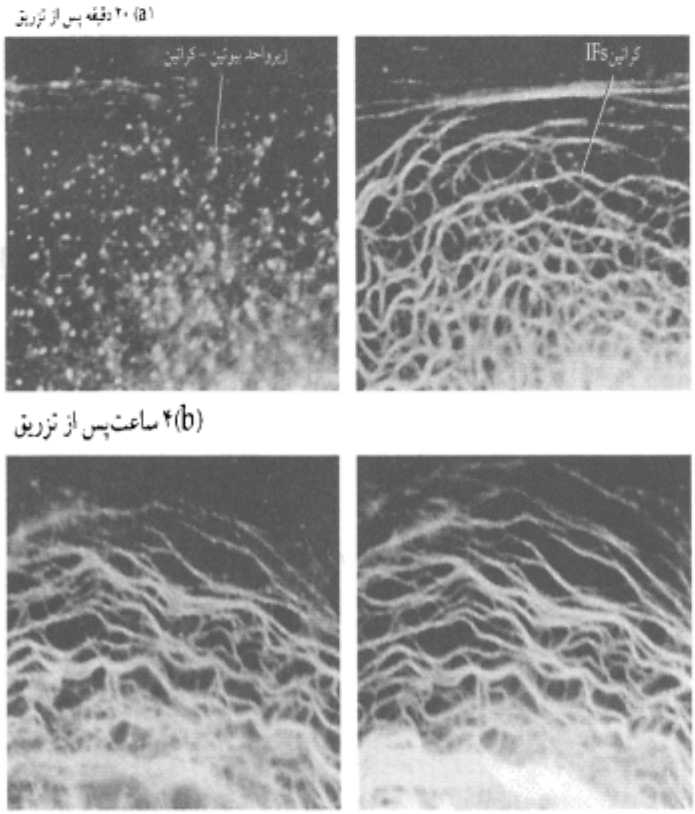
1- Permanent 2- Basal layer

3- Glial fibrillary acidic protein

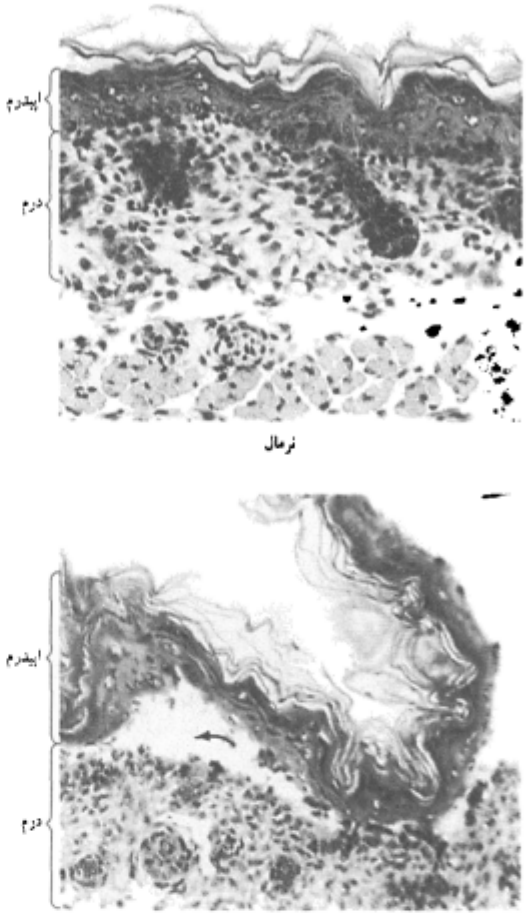
4- Dense bodies

جدول ۱-۱۸ گروههای مهم فیلامنت های حد واسط در پستانداران

گروه	پروتئین	پراکنش	عملکرد پیشنهادی	
I	کراتین های اسیدی	سلول های اپی تلیال	استحکام و یکپارچگی بافت	 سلول های اپی تلیال
II	کراتین های بازی	سلول های اپی تلیال		
III	دسمین ، GFAP, وایمنتین	ماهیچه، سلول های گلیال ، سلولهای مزانشیم	سازمان دهی و یکپارچگی سارکومر	اجسام متراکم ماهیچه صاف  دیسک Z دیسک Z ماهیچه اسکلتی
IV	نوروفیلامنت ها (NFL, NFM, and NFH)	نورون ها	سازمان دهی آکسون	آکسون
V	لامین ها	هسته	ساختار و سازمان دهی هسته	هسته



◀ **شکل ۴۶-۱۸ فیلامنت‌های حد واسط کراتین دینامیک هستند، به‌طوری که کراتین محلول در ساختمان فیلامنت‌ها ادغام می‌شود.** کراتین مونومر نوع I تخلیص شده، به‌طور شیمیایی توسط بیوتین نشان‌دار شده و به درون سلول‌های اپی‌تلیال زنده تزریق شد. سپس این سلول‌ها در زمان‌های مختلف پس از تزریق تثبیت شده و با یک آنتی‌بادی ضد بیوتین و آنتی‌بادی‌های ضد کراتین رنگ‌آمیزی گردید. (a) ۲۰ دقیقه پس از تزریق، کراتین نشان‌دار شده با بیوتین به صورت کانون‌های کوچک و پراکنده در سرتاسر سیتوپلاسم (چپ) متمرکز شد و با کراتین‌های سیتواسکلت سیتوپلاسمی ادغام نشد (راست). (b) پس از گذشت ۴ ساعت، کراتین نشان‌دار شده با بیوتین (چپ) و فیلامنت‌های کراتینی (راست) الگوهای یکسان را نشان دادند، که دلالت بر این دارد که پروتئین تزریق شده در ساختمان پروتئین سیتواسکلتی از قبل موجود ادغام شده است.



▲ **شکل ۴۷ـ۱۸ موش ترانس‌ژنیک حاوی ژن کراتین جهش یافته نوعی تاول پوستی مشابه با بیماری** epidermolysis bullosa simplex **انسانی را نشان می‌دهد.** برش‌های بافتی از پوست یک موش نرمال و یک موش ترانس‌ژنیک حاوی ژن کراتین K14 نشان داده شده است. در موش سالم، پوست حاوی یک لایه اپیدرمی خارجی سخت می‌باشد که در تماس با لایه درمی نرم داخلی می‌باشد. در پوست مربوط به موش ترانس‌ژنیک، این دو لایه به واسطه تضعیف شدن سلول‌ها در پایه اپیدرم از یکدیگر جدا شده‌اند (فلش).

ساختاری از بین رفته و دیسک‌های Z به‌طور نامنظم آرایش یافته‌اند. موقعیت و مورفولوژی میتوکندری‌ها نیز در این موش‌ها غیر طبیعی می‌باشد که نشان می‌دهد فیلامنت‌های حد واسط ممکن است در سازمان‌دهی اندامک‌ها نیز نقش داشته باشند.

● **نوروفیلامنت‌ها:** گروه IV فیلامنت‌های حد واسط متشکل از سه زیرواحد مشابه ـ NF-H, NF-M, NF-L (حروف H و M،L مخفف انگلیسی نوروفیلامنت‌های سبک، متوسط و سنگین می‌باشند) ـ که نوروفیلامنت‌های موجود در اکسون‌های سلول‌های عصبی را تشکیل می‌دهند (شکل ۲ـ۱۸ را ملاحظه کنید). این سه زیرواحد عمدتاً از نظر اندازه دُمین‌های C ترمینال خود با یکدیگر تفاوت داشته و تمامی آنها الزاماً تولید هتروداینمرها می‌کنند. آزمایشات انجام شده بر روی موش ترانس‌ژنیک نشان می‌دهد که نوروفیلامنت‌ها در ایجاد قطر صحیح اکسون‌ها که تعیین‌کننده سرعتی است که در آن امواج عصبی در درون اکسون‌ها، انتقال می‌یابند، ضروری می‌باشند.

● **لامین‌ها:** فراوان‌ترین فیلامنت‌های حد واسط، گروه V یا همان لامین‌ها می‌باشند که باعث استحکام و مقاومت سطح داخلی غشاء هسته می‌شوند (شکل ۴۴ـ۱۸ را ملاحظه کنید). لامین‌ها اجداد تمامی پروتئین‌های IF به علاوه IFهای سیتوپلاسمی می‌باشد که از طریق مضاعف‌سازی و جهش ژنی به وجود آمده‌اند. لامین‌ها تولید یک شبکه دو بُعدی را می‌نمایند که بین غشاء هسته و کروماتین موجود در هسته امتداد یافته‌اند. در انسان، ۳ ژن لامین‌ها را کد می‌نمایند: یکی از این ژن‌ها لامین نوع A و دو ژن دیگر لامین نوع B را کد می‌کنند. به نظر می‌رسد که لامین نوع B ژن اولیه بوده و در تمامی سلول‌ها بیان می‌شود در حالی که لامین‌های نوع A از نظر تکوینی تنظیم می‌شوند. لامین‌های B پس از ترجمه واحدهای ایزوپرنیل کسب می‌کنند که احتمالاً در اتصال آنها به غشاء داخلی پاکت هسته‌ای کمک می‌کند. به علاوه آنها به پروتئین‌های موجود در غشاء داخلی هسته از قبیل **امرین**[1] و **پلی‌پپتیدهای متصل به لامین**[2] (LAP2) متصل می‌شوند. لامین‌ها به چندین نوع پروتئین متصل می‌شوند و مشخص شده است که در سازماندهی کروماتین و تنظیم فواصل بین منافذ هسته‌ای نقش دارد. زمانی که سلول‌ها وارد میتوز می‌شوند، لامین‌ها شدیداً فسفریله شده و تجزیه می‌گردند در تلوفاز همزمان با شکل‌گیری مجدد غشای هسته‌ای این پروتئین‌ها دوباره شکل می‌گیرند.

فیلامنت‌های حد واسط ساختارهای دینامیک می‌باشند

اگرچه فیلامنت‌های حد واسط نسبت به میکروتوبول‌ها و میکروفیلامنت‌ها دارای استحکام بیشتری می‌باشند مشخص شده شده است که زیرواحدهای پروتئین IF در تعادل دینامیک با IF سیتواسکلتون می‌باشند. در آزمایشی، کراتین نوع I نشان‌دار شده با بیوتین به درون فیبروبلاست‌ها تزریق گردید؛ پس از گذشت ۲ ساعت، پروتئین نشان‌دار شده به درون کراتین‌های سیتواسکلتی

1- Emerin

2- Lamin associated protens

موجود ادغام گردید (شکل ۴۶ـ۱۸). نتایج حاصل از این آزمایش و دیگر آزمایشات نشان می‌دهد که زیرواحدهای IF موجود در یک محلول قادر به ادغام با فیلامنت‌های از پیش موجود می‌باشند همچنین این زیرواحدها قادر به جدا شدن از فیلامنت‌های سالم می‌باشند.

پایداری نسبی فیلامنت‌های حد واسط باعث ایجاد نوعی چالش در سلول‌های میتوزی می‌شود این سلول‌ها بایستی هر سه شبکه سیتواسکلتی را در طی چرخه سلولی مجدداً سازماندهی شوند. به‌طور ویژه‌ای، شکستن پاکت هسته‌ای در اوایل میتوز وابسته به فروپاشی فیلامنت‌های لامین می‌باشد که همانند یک شبکه تورمانند باعث استحکام غشاء شده است. همان‌طور که در بخش ۲۰ بحث شده است، فسفریلاسیون لامین‌های هسته‌ای توسط یک کیناز وابسته به سیکلین که در اوایل میتوز (پروفاز) فعال می‌شود، سبب القاء فروپاشی فیلامنت‌های سالم شده و مانع تجمع مجدد آنها می‌گردد. در انتهای میتوز (تلوفاز)، برداشت این فسفات‌ها توسط فسفاتازهای ویژه باعث تجمع مجدد لامین‌هامی شود. این عمل برای شکل‌گیری دوباره پاکت هسته‌ای در اطراف کروموزوم‌های دختری ضروری می‌باشد. بنابراین عملکردهای متضاد کینازها و فسفاتازها باعث ایجاد یک مکانیسم سریع برای کنترل وضعیت تجمعی فیلامنت‌های حد واسط لامین می‌شود. فیلامنت‌های حد واسط دیگر نیز وضعیت فروپاشی و تجمع مجدد مشابهی را در چرخه سلولی طی می‌کنند.

نقص در لامین‌ها و کراتین‌ها سبب بروز بیماری‌های زیادی می‌شود

برای لامین نوع A در حدود ۵۰ نوع جهش در ژنوم انسانی شناخته شده است که این جهش‌ها سبب بروز بیماری‌های متعددی می‌شوند. بسیاری از آنها سبب بروز انواع دیستروفی عضلانی امری- درفوس[1] می‌شوند. جهش‌های دیگر در ژن لامین A سبب اتساع سلول‌های عضلانی قلب[2] می‌شوند. هنوز مشخص نشده است که چرا این نوع جهش‌ها در لامین A سبب بروز EDMD می‌شوند، ولی احتمالاً در بافت‌های ماهیچه‌ای، هسته‌ها که ساختارهای ظریف و حساسی هستند نمی‌توانند فشارها و کشش‌های وارد بر بافت را تحمل کنند و بنابراین آنها اولین جایی هستند که علایم بیماری را نشان می‌دهند. به‌طور جالبی انواع دیگری از EDMD در جهش‌های مربوط به اِمرین، پروتئین متصل‌شونده به لامین که در غشاء داخلی هسته قرار دارد نیز شناسایی شده‌اند. همچنین جهش‌های دیگر در لامین نوع A سبب بروز **پیری زودرس**[3] می‌شود. بنابراین سندرم پیری کودکی هاچیسون ـ گیلفورد[4] (پیری زودرس) به واسطه خطا در پیرایش ژن ایجاد شده که سبب ایجاد نوعی لامین A شده است که فاقد دُمین C ترمینال می‌باشد.

یکپارچگی ساختاری پوست برای مقاومت در برابر سایش و خوردگی ضروری می‌باشد. در انسان و موش، ایزوفرم‌های K4 و K14 کراتین هترودایمرهایی را تشکیل می‌دهند که به شکل پروتوفیلامنت‌ها تجمع می‌یابند. یکی از دُمین‌های N یا C ترمینال K14 باعث می‌شود آن در محیط *In Vitro* هترودایمر تشکیل بدهد ولی این هترودایمرها به شکل پروتوفیلامنت در نمی‌آیند. بیان این قبیل کراتین‌های جهش یافته در سلول‌ها سبب تولید شبکه‌های IF به صورت دستجات و تجمعات شکسته می‌شود. موش ترانس‌ژنیک که نوعی پروتئین K14 جهش یافته را در سلول‌های بنیادی پایه اپیدرم بیان می‌کند دارای نوعی اختلال پوستی شدید، عمدتاً تاول‌های اپیدرمی می‌باشد که سبب نوعی بیماری پوستی شبیه بیماری EBS[5] انسانی می‌شود. بررسی‌های بافتی نواحی تاول‌زده نشان‌دهنده وجود تعداد زیادی از سلول‌های پایه مرده می‌باشد. به نظر می‌رسد که مرگ این سلول‌ها نتیجه ضربات مکانیکی حاصل از مالش‌های پوستی در هنگام حرکت اندام‌های دست و پا باشد. در عدم حضور دستجات نرمال فیلامنت‌های کراتین، سلول‌های پایه جهش یافته شکننده و به راحتی آسیب‌پذیر می‌باشند که باعث می‌شود لایه‌های اپیدرمی متورم و لایه شوند (شکل ۴۷ـ۱۸). همانند نقش فیلامنت‌های دسمین در استحکام بافت عضله، نقش عمومی فیلامنت‌های کراتین حفظ یکپارچگی ساختاری بافت‌های اپی‌تلیال از طریق تقویت مکانیکی اتصالات بین سلول‌ها می‌باشد.

نکات کلیدی بخش ۷-۱۸

فیلامنت‌های حد واسط

- فیلامنت‌های حد واسط تنها جزء رشته‌ای غیر قطبی سیتواسکلتون بوده و فاقد پروتئین‌های موتوری می‌باشند. فیلامنت‌های حد واسط از دایمرهای پیچ ـ پیچ ساخته شده‌اند که به طریق ناهمسو به یکدیگر اتصال یافته‌اند و تولید تترامرها* و سپس پروتوفیلامنت‌ها را می‌کنند. ۱۶ تا از

1- Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)
2- Dilated cardiomyopathy
3- Accelerated aging
4- Hutchison-Gilford progeria
5- Epidermolysis bullosa simplex

پروتوفیلامنت یک فیلامنت حد واسط را می‌سازند (شکل ۴۵ـ۱۸ را ملاحظه کنید).

■ پنج دسته عمده پروتئین حد واسط وجود دارد که در این میان لامین‌های هسته‌ای (دسته V) قدیمی‌ترین و عمومی‌ترین آنها در سلول‌های جانوری می‌باشند. چهار دسته دیگر آنها به صورت ویژه بافتی بیان می‌شوند (جدول ۱ـ۱۸ را ملاحظه کنید).

■ کراتین‌ها (دسته‌جات I و II) در مو و ناخن جانوران وجود دارند. همچنین آنها در فیلامنت‌های سیتوکراتین که با دسموزوم‌ها در سلول‌های اپی‌تلیال اتصال دارند و باعث استحکام سلول‌ها و بافت‌ها می‌شوند، نیز یافت می‌شوند.

■ دسته III فیلامنت‌ها شامل وایمنتین، GFAP و دسمین می‌باشد که ساختمان و نظم موجود در دیسک‌های Z ماهیچه را ایجاد نموده و مانع کشش‌های زیاد ماهیچه صاف می‌شوند.

■ نوروفیلامنت‌ها دسته IV فیلامنت‌های حد واسط را تشکیل داده و در ساختار اکسون نقش اساسی دارند.

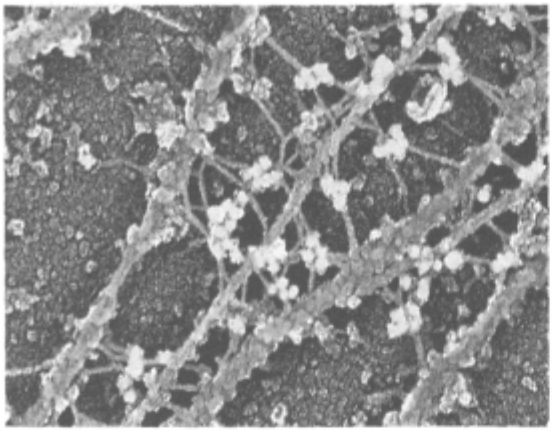
■ بیماری‌های زیادی بدلیل نقص در فیلامنت‌های حد واسط به وجود می‌آیند. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به لامینوپاتی‌ها که دربرگیرنده انواع شرایط گوناگون است، وجهش در ژن‌های کراتین، که منجر به نارسایی‌های شدید در پوست می‌گردد، اشاره نمود. (شکل ۱۸-۴۷).

۸ـ۱۸ هماهنگی و همکاری بین عناصر سیتواسکلتون

تاکنون ما به‌طور عمومی سه دسته فیلامنت‌های سیتواسکلتونی ـ میکروفیلامنت‌ها، میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط ـ را مورد بررسی قرار دادیم که گویی عملکرد آنها مستقل از یکدیگر می‌باشند. با این حال، تعیین جایگاه تشکیل حلقه انقباضی، دارای ساختار میکروفیلامنتی، توسط دوک میتوزی دارای ساختار میکروتوبولی، مثالی است که نشان می‌دهد چه‌طور این دو سیستم سیتواسکلتی با یکدیگر هماهنگ می‌شوند. در اینجا ما نمونه‌های دیگر از این ارتباطات، اعم از فیزیکی و تنظیمی، بین عناصر سیتواسکلتی و وابستگی آنها با اشکال دیگر سازماندهی سلولی را ذکر می‌نماییم.

پروتئین‌های اتصالی به فیلامنت‌های حد واسط در سازماندهی سلولی نقش دارند

گروهی از پروتئین‌ها که مجموعاً پروتئین‌های اتصالی به فیلامنت‌های حد واسط[1] (IFAPs) نامیده می‌شوند همراه با فیلامنت‌های حد واسط تخلیص شناسایی شده‌اند. از جمله این



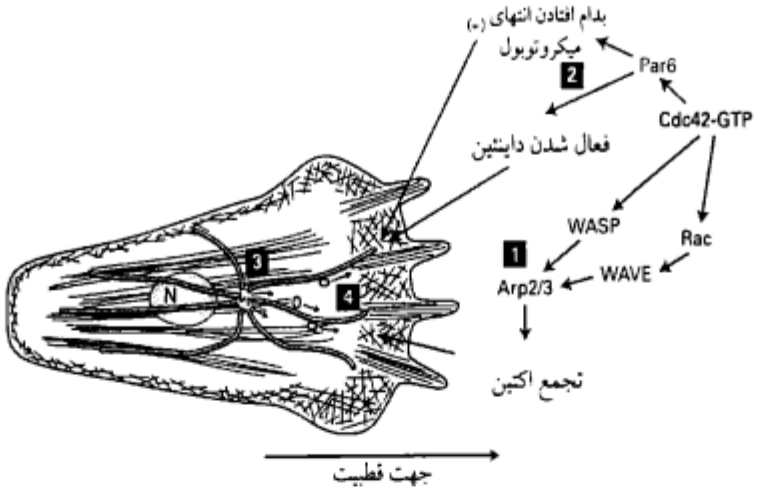
▲ **شکل ۴۸ـ۱۸ (شکل رنگی) آنتی‌بادی نشان‌دار شده با طلا نشان می‌دهد که پلکتین بین فیلامنت‌های حد واسط و میکروتوبول‌ها اتصالات عرضی ایجاد می‌کند.** در میکروگراف ایمونوالکترونی سلول فیبروبلاست، میکروتوبول‌ها با رنگ قرمز، فیلامنت‌های حد واسط با رنگ آبی و رشته‌های اتصالی کوتاه بین آنها با رنگ سبز نشان داده شده‌اند. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های ضد پلکتین نشاندار با طلا (زرد) نشان می‌دهد که این رشته‌ها حاوی پلکتین می‌باشند.

پروتئین‌ها می‌توان خانواده **پلاکین‌ها** را نام برد که در اتصال فیلامنت‌های حد واسط به دیگر ساختارها نقش دارند. تعدادی از این پروتئین‌ها با فیلامنت‌های کراتین ارتباط داشته و باعث اتصال آنها به دسموزوم‌ها و همی دسموزوم‌ها می‌شوند. دسموزوم‌ها اتصالات بین سلول‌های اپی تلیال می‌باشند که باعث پایداری بافت می‌شوند و همی دسموزوم‌ها در نواحی از غشاء قرار گرفته است که در آنجا فیلامنت‌های حدواسط به ماتریکس خارج سلولی متصل شده‌اند (این موضوعات بطور کامل در فصل ۱۹ بحث شده است). انواع دیگر پلاکین‌ها به همراه فیلامنت‌های حد واسط یافت می‌شوند و دارای جایگاه‌های اتصال برای میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها می‌باشند. با استفاده از میکروسکوپ ایمونوالکترون مشاهده شده است که یکی از این پروتئین‌ها، تحت عنوان **پلکتین** باعث ایجاد اتصالاتی بین میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط می‌شود (شکل ۴۸ـ۱۸).

میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها در انتقال ملانوزوم‌ها با یکدیگر همکاری می‌کنند

مطالعات انجام شده بر روی موش جهش یافته دارای پوشش‌های روشن منجر به کشف مسیری شده که در آن

1- Intermediate filament-associated protein (IFAPs)



▲ **شکل ۴۹ـ۱۸ Cdc42 میکروتوبول‌ها و میکروفیلامنت‌هابدون نیاز به قطبی نمودن یک سلول در حال مهاجرت، تنظیم می‌کند.** کمپلکس Cdc42-GTP فعال در جلو سلول منجر به فعالیت Rac می‌شودکه این امر باعث ایجاد یک لبه پیشرو با ساختار میکروفیلامنتی می‌شود (مرحله ❶). به‌طور مستقلی، کمپلکس Cdc42-GTP هم‌چنین منجر به دام افتادن انتهاهای (+) میکروتوبولی و فعال شدن داینئین می‌شود (مرحله ❷). وجود این دو عامل سبب کشیده شدن میکروتوبول‌ها شده تا سانتروزوم (مرحله ❸)، در ناحیه جلوی سلول آرایش یابد. این جهت‌گیری مجدد باعث قطبی شدن مسیر ترشحی وزیکول‌های حامل مولکول‌های چسبنده در امتداد میکروتوبول‌ها می‌شود (مرحله ❹).

میکروتوبول‌ها و میکروفیلامنت‌ها در انتقال گرانول‌های رنگدانه‌ای با یکدیگر همکاری می‌کنند. رنگدانه‌های رنگ موجود در مو در سلول‌هایی تحت عنوان ملانوسیت تولید می‌شوند. ملانوسیت‌ها بسیار شبیه به ملانوفورهای موجود در ماهی و قورباغه که قبلاً بحث شد، می‌باشند، (شکل ۲۸ـ۱۸ را ملاحظه کنید). ملانوسیت‌ها در پیاز مو وجود داشته و حاوی گرانول‌های سرشار از رنگدانه به نام ملانوزوم می‌باشند. این ملانوزوم‌ها سپس به **نواحی شاخه‌دار**[1] ملانوسیت‌ها منتقل شده و از طریق اگزوسیتوز به سلول‌های پی‌تلیال اطراف انتقال می‌یابند. انتقال به سلول‌های اطراف، تنها در ملانوفورهای قورباغه، توسط یک عضو از خانواده کینزین انجام می‌شود. در محیط پیرامون، سپس آنها توسط میوزین V گرفته شده و آماده اگزوسیتوز می‌شوند. اگر سیستم میوزین V دچار اختلال شود، این ملانوزوم‌ها به دام نیفتاده و در درون سلول باقی می‌مانند. بنابراین میکروتوبول‌ها مسئول انتقال طولانی ملانوزوم‌ها می‌باشند در حالی که میوزین V با ساختار میکروفیلامنتی مسئول به دام انداختن و آزادسازی ملانوزوم‌ها در کورتکس سلول می‌باشد. این نوع تقسیم کار ـ انتقال در مسافت‌های طولانی توسط میکروتوبول‌ها و در مسافت کوتاه توسط میکروفیلامنت‌ها ـ در بسیاری از سیستم‌های مختلف همانند انتقال در قارچ‌های رشته تا انتقال در اکسون‌های طویل مشاهده شده است.

Cdc42 سبب هماهنگی میکروتوبول‌ها و میکروفیلامنت‌ها در هنگام مهاجرت سلولی می‌شود

در بخش ۱۷ ما بررسی نمودیم که چه‌طور قطبیت یک سلول در حال مهاجرت توسط Cdc42، که منجر به تشکیل لبه پیشرو برجسته اکتینی در جلو سلول و انقباض در عقب می‌شود، تنظیم می‌شود (شکل‌های ۴۴ـ۱۷ و ۴۹ـ۱۸ مرحله ❶ را ملاحظه کنید). مشخص شده است که فعالیت Cdc42 در جلو سلول نیز منجر به قطبیت سیتواسکلتون میکروتوبولی می‌شود. این امر قبلاً در آزمایشات ترمیم زخم مطالعه شده است (شکل ۴۳ـ۱۷ را ملاحظه کنید) که در آنجا مشاهده شد زمانی که سلول‌ها در لبه‌ها قطبی می‌شوند و به منظور پر کردن محل خراش به حرکت درمی‌آیند کمپلکس گلژی در راستای ناحیه جلوی سلول به سمت هسته حرکت می‌کند. از آن‌جایی که موقعیت گلژی وابسته به جایگاه MTOC می‌باشد(شکل ۱c ـ۸ و ۲۷ـ۱۸ را ملاحظه کنید)، به همین علت سانتروزوم در ناحیه جلوی هسته آرایش می‌یابد. مطالعات اخیر نشان داده که چگونه این رخداد روی می‌دهد. فعالیت Cdc42 در جلو سلول باعث اتصال فاکتور قطبیت Par6 شده که این امر منجر به فراخواندن کمپلکس داینئین / داینا‌کتین می‌شود (شکل ۴۹ـ۱۸ مرحله ❷). کمپلکس داینئین / داینا‌کتین که در ناحیه کورتکس قرار دارد سپس با میکروتوبول‌ها میانکنش داده و آنها را به سمت سانتروزوم کشیده و بنابراین باعث تشکیل آرایش‌های ستاره‌ای کل میکروتوبول‌ها می‌شود (شکل ۴۹ـ۱۸، مرحله ❸). این جهت‌گیری مجدد سیستم میکروتوبولی منجر به سازمان‌دهی مجدد مسیر

1- Dendritic extensions

ترشحی شده تا باعث آزادسازی محصولات ترشحی، به ویژه اینتگرین‌ها تا به ماتریکس خارج سلولی متصل شوند، به ناحیه جلوی سلول شده تا سلول در بخش جلویی خود به بستر متصل شود و مهاجرت کند (شکل ۴۹ـ۱۸، مرحله ❹).

نکات کلیدی بخش ۸-۱۸

هماهنگی و همکاری بین عناصر سیتواسکلتی

- فیلامنت‌های حد واسط به هر دو جایگاه اتصال ویژه، دسموزوم‌ها و همی‌دسموزوم‌ها، که در غشاء پلاسمایی قرار دارند و به میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها اتصال می‌یابند (شکل ۴۸ـ۱۸ را ملاحظه کنید).
- در سلول‌های جانوری، میکروتوبول‌ها عمدتاً برای رساندن اندامک‌ها به مسافت‌های طولانی به‌کار می‌روند، در حالی که میکروفیلامنت‌ها انتقالات موضعی آنها را کنترل می‌کنند.
- مولکول پیام Cdc42 به‌طور هماهنگی میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها را در هنگام مهاجرت سلولی تنظیم می‌کند.

چشم‌اندازی به آینده

در فصل ۱۷ و ۱۸ مشاهده نمودیم که چگونه میکروفیلامنت‌ها، میکروتوبول‌ها و فیلامنت‌های حد واسط در ساختمان و سازماندهی سلول‌ها نقش دارند. بدون این سیستم پیچیده، سلول‌ها نظم کلی و بنابراین کل عملکرد یا قدرت تقسیم خود را از دست خواهند داد. نام «سیتواسکلتون» دربرگیرنده یک ساختار نسبتاً ثابت می‌باشد که در آن سازمان سلولی به حالت معلق قرار گرفته است. با این وجود، سیتواسکلتون در واقع یک چارچوب دینامیک می‌باشد که مسئول مسیرهای انتقال پیام بوده و به‌طور موضعی و کلی در آماده‌سازی سلول‌ها برای انجام عملکردهای‌شان عمل می‌کند.

به طور کلی، بسیاری از عملکردهای ویژه و عمومی سه سیستم فیلامنتی را بررسی نمودیم. ما بسیاری از اجزاء این سیستم و احتمالاً تمامی موتورها را می‌شناسیم. با این وجود در بسیاری جهات این تنها یک آغاز شگفت‌انگیز می‌باشد. با توجه به ژنوم‌های تعیین توالی شده حداقل یک فهرست کامل از اجزاء سیتواسکلتون، ما دارای یک لیست کامل از ترکیبات سیتواسکلتی می‌باشیم. با این حال، این سئوال مطرح است چگونه این اجزاء در انجام فرایندهای ویژه با یکدیگر تجمع می‌یابند.

یک مورد بسیار فعال تحقیقات امروزی استفاده از این لیست اجزاء در شناسایی منظم موقعیت (به وسیله عملکردهای GFP)، عملکردها (توسط غیرفعال کردن با RNAi) و اجزاء همکار (به واسطه جدا نمودن کمپلکس‌های پروتئینی) تمامی اجزاء سیتواسکلتی می‌باشد. در نظر داشته باشید که در حدود ۴۵ ژن کدکننده اعضای خانواده کینزین در جانوران وجود دارند که تاکنون در مورد نقش تعداد اندکی از آنها آگاهی داریم و درباره محموله‌هایی و اهداف آنها نیز اطلاعات ما اندک است. در هر یک از این موارد، منطقی است بپذیریم موتورها تنظیم می‌شوند در مورداین تنظیم نیز یافته‌های ما بسیار اندک می‌باشد. زمانی که ما تمام چیزها را در جای خود قرار دهیم، امکان بازسازی فرایندهای ویژه را در حالت *In Vitro* فراهم کرده‌ایم. برخی از جنبه‌های دوک تقسیم میتوزی هم‌اکنون بازسازی شده‌اند که یک آغاز موفقیت‌آمیز می‌باشد، ولی برای این‌که امکان بازسازی کل فرایند میتوز ایجاد شود، نیاز به زمان زیادتری داریم.

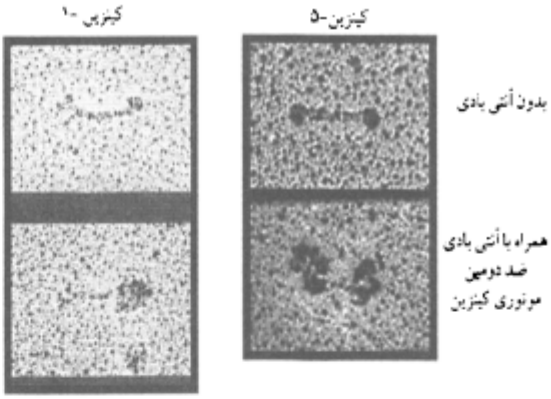
زیست‌شناسی ساختاری نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند، زیرا به ما امکان مطالعه دقیق نقش اجزاء مختلف را می‌دهد. به پروتئین‌هایی که با انتهای (+) میکروتوبول ارتباط دارند و اصطلاحاً +TIPs نامیده می‌شوند توجه شود. ما از نظر ساختاری نمی‌دانیم چه‌طور این پروتئین‌ها ارتباطشان را در انتهای (+) حفظ می‌کنند. کارهای اخیر نشان می‌دهد که این ارتباطات در بخش‌های مختلف سلول می‌تواند متغیر باشد ـ در این مورد نیز ما تنها در ابتدای راه هستیم تا بفهمیم که چه‌طور این فرایندها تنظیم می‌شوند.

شاید بزرگ‌ترین ـ و مهیج‌ترین ـ ابهام این است که مشخص نماییم چگونه مسیرهای انتقال پیام عملکردهای بین تمامی عناصر مختلف سیتواسکلتون را هماهنگ می‌کنند. ما اکنون برآنیم تا به‌طور اجمالی ببینیم که چگونه مسیرهای انتقال پیام قطبیت سلول را تنظیم نموده و امکان مهاجرت سلولی را فراهم می‌نماید.

اگرچه تمامی این مطالعات مانند مطالعات انجام شده بر روی انتقال درون تاژکی، در زیست شناسی سلولی پایه مطرح می‌باشد این قبیل مطالعات اغلب دریچه‌ای جدید را در مورد پایه اصلی بیماری‌ها باز می‌کند و بدین‌طریق استراتژی‌های مختلف برای درمان این بیماری‌ها کشف می‌شود. رابطه زیست‌شناسی سلولی پایه و پزشکی به‌طور شدیدی هیجان و ارزش اجتماعی تحقیقات در این زمینه را افزایش داده است.

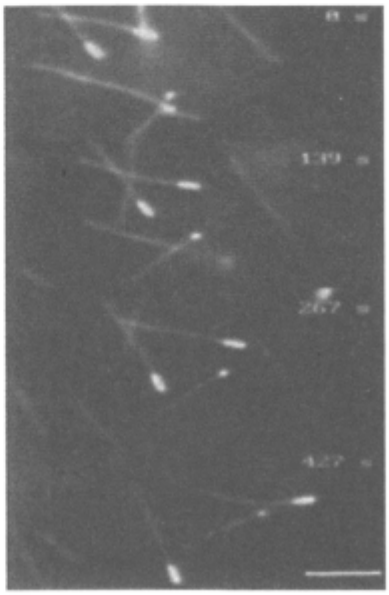
تجزیه و تحلیل داده‌ها

a) کینزین -۱ دارای دو زنجیره سنگین یکسان و بنابراین دو دُمین موتوری یکسان می‌باشد. در مقابل، کینزین -۵ متشکل از چهار زنجیره سنگین یکسان می‌باشد. آنالیز میکروسکوپ الکترونی کینزین‌های سایه‌دهی شده توسط فلز منجر به ایجاد تصاویر نشان داده شده در پانل بالا گردید. تصاویر نشان داده شده در پانل پایین حاصل تیمار اولیه این کینزین‌ها با یک آنتی‌بادی اختصاصی دُمین

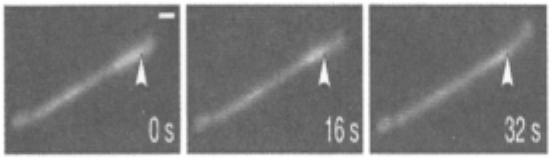


موتوری کینزین می‌باشد. تمامی این چهار تصویر دارای بزرگ‌نمایی تقریباً یکسانی هستند. حال از این تصاویر شما چه نتیجه‌ای در مورد ساختار کینزین -۵ می‌توانید بگیرید؟

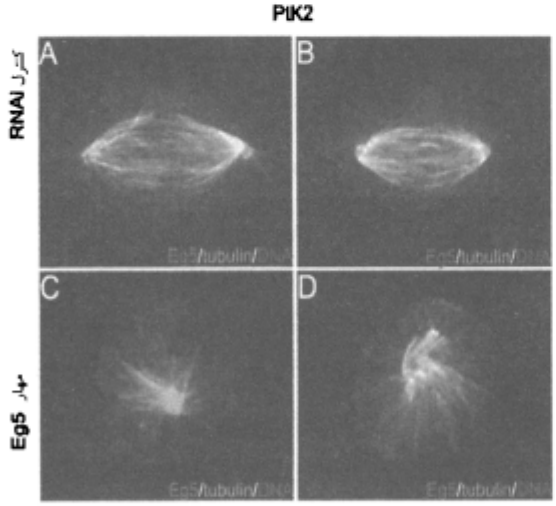
b) به منظور تعیین این‌که آیا کینزین-۵ یک موتور میکروتوبولی انتهای (+) یا (-) می‌باشد، میکروتوبول‌های قطبی از طریق تجمع توبولین‌های فلورسنت‌دار به انتهای میکروتوبول‌های کوتاه تولید شد. در نتیجه، میکروتوبول‌ها در یک انتهای خود دارای فلورسنت زیاد بود ولی و در بیشتر طول خود دارای فلورسنت پایین می‌باشند. سپس یک اتاقک تزریق با کینزین-۵ تخلیص شده پوشیده شد و کینزین‌ها بر روی سطح شیشه تثبیت شدند. در نهایت میکروتوبول‌های نشان‌دار قطبی و ATP به درون این اتاقک تزریق شد و حرکت میکروتوبولی نسبت به کینزین-۵ تثبیت شده مشاهده شد. عکس‌های متوالی و پشت سر هم تهیه شد. کدام انتهای این میکروتوبول‌ها، انتهای (+) است. انتهای درخشان یا انتهای با درخشندگی کمتر؟ آیا این میکروتوبول‌ها توسط انتهای (+) یا انتهای (-) خود بر روی کینزین -۵ سُر می‌خورند؟ بر اساس این داده‌ها، آیا کینزین -۵ یک موتور انتهایی (+) یا (-) میکروتوبول می‌باشد؟



c) کینزین -۵ قادر به برقراری ارتباط عرضی بین میکروتوبول‌های مجاور می‌باشد. میکروتوبول‌های دارای قطبیت بالا ایجاد شدند بطوری که در آن با استفاده توبولین متصل به یک رنگ فلورسانس قرمز میکروتوبول‌های کوتاه قرمز رنگ تولید شد و سپس توبولین‌های متصل به یک رنگ فلورسانس به طول آنها اضافه شد. این میکروتوبول‌ها با کینزین -۵ ترکیب شده و پس از اضافه کردن ATP توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. زمانی که ATP اضافه شد، تصاویر حاصل یک ترتیب زمانی از دو میکروتوبول همپوشان و دارای اتصالات عرضی را نشان داد. فلش در یک موقعیت ثابت قرار دارد. آیا شما می‌توانید توضیح دهید که زمانی که ATP به میکروتوبول‌هایی که توسط کینزین-۵ اتصالات عرضی برقرار کردند، اضافه شد، چه اتفاقی رخ داده است؟



d) Eg5 عضوی از خانواده کینزین -۵ در زنوپوس می‌باشد. به منظور فهم عملکرد Eg5 در حالت *In Vivo* سلول‌ها با RNAi اختصاصی بر علیه این موتور آلوده شدند. تصاویر زیر از سلول‌های میتوزی گرفته شده است. نقش Eg5 در درون سلول‌ها چیست؟



فصل ۱۹

یکپارچگی سلول‌ها در بافت‌ها

(شکل رنگی) برشی از یک دسموزوم در اپیدرمیس موش تازه متولد شده. میکروسکوپ الکترونی برای حصول تصویری از اتصالات سلولی بنام دسموزوم استفاده شده است. دسموزوم‌ها باعث اتصال سلول‌های پوست به هم می‌شوند. مولکول‌های چسبانندهٔ سلولی که کادهرین نامیده می‌شوند به رنگ آبی هستند. دو غشای سلولی مجاور قرمز هستند و در فضای بین آنها، مولکول‌های خارج سلولی، فیلامنت‌های حد واسط و پلاکهای سیتوپلاسمی وجود دارد که به ترتیب سبز روشن و نارنجی هستند.

رئوس مطالب

۱۹.۱ چسبندگی سلول ـ سلول، سلول ـ ماتریکس و مرور کلی

۱۹.۲ اتصالات سلول ـ سلول و سلول ـ ECM و مولکول‌های چسبندگی

۱۹.۳ ماتریکس خارج سلولی I: لامین پایه

۱۹.۴ ماتریکس خارج سلولی II: بافت پیوندی و سایر بافت‌ها

۱۹.۵ برهمکنشهای چسبندگی بین سلول‌های متحرک و غیرمتحرک

۱۹.۶ بافت‌های گیاهی

طی تکوین جانداران پیچیده چند سلولی از قبیل گیاهان و جانوران، سلول‌های پیش ساز به صورت «انواع» متفاوتی تمایز می‌یابند که دارای موقعیت‌ها، ساختار ها و فعالیت‌های بخصوصی هستند. یک نوع سلول‌های خاص اغلب به صورت یک بافت کنار هم گرد آمده تا بتوانند یک فعالیت مشترک را در کنار هم و با کمک هم انجام دهند؛ انقباضات عضلانی و بافت‌های عصبی ایمپالس‌های الکتریکی را هدایت می‌کنند و بافت گزیلم در گیاهان، آب را منتقل می‌کند. بافت‌های مختلف می‌توانند به صورت یک اندام سازماندهی شده تا بتوانند یک یا چند عملکرد ویژه را انجام دهند. به عنوان مثال، ماهیچه‌ها، دریچه ها و رگ‌های خونی قلب، با همکاری هم، خون را پمپ می‌کنند. همکاری انواع سلول ها و بافت‌های متفاوت به موجود این امکان را می‌دهد که حرکت کند، مواد را متابولیزه کند، تولیدمثل نماید و فعالیت‌های ضروری خود را انجام دهد.

حتی در حیوانات ساده هم سازمان‌دهی بافتی پیچیده نیز مشاهده می‌شود. شکل بالغ کرم حلقوی کانورابدیتیس تنها دارای ۹۵۹ سلول است که این سلول ها در ۱۲ گونه کلی متفاوت و تعداد زیادی زیرگونه مجزا تقسیم‌بندی می‌شوند. مهره داران دارای صدها نوع مختلف سلولی هستند که شامل لکوسیت ها (سلول‌های خونی سفید) و اریتروسیت ها (سلول‌های قرمز خون)، گیرنده‌های نوری در شبکیه؛ سلول‌های چربی که چربی را ذخیره می‌کنند؛ فیبروبلاست ها در بافت پیوندی و صدها زیرگونه متفاوت از نورون ها در مغز انسان است. علیرغم وجود این تفاوت ها در شکل و عملکرد، تمام سلول‌های حیوانات را می‌توان تنها در پنج کلاس اصلی دسته‌بندی نمود: بافت اپی‌تلیال، بافت پیوندی، بافت ماهیچه‌ای، بافت عصبی و خون.

انواع متفاوت سلول‌ها طبق الگوهای دقیق و پیچیده آرایش می‌یابند تا بافت ها و اندام‌های بدن ایجاد گردند. بهای چنین پیچیدگی در افزایش نیاز به اطلاعات، مواد، انرژی و زمانی است که در طی آن موجود تکوین یافته و به یک موجود زنده منحصر به فرد تبدیل می‌گردد. اگرچه بهای فیزیولوژیکی بدست آوردن بافت ها و اندام‌های پیچیده بالاست، اما در عوض به موجود زنده این توانایی را می‌دهد که با تغییرات و محیط‌های مختلف سازگار شود، که این امر یک مزیت تکاملی مهم محسوب می‌شود.

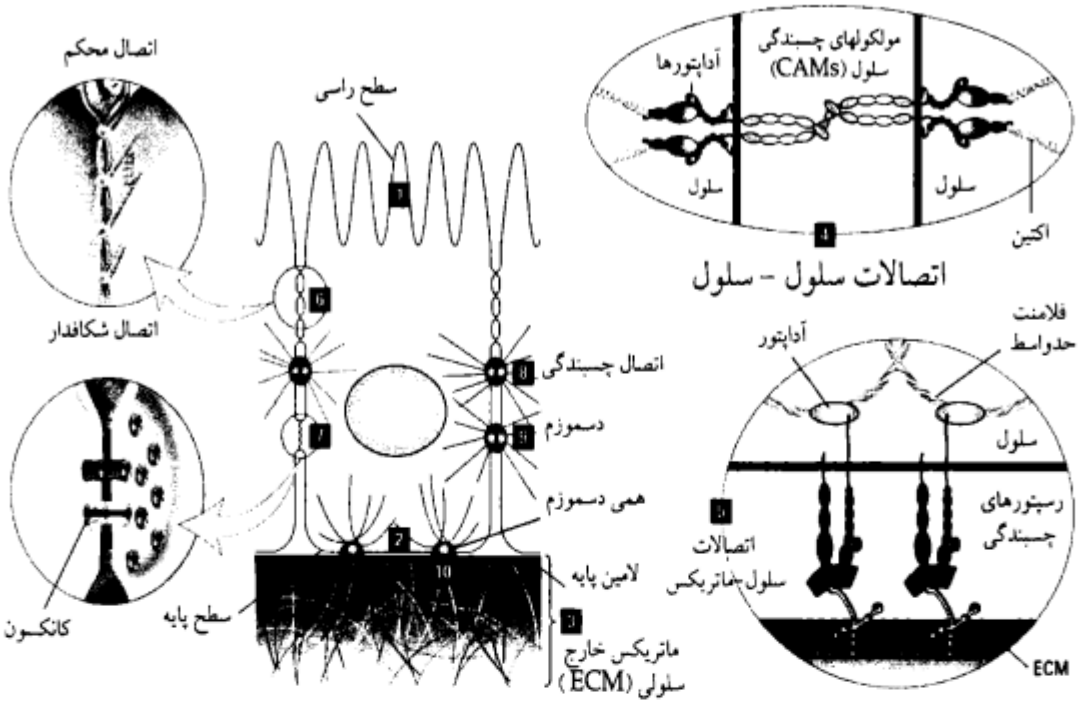
ریخت‌شناسی پیچیده و متنوع گیاهان و جانوران مثال‌هایی کلی است که بزرگتر از مجموعه قسمت‌های مجزاست که در یک نگاه دقیق‌تر به عنوان ویژگی‌های ضروری یک سیستم پیچیده بیان می‌شوند. به عنوان مثال، ویژگی‌های مکانیکی مجزای استخوان‌های محکم، مفاصل انعطاف‌پذیر و ماهیچه‌های منقبض شونده به مهره‌داران امکان حرکت هماهنگ را داده و سبب حفظ اندازه بدن می‌شوند. یکی از ویژگی‌های مشخص حیوانات دارای بافت‌ها و اندام‌های پیچیده (متازون‌ها)[1] از جمله خودمان، اینست که سطوح داخلی وخارجی اکثر بافت‌ها و اندام‌ها و در واقع سطح خارجی کل موجود زنده، از یک لایه‌های ورقه مانند سلول‌هایی که به طور محکم به هم فشرده شده‌اند و اپی‌تلیا نام دارند، مفروش شده است. تشکیل یک اپی‌تلیوم و تبدیلات بعدی آن به مجموعه‌های پیچیده‌تر بافت‌های اپی‌تلیالی و غیراپیتلیالی، نصفی از فرایند تکوین متازون‌هاست. ورقه‌های متشکل از سلول‌های اپیتلیالی که به طور محکم به هم متصل شده‌اند، به عنوان یک سد قابل تنظیم با قدرت نفوذ انتخابی عمل می‌کند که امکان تولید بخش‌هایی را می‌دهد که از لحاظ فیزیکی و شیمیایی در یک موجود زنده از هم جدا شده‌اند (مثل معده و گردش خون). در نتیجه عملکردهای مجزا و گاهی متقابل (مثل هضم و سنتز) می‌تواند به صورت کارآمد در یک موجود زنده به طور همزمان با هم صورت گیرند. چنین **تفکیک منطقه‌ای**[2] همچنین سبب تنظیم دقیق‌تر عملکردهای متنوع بیولوژیکی خواهد شد. در اکثر موارد، نقش‌های بافت‌ها و اندام‌های پیچیده در یک موجود زنده مشابه با اندامک‌ها و غشاهای سلول‌های مجزا از هم می‌باشد.

آرایش بافت‌های مجزا و سازماندهی آن‌ها به صورت اندام‌ها، توسط برهمکنش‌های مولکولی در سطح سلولی مشخص می‌شود و بدون مهار تنظیم شده یک طیف وسیع از آرایش‌های مولکول‌های چسبندگی از لحاظ زمانی و مکانی، امکان‌پذیر می‌گردد. سلول‌های موجود در یک بافت می‌توانند به صورت مستقیم با هم اتصال یابند (چسبندگی سلول - سلول) که این امر توسط پروتئین‌های غشایی که **مولکول‌های چسبندگی سلول** (CAMs) نام دارند صورت می‌گیرد که اغلب این دسته جزو تصلات سلولی تخصص یافته قرار می‌گیرد (شکل ۱-۱۹). در مگس میوه دروزوفیلا حداقل ۵۰۰ ژن، ~۴٪ کل ژن‌ها) در چسبندگی سلولی نقش دارند. سلول‌های موجود در بافت‌های حیوانی همچنین به صورت غیرمستقیم به هم اتصال می‌یابند چسبندگی سلول - ماتریکس) که این امر توسط اتصال گیرنده‌های چسبندگی در غشا پلاسمایی به اجزاء احاطه‌کننده **ماتریکس خارج سلولی** (ECM)[3] صورت می‌گیرد که این بخش یک شبکه پیچیده و فشرده از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهایی است که توسط سلول‌ها، به داخل فضاهای بینابینی آنها ترشح می‌شوند. این دو نوع اساسی از برهمکنش‌ها نه تنها به سلول‌ها امکان تجمع و تشکیل بافت‌های مجزا را می‌دهند بلکه همچنین وسیله‌ای فراهم می‌کنند که امکان انتقال دو طرفه اطلاعات را بین داخل و خارج سلول‌ها ایجاد می‌کند. این انتقال اطلاعات، برای انجام فرایندهای زیستی از جمله بقاء سلولی، تکثیر، تمایز و مهاجرت بسیار مهم می‌باشد. بنابراین تعجب آور نیست که نقایصی که سبب اختلال برهمکنش‌های چسبندگی می‌شوند و مرتبط با جریان اطلاعات می‌باشند، می‌توانند منجر به ایجاد بیماری‌هایی از جمله یک طیف متنوع وسیعی از بیماری‌های عصبی - عضلانی، اسکلتی و نیز سرطان گردد و یا در ایجاد آن‌ها مشارکت داشته باشند.

در این فصل، به بررسی انواع مختلف مولکول‌های اتصالی و چگونگی برهمکنش آن‌ها می‌پردازیم. از آنجایی که ماهیت مولکول‌های چسبندگی در بافت‌هایی که اپی‌تلیال محکم تشکیل می‌دهند و نحوه توسعه آن‌ها در مراحل بسیار اولیه تکامل به خوبی شناخته شده است، ابتدا روی بافت‌های اپیتلیالی از قبیل جداره‌های دستگاه گوارشی و انواعی که پوست تشکیل می‌دهند متمرکز می‌گردیم. سلول‌های اپی‌تلیال در حالت عادی غیرمتحرک (ثابت) هستند؛ درطی تکامل، التیام زخم‌ها و در حالات پاتولوژیک خاص (مثل سرطان)، سلول‌های اپی‌تلیالی می‌توانند به صورت سلول‌هایی با تحریک بیشتر تغییر کنند. بروز تغییرات در بیان و عملکرد مولکول‌های چسبندگی، نقش کلیدی در این تغییرپذیری ایفا می‌کند که این تغییرات را در فرایندهای بیولوژیک نرمال شامل حرکت سلولی از قبیل خزیدن سلول‌های سفید خونی بر روی جایگاه‌های عفونت نیز اِعمال می‌کنند. بنابراین بحث را با شرح بافت‌های اپی‌تلیومی به همراه شرح چسبندگی در بافت غیر اپیتلیومی در حال توسعه و متحرک ادامه خواهیم داد.

1-Metazoans 2- Compartmentalization

3- Extracellular matrix (ECM)



▲ **شکل ۱-۱۹ مروری بر برهمکنش‌های اتصال سلول - سلول و ماتریکس - سلول.** تصویر شماتیک یک بافت اپی‌تلیال تیپیک، مثل اپیتلیال روده را مشخص می‌کند. سطح راسی (بالایی) این سلول ها با میکروویلی‌های انگشت مانندی پوشیده شده است (❶) که در داخل لومن روده‌ای برجستگی یافته‌اند و سطح پایه (زیرین) (❷) که روی ماتریکس خارج سلولی (ECM) قرار گرفته است. ECM مرتبط با سلول‌های اپی‌تلیال معمولاً به صورت چند لایه متفاوت متصل به هم، سازمان می‌یابد (مثل لامین پایه، فیبرهای اتصال دهنده، بافت پیوندی) که در آن ما کرومولکول‌های بلند ECM به هم و به سلول ها اتصال می‌یابند (❸). مولکول‌های اتصال سلولی (CAMs) به CAMهای موجود روی سایر سلول ها اتصال یافته و اتصالات سلول- سلول (❹) را وساطت کرده و گیرنده‌های چسبندگی به اجزاء متفاوت ECM متصل شده و اتصالات ماتریکس- سلول را وساطت می‌کنند(❺). هر دو نوع مولکول‌های اتصالی سطح سلول اغلب پروتئین‌های اینتگرال غشایی هستند که دومین‌های سیتوزولی‌شان اغلب به چند پروتئین آداپتور داخل سلول اتصال می‌یابد. این آداپتور ها به طور مستقیم یا غیرمستقیم CAM را به اسکلت سلولی (اکتین یا فیلامان‌های حدواسط) و مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی متصل می‌کنند. در نتیجه، اطلاعات می‌توانند توسط CAMs ها و ما کرومولکول‌هایی که به آن ها اتصال یافته‌اند از سطح خارج سلول به سمت محیط داخل سلولی و یا در جهت عکس انتقال یابند. در برخی موارد، یک تجمع پیچیده از CAMs آداپتور ها و پروتئین‌های وابسته، نیز آرایش می‌یابد. تجمعات ویژه CAMs ها یا گیرنده‌های چسبندگی انواع مختلف اتصالات سلولی را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در نگهداری بافت ها در کنار هم و تسهیل برقراری ارتباط میان سلول ها و محیط اطرافشان دارد. اتصالات محکم (❻)، که زیرمیکروویلی را آستر نموده است، مانع از انتشار اکثر مواد از میان فضاهای خارج سلولی میان سلول ها می‌شود. اتصالات شکافدار (❼) امکان حرکت مولکول‌های کوچک و یون ها را توسط کانال‌های کانکسون فراهم کرده و باعث انتقال آن ها میان سیتوزول‌های سلول‌های مجاور می‌شود. سه نوع باقیمانده از اتصالات شامل اتصالات چسبندگی (❽)، دسموزم‌های نقطه‌ای (❾)، و همی دسموزم ها (❿) هستند که سیتوزول یک سلول را به سایر سلول ها یا ECM متصل می‌کنند.

واگرایی تکامل گیاهی و جانوران، قبل از ایجاد موجودات زنده چند سلولی، صورت گرفته است. بنابراین چند سلولی شدن و ابزارهای مولکولی برای آرایش یابی بافت ها و اندام ها باید مستقل از دودمان‌های گیاهان و جانوران انجام شده باشد. پس تعجب آور نیست که گیاهان و جانوران تفاوت‌های زیادی در سازمان‌دهی و تکوین بافت ها با هم داشته باشند. به همین دلیل، ابتدا به شرح سازمان‌دهی بافت ها در حیوانات و جانوران می‌پردازیم و سپس به طور جداگانه به شرح گیاهان خواهیم پرداخت.

۱-۱۹ چسبندگی سلول - سلول و سلول - ماتریکس: مرور کلی

ما بحث را با شرح انواع متفاوت مولکول‌های چسبندگی،

عملکردهای مهم آن‌ها در موجودات زنده و منشاء تکاملی‌شان شروع می‌کنیم. در فصل‌های بعدی، ساختارهای منحصر به فرد و ویژگی‌های اجزاء متفاوت شرکت‌کننده در برهمکنش‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس را بررسی می‌کنیم.

مولکول‌های چسبندگی سلولی به همدیگر و پروتئین‌های داخل سلولی اتصال می‌یابند

تعداد بی شمار CAMs ها را در چهار خانواده مهم دسته‌بندی نموده‌اند: کادهرینها، سوپرفامیلی ایمنوگلوبولین (Ig)، اینتگرین ها و سلکتین‌ها. همانطور که ساختارهای شماتیک شکل ۱۹-۲ نشان داده‌اند، اکثر CAMs ها و سایر مولکول‌های چسبندگی، ترکیبی از دُمین‌های مجزای چند گانه هستند که در بیش از یک نوع پروتئین یافت می‌شوند. برخی از این دُمین‌ها، خصوصیات اتصالی را در پروتئین ایجاد می‌کنند که مشخص‌کننده یک پروتئین ویژه است. سایر پروتئین‌های غشایی که ساختارهایشان در هیچ کدام از کلاس‌های اصلی قرار نمی‌گیرد نیز در چسبندگی سلول - سلول در بافت‌های مختلف شرکت می‌کنند.

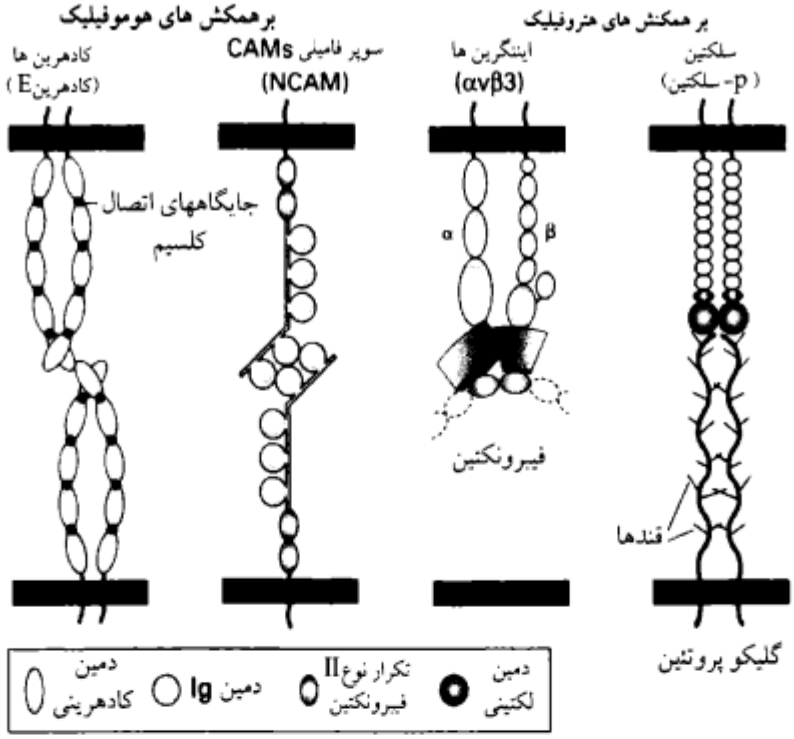
CAMs توسط دُمین‌های خارج سلولی خود، برهمکنش‌های چسبندگی را میان سلول‌هایی از انواع مشابه (چسبندگی هموتیپ) و یا میان سلول‌هایی از انواع متفاوت (چسبندگی هتروتیپ) وساطت می‌کنند. یک CAM موجود بر روی یک سلول می‌تواند مستقیما با نوع مشابهی از CAM روی یک سلول مجاور (اتصال هوموفیلیک) یا با یک کلاس متفاوت CAM (اتصال هتروفیلیک) اتصال برقرار کند. CAMs ها می‌توانند به طور وسیع میان نواحی غشاهای پلاسمایی که به سایر سلول ها متصل شده‌اند یا در قطعات یا نقطه‌های مجزا که **اتصالات سلولی**[1] نامیده می‌شوند گروه‌بندی شوند. اتصالات سلول - سلول می‌تواند محکم و با دوام و یا می‌توانند نسبتاً ضعیف و گذرا باشند. ارتباطات میان سلول‌های عصبی در طناب نخاعی یا سلول‌های متابولیک در کبد دارای اتصالات محکم هستند. برعکس، سلول‌های سیستم ایمنی در خون اغلب فقط دارای برهمکنش‌های ضعیف و کوتاه مدت هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد در امتداد دیواره یک رگ خونی بغلتند و از میان آن عبور کرده و عفونت داخل بافت را از بین ببرند.

دُمین‌های سمت سیتوزلی CAMs دستجاتی از پروتئین‌های آداپتور دارای چندین عملکرد را به کار می‌گیرند (شکل ۱۹-۱). این آداپتور ها به عنوان اتصال دهنده‌هایی عمل می‌کنند که مستقیم یا غیرمستقیم CAMs ها را به عناصر اسکلت سلولی متصل می‌کنند (فصل‌های ۱۷ و ۱۸)؛ همچنین آن‌ها می‌توانند مولکول‌های داخل سلولی را به کار گیرند که در مسیرهای پیام رسانی به منظور کنترل فعالیت پروتئین و بیان ژن (فصل‌های ۱۵ و ۱۶) فعالیت دارند. در اکثر موارد، یک تجمع پیچیده از CAMs ها، پروتئین‌های آداپتور و سایر پروتئین‌های وابسته، در سطح داخلی غشای پلاسمایی آرایش می‌یابند. به دلیل اینکه اتصالات سلول - سلول، به طور ذاتی مرتبط با اسکلت سلولی و مسیر ها پیام‌رسانی هستند، محیط اطراف سلول، روی خصوصیات عملکردی و ظاهری سلول اثر می‌گذارد (اثرات "outside-in")؛ به علاوه، شکل و عملکرد سلولی نیز روی محیط احاطه‌کننده آن اثر می‌گذارد (اثرات "inside-out"). بنابراین اتصال و ارتباط به معنای عام، ویژگی‌های وابسته سلول ها در بافت ها هستند.

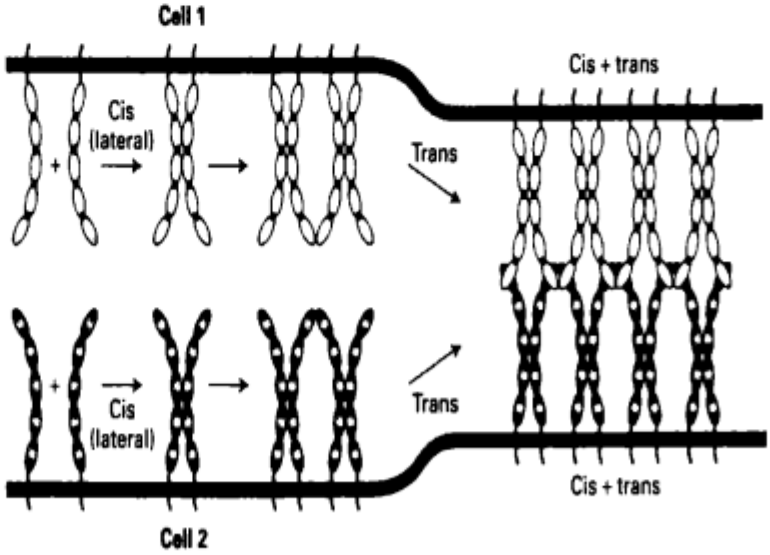
تشکیل اکثر اتصالات سلول - سلول، دو نوع از برهمکنش‌های مولکولی (شکل ۱۹-۳) را در بر می‌گیرد. ابتدا، CAMs های موجود بر روی یک سلول، به طور جانبی توسط دُمین‌های خارج سلولی، دُمین‌های سیتوزولی و یا هر دو آنها به دیمرهای مشابه یا اولیگومرهای منظم‌تر در صفحه غشا پلاسمایی سلول، متصل می‌شوند؛ این برهمکنش‌ها، برهمکنش‌های‌داخل سلولی، جانبی یا سیس نامیده می‌شوند. دوم، اولیگومرهای CAM موجود روی یک سلول به CAMs های مشابه یا متفاوت روی یک سلول مجاور اتصال می‌یابند. این برهمکنش‌ها، برهمکنش‌های بین سلولی یا ترانس نامیده می‌شوند. برهمکنش‌های ترانس گاهی سبب القاء تشکیل برهمکنش‌های سیس اضافی شده و در نتیجه ایجاد برهمکنش‌های ترانس بیشتر می‌شوند.

برهمکنش‌های چسبندگی میان سلول ها به طور قابل توجهی تغییر می‌کند که به CAMs های ویژه شرکت‌کننده و بافت بستگی دارد. اتصالات بسیار محکم گیره مانند، تنها زمانی می‌تواند تشکیل شود که اکثر برهمکنش‌های ضعیف با هم ترکیب شوند و این مورد خصوصا زمانی اتفاق می‌افتد که CAMs ها در نواحی بسیار خوب مشخص شده و کوچک مثل اتصالات سلولی، تغلیظ شوند که سایر مولکول ها نمی‌توانند

1-Cell-junctions



▲ شکل ۲-۱۹ خانواده‌های اصلی مولکول‌های چسبندگی سلول (CAM_S) و گیرنده‌های چسبندگی. دیمرهای E- کادهرین به طور عمومی پل‌های برضی هموفیلیک (خودی) را با E- کادهرین‌های موجود روی سلول های مجاور تشکیل می‌دهند. اعضای سوپرفامیلی ایمونوگلوبولین (Ig) از CAMs ها ی‌تواند هم پیوندهای هموفیلیک (در اینجا نشان داده شده است) و هم اتصالات هتروفیلیک (غیرخودی) تشکیل بدهد. اینتگرین‌های هترودیمر (به عنوان ثال زنجیرهای aV و β_3) به عنوان CAMs ها یا گیرنده‌های چسبندگی (در اینجا نشان داده شده است) عمل می‌کنند که به پروتئین‌های بسیار بلند و پنداتصالی ماتریکس از قبیل فیبرونکتین اتصال می‌یابند که در اینجا تنها بخش کوچکی از آن نشان داده شده است. سلکتین‌ها، که به صورت دیمرهایی شان داده شده‌اند حاوی یک دُمین لکتینی متصل به کربوهیدرات هستند که ساختارهای قندی خاصی را روی گلیکوپروتئین ها (در اینجا نشان داده شده ست) و گلیکولیپیدهای موجود در روی سلول‌های مجاور شناسایی می‌کنند. یادآوری می‌کنیم که CAMs ها اغلب الیگومرهای منظم‌تری را در داخل صفحه غشا پلاسمایی تشکیل می‌دهند. اکثر مولکول‌های چسبندگی دارای دومین‌های چندگانه مجزایی هستند که برخی از آن ها در بیش از یک نوع CAM یافت می‌شود. دُمین‌های سیتوپلاسمی این پروتئین ها غالباً به پروتئین‌های آداپتوری متصل هستند که آن ها را به اسکلت سلولی یا مسیرهای پیام رسانی متصل می‌کنند.



◀ شکل ۳-۱۹ مدلی از تشکیل اتصالات سلول-سلول. برهمکنش‌های جانبی میان مولکول‌های چسبندگی سلول (CAMs) ها در داخل غشای پلاسمایی یک سلول دیمر ها و الگومرهای بلندتری را تشکیل می‌دهد. بخشهایی از این مولکول ها که در برهمکنش‌های سیس شرکت می‌کنند، میان CAMsهای مختلف تفاوت دارند. برهمکنش‌های ترانس بعدی میان دُمین‌های دیستال CAMs ها روی سلول‌های مجاور یک اتصال قوی شبیه گیره[1] میان سلول ها ایجاد می‌نماید.

1- Velcro-like

در آن‌جا قرار گیرند. به این ترتیب، اتصال مولکول‌های داخل سلولی با دُمین‌های سیتوزولی CAMs ها می‌تواند به میزان زیادی روی برهمکنش‌های بین مولکولی CAMs ها اثر گذاشته و این کار را به واسطه امکان برقراری اتصالات سیس آن‌ها (Clustering) یا توسط تغییر ساختمان فضایی آن‌ها انجام می‌دهد. میان این تغییراتی که طبیعت اتصال میان دو سلول را مشخص می‌کند، تمایل اتصال مولکول‌های برهمکنش‌کننده (خصوصیات ترمودینامیکی) که به طور کلی وضعیت‌های «روشن» و «خاموش» اتصال و انفصال برای هر مولکول برهمکنش‌کننده (خصوصیات کینتیکی)، توزیع فضایی یا چگالی مولکول‌های چسبندگی (خصوصیات Ensemble)، وضعیت‌های فعال CAMs در مقابل حالات غیرفعالشان با توجه به اتصال (خصوصیات بیوشیمیایی) و نیروهای خارجی از قبیل انبساط و انقباض در ماهیچه یا جریان لامینار و توبولار سلول ها و مایعات احاطه‌کننده آن ها در سیستم گردش خون (خصوصیات مکانیکی) همواره مورد توجه قرار می‌گیرند.

ماتریکس خارج سلولی در اتصال، پیام رسانی و سایر اعمال شرکت می‌کند

اجزاء ماتریکس خارج سلولی هم به گیرنده‌های چسبندگی خاص از قبیل اینتگرین ها که روی سطح سلول قرار دارند (شکل ۱۹ـ۲) و هم به یکدیگر اتصال می‌یابند. در نتیجهٔ برهمکنش ECM با گیرنده‌های روی سلول‌های مجاور، ECM اتصال غیرمستقیم سلولی را وساطت می‌کند. محتویات ECM شامل پروتئوگلیکان‌ها، یک نوع بخصوص گلیکوپروتئین ها، کلاژن‌ها، پروتئین‌هایی که اغلب فیبر ها را تشکیل می‌دهند، پروتئین‌های محلول چند اتصالی در ماتریکس و سایرین (جدول ۱ـ۱۹) می‌باشد. پروتئین‌های چند اتصالی ماتریکس، مولکول‌های بلند و قابل انعطافی هستند که دارای چندین دُمین می‌باشند که مسئول اتصال به انواع متفاوت کلاژن، سایر پروتئین‌های ماتریکس، پلی ساکاریدها، گیرندهای چسبندگی سطح سلول و مولکول‌های پیام رسانی خارج سلولی هستند. این پروتئین ها برای سازماندهی سایر اجزاء ماتریکس خارج سلولی ضروری هستند. همچنین آنها، اتصال سلول - ماتریکس را تنظیم می‌کنند و بنابراین مهاجرت سلولی و شکل آن را هم تنظیم می‌نمایند. حجم‌های مرتبط سلول ها در مقابل ماتریکس در میان بافت‌های مختلف حیوانی، تغییرات بسیار زیادی دارد. به عنوان مثال، برخی از بافت‌های پیوندی اغلب دارای ماتریکس هستند در حالی که اکثر اندام‌ها، از سلول‌های بسیار فشرده شده‌ای تشکیل یافته‌اند و دارای مقدار بسیار کمی ماتریکس هستند. میزان فشردگی مولکول ها در داخل ECM نیز می‌تواند بسیار متغیر باشد.

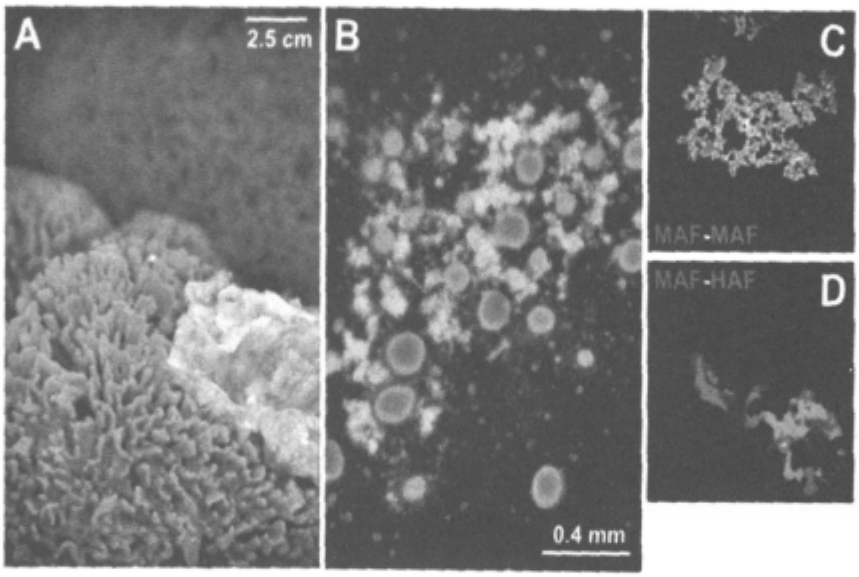
مطالعات کلاسیک ویلسون روی چسبندگی سلول‌های اسفنج دریایی، نهایتاً نشان دهنده این بود که یکی از اعمال اولیه ECM نگهداری دقیق بافت ها در کنار هم است. شکل ۱۹ـ۴a,b که کارهای کلاسیک ویلسون را بازسازی می‌کند نشان می‌دهد زمانی که اسفنج ها از لحاظ مکانیکی به هم متصلند و سلول‌های مخصوص از دو نوع اسفنج با هم ترکیب می‌شوند، سلول‌های یک اسفنج با همدیگر اتصال می‌یابند اما به انواع مربوط به گونه دیگر نمی‌چسبند. این ویژگی، در نتیجه وجود پروتئین‌های چسبندگی متفاوت در ECM است که توسط گیرنده‌های سطح سلول به آن ها اتصال می‌یابند. این پروتئین‌های چسبندگی را می‌توان تخلیص کرد و برای پوشاندن ذرات رنگ شده به کار برد که زمانی که این ها با هم ترکیب شوند، با یک ویژگی سلول‌های اسفنج کامل با هم تجمع می‌کنند (شکل ۱۹ـ۴c,d).

ترکیبات متنوع از اجزاء ECM، ماتریکس خارج سلولی را برای اهداف خاصی سرهم می‌کند: ایجاد استحکام در یک تاندون، دندان، یا استخوان، حالت ارتجاعی در غضروف؛ و چسبندگی در اکثر بافت‌ها. به علاوه ترکیب ماتریکس که بسته به جایگاه آناتومیک و حالت فیزیولوژیک یک بافت تغییر می‌کند، می‌تواند محیطی را فراهم نماید که توسط آن سلول می‌فهمد در کجا قرار دارد و چه کاری باید انجام دهد. تغییر در محتویات ECM که به طور دینامیک و مداوم بازسازی شده، تجزیه شده و دوباره به طور موضعی سنتز می‌گردد، می‌تواند برهمکنش‌های یک سلول را با محیط اطرافش تعدیل کند. ماتریکس همچنین به عنوان یک مخزن برای اکثر مولکول‌های پیام رسانی خارج سلولی عمل می‌کند که رشد و تمایز سلول را کنترل می‌نماید. به علاوه، ماتریکس شبکه‌ای را میان یا روی سلول ها تولید کرده و به آنها خصوصاً در مراحل اولیه آرایش بافت‌ها امکان حرکت می‌دهد. **ریخت زایی**[1] (مرحله تکوین جنینی که در طی آن بافت‌ها، اندام ها و بخش‌های بدن توسط حرکت سلول ها و

1-Morphogenesis

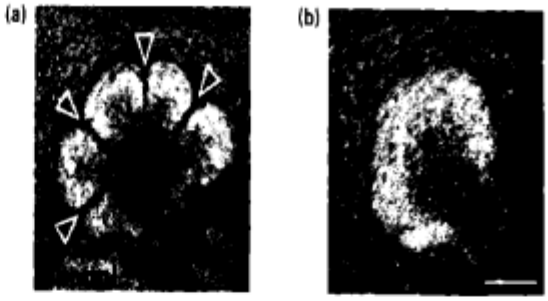
جدول ۱-۱۹ پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی

پروتئوگلیکان ها	پرلکان	
کلاژن ها	تشکیل دهنده ورقه (مثل تیپ IV)	
	کلاژن‌های رشته‌ای (مثل تیپ I و II و III	
پروتئین‌های چنداتصالی ماتریکس	لامینین	
	فیبرونکتین	
	نیدوژن/ انتاکتین	



▲ **شکل تجربی ۴-۱۹ (شکل رنگی) اسفنج‌های دریایی که از لحاظ مکانیکی از هم جدا شده‌اند، توسط چسبندگی سلولی هموتیپ گونه- گونه، دوباره آرایش می‌یابند.** (a) دو اسفنج (نارنجی) و (زرد) رشد می‌کنند. (b) پس از تخریب مکانیکی و مخلوط کردن دو نوع اسفنج سالم با هم، به سلول‌های مجزا امکان برقراری اتصال دوباره در حدود ۳۰- دقیقه با تکان‌های ملایم داده شد. سلول ها با چسبندگی هموتیپ گونه- گونه در کنار هم تجمع یافتند و توده‌های ریز از سلول‌های میکروسیونا پرولیفرآ (نارنجی) و سلول‌های هالیکوندریا پانسیه (زرد) را تشکیل دادند. (c) و (d) دانه‌های نشاندار شده با فلورسنت، زرد یا نارنجی، هستند که با فاکتور تجمع پروتئوگلیکان (AF) از ECM مربوط به میکروسیونا پرولیفرآ (MAF)، هالیکوندریا پانسیه (HAF) پوشیده شده‌اند. طرح c نشان می‌دهد که زمانی که دانه‌های رنگ‌آمیزی شده، تنها با MAF پوشیده شوند، همگی با هم تجمع کرده و تجمعات زرد رنگ (ترکیب نارنجی و سبز) را تشکیل می‌دهند. طرح D نشان می‌دهد که ذرات پوشیده شده با MAF (قرمز) و HAF (سبز) به آسانی تجمعات ترکیب شده را تشکیل نمی‌دهند، اما به صورت توده‌های مجزا که توسط اتصالات هموتیپ در کنار هم نگه داشته شده‌اند قرار می‌گیرند.

بازآرایی‌های آن ها شکل می‌گیرد) نیز وابسته به اتصالات سلول- ماتریکس و نیز اتصالات سلول - سلول است. به عنوان مثال، ریخت زایی شاخه‌ای (تشکیل ساختارهای شاخه‌دار) برای تشکیل کیسه‌های هوایی در ریه‌ها، رگ‌های خونی، غدد پستانی و بزاقی و سایر ساختارها، نیازمند برهمکنش‌های سلول - ماتریکس (شکل ۵-۱۹) می‌باشد. تخریب برهمکنش‌های سلول - ماتریکس و سلول - سلول می‌تواند نتایج مخربی روی توسعه بافت ها داشته باشد که نمونه آن بروز تغییرات بزرگ در سیستم اسکلتی جنین موش در زمانی است که ژن‌های مربوط به یکی از دو ملکول کلیدی ECM یعنی کلاژن II یا پرلیکان غیرفعال



▲**شکل تجربی ۵-۱۹ استفاده از آنتی بادی‌های مربوط به فیبرونکتین، ریخت زایی شاخه‌ای را در بافت‌های موشی در حال توسعه، مهار می‌کنند.** غدد بزاقی نابالغ، از جنین‌های موش جدا شده و به آن ها اجازه دادند که در محیط *In Vitro* برای مدت ۱۰ ساعت در غیاب (a) یا در حضور (b) یک آنتی بادی که به مولکول فیبرونکتین در ECM متصل شده و فعالیت آن را مهار می‌کند قرار گیرند و تحت این شرایط ریخت زایی شاخه‌ای انجام دهند. تیمار با آنتی بادی ضد فیبرونکتین (آنتی-FN)، شکل‌گیری شاخه‌ای را مهار نمود (پیکان‌ها). مهار گیرنده‌های چسبندگی فیبرونکتین (یک اینتگرین) نیز شکل‌گیری شاخه‌ای را مهار نمود (نشان داده نشده است).

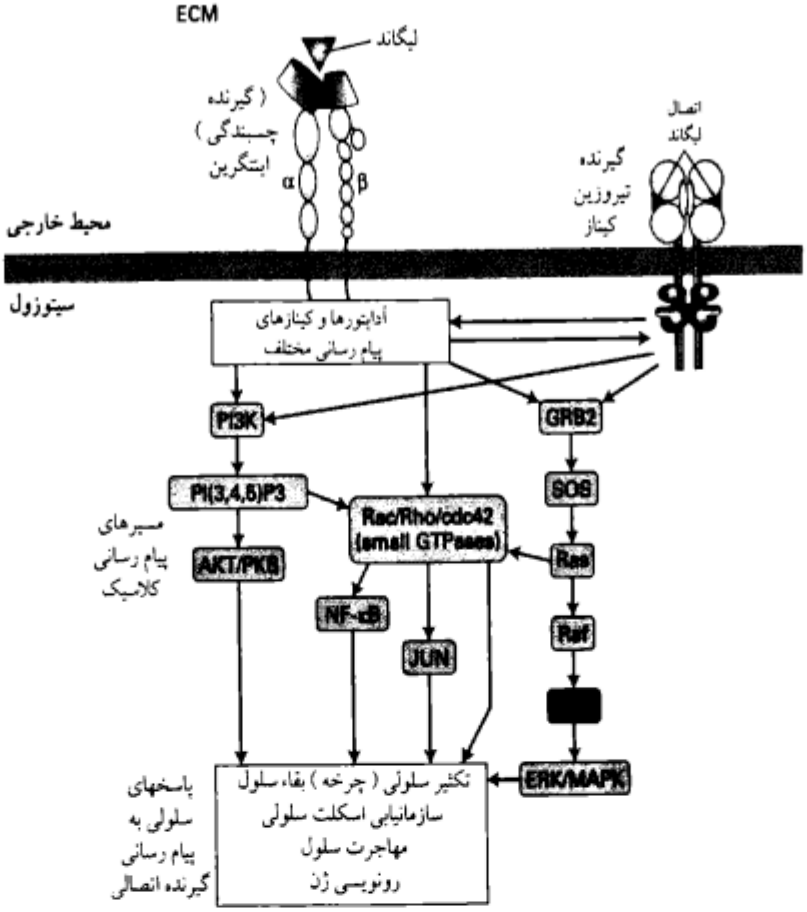
▲ **تصویر تجربی ۶-۱۹ غیرفعال‌سازی ژن‌های مربوط به برخی از پروتئین‌های ECM در توسعه اسکلتی معیوب در موش.** این تصاویر نشان دهنده اسکلت‌بندی نرمال (چپ)، نقص کلاژن II (وسط) یا نقص پرلکان (راست) جنین‌های موش است که جداسازی و تثبیت شده‌اند تا غضروف (آبی) و استخوان (قرمز) را بتوان مشاهده نمود. فقدان این اجزاء کلیدی ECM، منجر به کوتولگی می‌شود که به همراه آن بسیاری از اجزاء اسکلتی کوتاه شده و شکل نادرستی به خود می‌گیرند.

شده‌اند (شکل ۶-۱۹). تخریب اتصالات نیز مشخصه بیماری‌های مختلفی از جمله سرطان متاستازی است که در آن سلول‌های سرطانی، موقعیت‌های اصلی خود را ترک کرده و در نقاط مختلف بدن پخش می‌شوند.

اگرچه اکثر CAMs ها و گیرنده‌های چسبندگی در ابتدا به خاطر ویژگی‌های اتصالی‌شان مشخص شدند، اما آن ها نقش‌های اساسی در پیام رسانی دارند که اکثر مسیرهای شرح داده شده در فصول ۱۵ و ۱۶ را به کار می‌گیرند. شکل ۷-۱۹ نشان می‌دهد که چگونه یک گیرنده چسبندگی (اینتگرین) از لحاظ فیزیکی و عملکردی توسط آداپتور ها و کینازهای پیام رسانی با طیف وسیعی از مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی برهمکنش کرده که این مسیر ها شامل آنهایی هستند که توسط گیرنده تیروزین کینازی راه اندازی می‌شوند تا روی بقاء سلولی، رونویسی ژن، سازمانیابی اسکلت سلولی، تحرک سلولی و تمایز سلول اثر بگذارد. برعکس، بروز تغییرات در فعالیت‌های مسیرهای پیام رسانی در داخل سلول می‌تواند ساختارهای CAMs و گیرنده‌های آداپتور را تحت تأثیر قرار داده و بنابراین توانایی آنها را برای برهمکنش با سایر سلول ها و ECM تنظیم می‌کنند.

تکامل مولکول‌های چسبندگی چندشکلی، سبب تکامل بافت‌های متنوع جانوری شده است

اتصالات سلول - سلول و ماتریکس - سلول، مسئول تشکیل، موقعیت‌دهی، معماری و عملکرد بافت‌های حیوانی هستند. تعجب آور نیست که برخی از مولکول‌های اتصالی از لحاظ تکاملی به صورت باستانی هستند و جزو پروتئین‌های بسیار حفظ شده در موجودات زنده چند سلولی به حساب می‌آیند. اسفنج‌ها، ابتدایی‌ترین موجودات زنده چند سلولی، CAMs ها و مولکول‌های چند اتصالی ECM خاصی را بیان می‌کنند که ساختمانشان شباهت زیادی با آنهایی دارد که در پروتئین‌های انسانی یافت می‌شوند. تکامل موجودات زنده دارای بافت ها و اندام‌های پیچیده (متازون‌ها) بسته به تکامل واگرای مولکول‌های چسبندگی دارای خصوصیات و عملکردهای برجسته بوده که سطح بیان آن ها در انواع مختلف سلولی، تغییر می‌کند. برخی از CAMs ها (مثل کادهرین‌ها)، گیرنده‌های چسبندگی (مثل اینتگرین ها و سوپر فامیلی ایمونوگلوبین از CAMs ها) و اجزاء ECM (تیپ IV کلاژن، لامینین، نیدوژن/ انتاکتین و پروتئوگلیکان‌های شبه پرلکان) حفظ شدگی بسیار بالایی دارند، در حالی که سایرین اینطور نیستند. به عنوان مثال، مگس‌های سرکه، فاقد انواع ویژهٔ کلاژن یا پروتئین ECM فیبرونکتین هستند که نقش حیاتی در پستانداران ایفا می‌کنند. یک ترکیب مشترک از پروتئین‌های چسبندگی در دُمین‌های تشکیل دهنده



▲ **شکل ۷-۱۹ مسیرهای پیام رسانی با واسطه گیرنده چسبندگی اینتگرین که اعمال متنوع سلولی را کنترل می‌کند.** اتصال اینتگرین ها به لیگاندهایشان، تغییرات ساختمان فضایی را در دُمین‌های سیتوپلاسمی آنها القاء کرده و برهمکنش‌های آن ها را با پروتئین‌های سیتوپلاسمی تغییر می‌دهد. این ها دارای کینازهای پیام رسانی (کینازهای خانواده- Src، کینازهای چسبندگی focal [FAK]، کینازهای متصل به اینتگرین [ILK]) و پروتئین‌های آداپتور (مثل تالین، پاکسیلین، وینکولین) است که پیام ها را توسط مسیرهای پیام رسانی مختلف انتقال می‌دهند. به این ترتیب تکثیر سلولی، بقاء سلول، سازمان‌یابی اسکلت سلولی، مهاجرت سلولی و رونویسی ژنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اکثر محتویات مسیرهایی که در اینجا نشان داده شده‌اند، با سایر مسیرهای پیام‌رسانی فعال‌کننده سطح سلولی که در فصول ۱۵ و ۱۶ بحث شده‌اند، مشترک هستند.

پروتئین‌های بسیار بلند، تکرار می‌شود. طول کلی این مولکول‌ها با توانایی آن ها برای اتصال تعداد بیشماری لیگاند توسط دُمین‌های عملکردی مجزا، ارتباط عمیقی دارد که احتمالاً نقشی در تکامل آن ها داشته است.

تنوع مولکول‌های چسبندگی از قسمت‌های بزرگ دو پدیده ناشی می‌شود که می‌تواند تعداد بیشماری از پروتئین‌های با وابستگی شدید را ایجاد بنماید که این پروتئین ها **ایزوفرم‌ها**[1] نام دارند و یک خانواده پروتئینی تشکیل می‌دهند. در برخی موارد، اعضای متفاوت یک خانواده پروتئینی توسط چندین ژن کد می‌شوند که توسط همانندسازی ژنی و تکامل واگرا ازیک ژن مشترک اجدادی ایجاد شده‌اند (فصل ۶). در برخی موارد، یک ژن منفرد یک رونوشت RNA تولید می‌کند که می‌تواند تحت پردازش‌های متناوب، mRNAهای چندگانه تولید کند که هر کدام یک ایزوفرم پروتئینی مجزا را کد می‌نمایند (فصل ۸). هر دو پدیده در ایجاد تنوع برخی از خانواده‌های پروتئینی از جمله کادهرین ها مشارکت می‌کنند. ایزوفرم‌های ویژه یک پروتئین اتصالی، اغلب در برخی انواع سلول ها و بافت‌ها و نه سایرین، بیان می‌گردد.

نکات کلیدی بخش ۱-۱۹

چسبندگی سلول - سلول و سلول - ماتریکس: مرور کلی

■ برهمکنش‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس خارج سلولی (ECM) برای همایش سلول‌ها و تبدیل آنها به

1-Isoforms

بافت‌هاضروری بوده، شکل و عملکرد سلول را تعیین کرده و سرنوشت تکوین سلول‌ها و بافت‌ها را تعیین می‌کند. در اثر کارکرد بد در این ساختارها یا بیان مولکول‌های چسبندگی، بیماریهای زیادی حاصل می‌شود.

■ مولکول‌های چسبانندهٔ سلول (CAMs) اتصالات مستقیم سلول - سلول (هموتیپیک و هتروتیپیک) را تنظیم می‌کند. همچنین گیرنده‌های چسبانندهٔ سطح سلول ماتریکس سلول را تنظیم می‌کند (شکل ۱-۱۹ را ملاحظه کنید). این برهمکنش‌ها در بافت‌ها به سلول‌ها متصل شده و ارتباط بین سلول‌ها و محیط اطراف آنها را تسهیل می‌کند.

■ دُمینهای سیتوزولی CAMها و گیرنده‌های چسبندگی به پروتئین‌های آداپتور متصل می‌شوند که برهمکنش آنها با فیبرهای اسکلت سلولی و پروتئین‌های پیام‌رسان داخل سلولی را تنظیم می‌کند.

■ خانوادهٔ بزرگ مولکول‌های چسبندگی سطح سلول شامل کادهرین‌ها، سلکتین‌ها، سوپر فامیلی Ig مربوط به CAMs و اینتگرین‌ها می‌باشند (شکل ۲-۱۹ را ملاحظه کنید).

■ اتصالات محکم سلول - سلول به دو صورت الیگومریزاسیون سیس CAMs (جانبی یا داخل سلولی) و برهمکنش ترانس (داخل سلولی) شبیه (هموفیلیک) یا متفاوت (هتروفیلیک) CAMs می‌باشد (شکل ۳-۱۹ را ملاحظه کنید). ترکیب برهمکنش‌های سیس و ترانس در بین سلول‌ها، یک نوع چسبندگی شبیه گیرهٔ پلاستیکی تولید می‌کند.

■ ماتریکس خارج سلولی (ECM) کمپلکسی متشکل از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهاست که در ساختار و عملکرد بافت‌ها مشارکت می‌کند. خانواده‌های مهم مولکول‌های ECM شامل پروتئوگلیکانها، کلاژن‌ها و پروتئین‌های ماتریکس (فیبرونکتین، لامینین) هستند.

■ تکامل مولکول‌های چسبندگی با ساختارها و اعمال ویژه، به سلول‌ها اجازه همایش به انواع بافت‌ها با عملکردهای متنوع را می‌دهد.

۱۹-۲ اتصالات سلول- سلول و سلول - ECM و مولکول‌های چسبندگی

سلول‌های موجود در بافت‌های اپی‌تلیومی و غیر اپی‌تلیومی، کثر مولکول‌های چسبندگی سلول - سلول و سلول - ماتریکس مشابه و نه همه آن‌ها را به کار می‌گیرند. به دلیل سازمان‌دهی نسبتاً سادهٔ اپی‌تلیوم و نقش اساسی آن‌ها در تکامل و تکوین، ما بحث خود را با شرح جزئیات اتصال در اپی‌تلیوم شروع می‌کنیم.

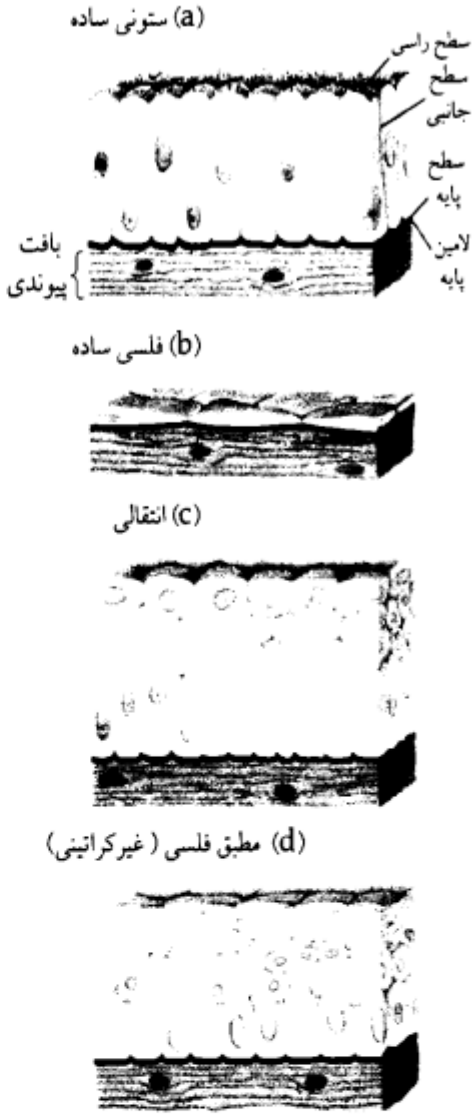
سلول‌های اپی‌تلیالی دارای سطح مجزای رأسی، جانبی و پایه‌ای هستند

سلول‌های تشکیل دهنده بافت‌های اپی‌تلیومی، سلول‌های **قطبی**[1] خوانده می‌شوند، زیرا غشای پلاسمایی آن‌ها دست کم دارای دو ناحیه مجزا از هم می‌باشد. به طور معمول، سطوح مجزای یک سلول اپیتلیالی قطبی، سطوح **راسی**[2] (بالایی)، **جانبی**[3](کناری) و **پایه‌ای**[4] (پایه یا زیرین) نامیده می‌شوند (شکل ۸-۱۹). ناحیه سطح راسی، اغلب به واسطه تشکیل میکرویلی گسترش بیشتری می‌یابد. مولکول‌های چسبندگی نقش‌های اساسی در تشکیل و نگهداری این ساختارها ایفا می‌کنند.

اپی‌تلیوم در نقاط مختلف بدن دارای اعمال و شکل‌های مشخصی است (شکل ۸-۱۹). **اپی‌تلیای مطبق**[5] (چند لایه‌ای) غالباً به عنوان سدها و سطوح حفاظتی به کار گرفته می‌شوند (مثل پوست)، در حالی که اپی‌تلیای ساده (مثل تک لایه) اغلب به طور انتخابی یون‌ها و مولکول‌های کوچک را از یک سمت لایه به سمت دیگر منتقل می‌کنند. به عنوان مثال، اپی‌تلیوم ستونی ساده که سطح معده را آستر کرده است اسید کلریک را به داخل لومن ترشح می‌کند؛ یک اپی‌تلیوم ساده مفروش‌کننده روده کوچک، فرآورده‌های حاصل از هضم را در لومن روده از سطح بازولترال (پایه ای - کناری) به داخل خون انتقال می‌دهد (شکل ۱۹-۱۱).

در اپی‌تلیای ستونی ساده، برهمکنش‌های چسبندگی میان سطوح جانبی، سلول‌ها را با هم به صورت یک ورقه دو بعدی نگهداری می‌کند، در حالی که آنهایی که در سطح پایه‌ای قرار دارند سلول‌ها را به صورت یک ماتریکس خارج - سلولی اختصاصی که در زیر قرار گرفته و **لامین پایه** نامیده می‌شود، به هم متصل می‌کنند. معمولاً سطوح پایه‌ای و جانبی از نظر ترکیب بهم شبیه بوده و با هم سطح **بازولترال** نام دارند. سطوح بازولترال اکثر اپی‌تلیوم‌های ساده، معمولاً روی سطح سلول و در مجاورت رگ‌های خونی قرار دارند، در حالی که سطح راسی به طور مستقیم با سایر سلول‌ها یا ECM در تماس نیست. در جانوران دارای سیستم گردش خون بسته، خون توسط رگ‌هایی که آستر داخلی‌شان متشکل

1- Polarized
2-Apical
3-Lateral
4-Basal
5- Stratified epithelia



▲ **شکل ۸ـ۱۹ انواع اصلی اپی‌تلیا.** سطوح رأسی و بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال خصوصیات متفاوتی دارند. (a) اپی‌تلیای ستونی ساده حاوی سلول‌های طویل شده‌ای است که شامل سلول‌های ترشح‌کننده موکوس (در آستر دستگاه معدی و سرویکس) و سلول‌های جذب‌کننده (آستر روده کوچک) می‌باشد. (b) اپی‌تلیای فلسی ساده، حاوی سلول‌های باریکی است که دیواره رگ‌های خونی (سلول اندوتلیال/ اندوتلیوم) و اکثر حفرات بدن را پوشانده است. (c) اپی‌تلیای انتقالی حاوی چندین لایه از سلول‌های با اشکال مختلف است که حفرات خاصی از بدن را به منظور ایجاد انبساط و انقباض آستر نموده است (مثل مثانه). (d) اپی‌تلیای فلسی مطبق (کراتینه نشده) سطح دهان و واژن را می‌پوشاند ؛ این آستر ها در مقابل جذب ممانعت کرده و عموماً در جذب یا ترشح مواد به داخل و بدرون حفره شرکت نمی‌کنند. لامین پایه، یک شبکه رشته‌ای باریک از کلاژن و سایر محتویات ECM به همراه تمامی اپی‌تلیا ها دیده می‌شود و آن ها را به بافت پیوندی زیرشان اتصال می‌دهد.

از سلول‌های اپی‌تلیای **پهن**[1] است سلول‌های اندوتلیال نامیده می‌شوند جریان می‌یابد. سمت رأسی سلول‌های اندوتلیالی که در مجاورت خون قرار دارد، معمولاً سطح **لومنی**[2] نام دارد و سمت پایه‌ای مقابل آن، **سطح آبلومینال**[3] خوانده می‌شود.

به طور کلی، سلول‌های اپی‌تلیا، سلول‌هایی ثابت و غیرمتحرک هستند که در آنها، مولکول‌های چسبندگی به طور محکم و ثابتی، آن ها را به همدیگر و به ECM مرتبط به آنها، می‌چسبانند. یکی از مکانیسم‌های مهمی که برای برقراری اتصالات قوی و پایدار به کار گرفته می‌شود، تغلیظ دستجات این مولکول ها به صورت توده‌هایی است که اتصالات نامیده می‌شوند.

سه نوع از اتصالات، اکثر برهمکنش‌های سلول - سلول و سلول - ECM را وساطت می‌کنند

تمامی سلول‌های اپی‌تلیال موجود در یک صفحه، توسط اتصالات تخصص یافته به همدیگر و به ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شوند. اگرچه صد ها برهمکنش با وساطت مولکول‌های چسبندگی اختصاصی، برای برقراری چسبندگی کافی هستند اما اتصالات نیز نقش‌های مهمی در ایجاد قدرت و استحکام یک بافت، انتقال اطلاعات میان فضای خارج سلولی و داخل سلولی، کنترل عبور یون ها و مولکول ها از عرض لایه‌های سلولی و هدایت انتقال یون ها و مولکول ها از سیتوپلاسم یک سلول به سلول همسایه غیرمستقیم آن، دارند. نکته مهم در مورد صفحات اپی‌تلیالی، تشکیل اتصالاتی است که به ایجاد اتصال محکم میان سلول ها کمک نموده و به این صفحات اجازه می‌دهند که به عنوان سدی در مقابل جریان مولکول ها از یک طرف به سمت دیگر صفحه ممانعت کنند.

سه کلاس اصلی از اتصالات سلولی حیوانی، ترکیبات اصلی اپی‌تلیالی ستونی ساده می‌باشند (شکل ۹ـ۱۹ و جدول ۲ـ۱۹). **اتصالات لنگری**[4] و **اتصالات محکم**[5]، سبب نگهداری بافت ها در کنار هم می‌شوند. این اتصالات به سه قسمت سازمان می‌یابند: (۱) پروتئین‌های اتصالی در غشای پلاسمایی که یک سلول را به سلول دیگر روی سطوح جانبی (AMS) و یا به

1- Flattened
2-Luminal
3- Abluminal
4-Anchoring juctions
5-Tight junctions

ماتریکس خارج سلولی روی سطوح پایه (گیرنده‌های اتصالی) متصل می‌کنند؛ (۲) پروتئین‌های آداپتور که CAMs یا گیرنده‌های اتصالی را به فیلامان‌های اسکلت سلولی و مولکول‌های پیام رسانی متصل می‌کند و (۳) فیلامان‌های اسکلت سلولی را به خودشان متصل می‌کنند. اتصالات محکم، همچنین جریان مواد محلول را از فضاهای خارج سلولی میان سلول ها و تشکیل یک صفحه اپی‌تلیالی را کنترل می‌کنند. اتصالات محکم ابتدا در سلول‌های اپی‌تلیالی یافت شدند که در آنجا اتصالات لنگری هم در سلول‌های اپی‌تلیال و هم در سلول‌های غیر اپی‌تلیالی دیده می‌شوند. سومین کلاس اتصالات، **اتصالات شکافدار**[1] هستند که سبب انتشار سریع مولکول‌های کوچک محلول در آب میان سیتوپلاسم سلول‌های مجاور هم می‌شوند. شباهت این اتصالات با اتصالات لنگری و محکم در اینست که هر سه با هم سبب می‌شوند تا سلول بتواند با محیط اطراف خود ارتباط برقرار کند، اما از لحاظ ساختاری تفاوت‌های زیادی با اتصالات لنگری و محکم داشته و نقش آن ها در تحکیم کردن چسبندگی‌های سلول - سلول و سلول - ECM، کلیدی نمی‌باشد. اتصالات شکافدار که هم در سلول‌های اپی‌تلیومی و هم در سلول‌های غیر اپی‌تلیومی یافت می‌شوند مشابه اتصالات سلول - سلول در گیاهان هستند که پلاسمودسماتا نام دارند و در بخش ۱۹.۶ در موردشان صحبت خواهیم کرد.

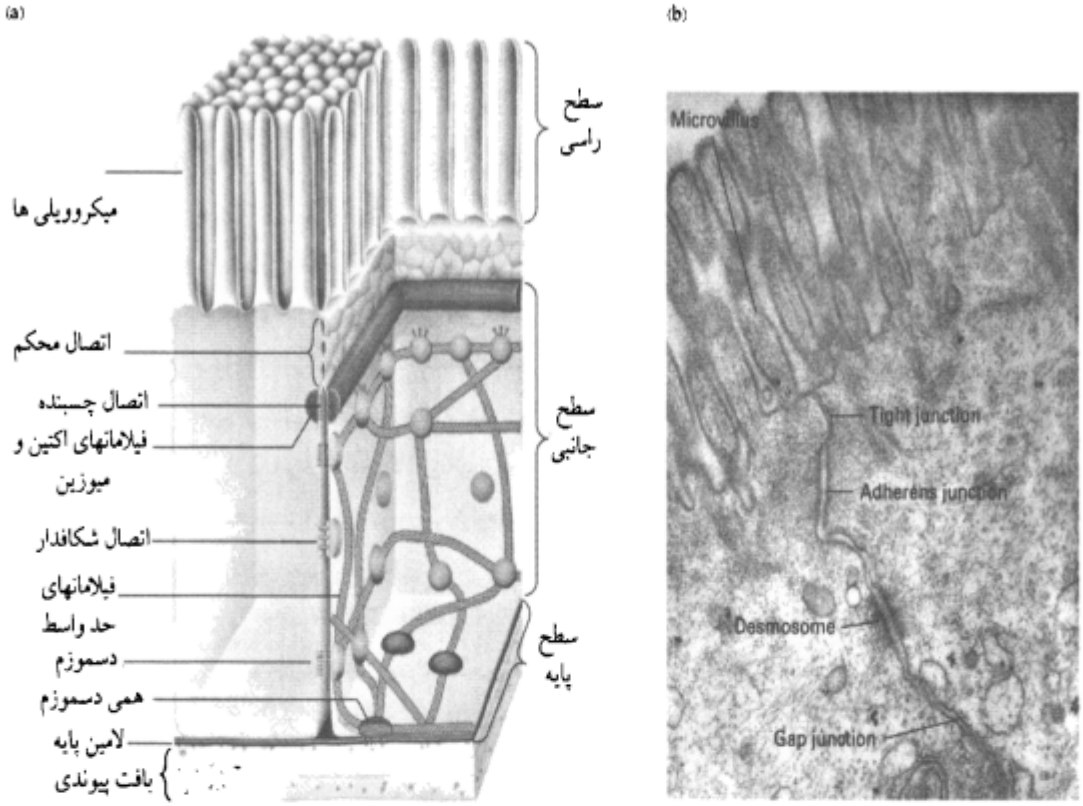
سه نوع اتصالات لنگری در سلول ها وجود دارند. دو تا از آن ها در اتصالات سلول - سلول مشارکت دارند، در حالی که نوع سوم در اتصالات سلول - ماتریکس شرکت می‌کند. **اتصالات آدهرنس**،[2] غشاهای جانبی سلول‌های اپی‌تلیال مجاور را به هم متصل کرده و معمولاً در مجاورت سطح رأسی، اندکی زیر اتصالات محکم قرار می‌گیرد (شکل ۱۹.۹). یک کمربند دایره‌ای از فیلامنت‌های اکتین و میوزین در یک کمپلکس حاوی اتصالات ادهرنس، به عنوان یک کمربند اتصالی عمل می‌کند که می‌تواند از سلول در مقابل فشار حفاظت کند و بنابراین به کنترل شکل آن کمک می‌کند. سلول‌های اپی‌تلیال و برخی از انواع سلول ها از قبیل سلول‌های ماهیچه صاف و سلول‌های قلبی نیز توسط **دسموزوم‌ها**[3] به طور محکمی در کنار هم قرار گرفته‌اند که نقاط دکمه مانندی هستند که گاهی دسموزوم نقطه‌ای خوانده می‌شوند. **همی دسموزم‌ها**[4] که اساساً روی سطح پایه‌ای سلول‌های اپی‌تلیال یافت می‌شوند، سبب لنگرانداری اپی‌تلیوم روی اجزاء ماتریکس خارج سلولی زیرینش شده که بسیار شبیه به میخ‌هایی هستند که در زیر یک فرش قرار گرفته‌اند. دستجات فیلامان‌های حدواسط که به موازات سطح سلول قرار گرفته‌اند یا میان دسموزوم ها و همی دسموزم‌های بینابین سلول‌ها واقع شده‌اند، سبب حفظ شکل و استحکام سلول می‌گردند. اتصالات ادهرنس و دسموزوم ها در اکثر انواع مختلف سلول ها یافت شده‌اند؛ به نظر می‌رسد که همی دسموزوم‌ها، محدود به سلول‌های اپی‌تلیال هستند.

دسموزوم ها و همی دسموزوم ها سبب می‌شوند که نیروها به طور کامل از یک ناحیه یک لایه سلولی به اپی‌تلیوم انتقال یابند به صورتی که استحکام و قدرت کل لایه سلولی اپی‌تلیال حفظ گردد. این دو، خصوصاً در حفظ تمامیت اپی‌تلیال پوست، بسیار مهم هستند. به عنوان مثال جهش‌هایی که سبب نقص لنگراندازی همی دسموزمی در پوست می‌شوند می‌توانند منجر به بروز تاول‌هایی شوند که در آن اپی‌تلیوم از ماتریکس خود جدا شده، مایع خارج سلولی در سطح بازولترال تجمع یافته و سبب می‌شود که به پوست فشار آورده و آن را به صورت بالونی به سمت خارج برآمده کند.

کادهرین ها اتصالات سلول - سلول را در اتصالات آدهرنس و دسموزوم ها وساطت می‌کنند

عمده‌ترین CAMs های موجود در اتصالات آدهرنس و دسموزم‌ها، مربوط به خانواده **کادهرین**[5] هستند. در مهره داران، این خانواده پروتئینی با بیش از ۱۰۰ عضو را می‌توان دست کم در شش زیر خانواده تقسیم نمود که شامل کادهرین‌های کلاسیک و کادهرین‌های دسموزمی‌اند که ما در زیر به شرح آن ها و پروتوکادهرین ها و سایرین خواهیم پرداخت. تنوع کادهرین ها به علت وجود ژن‌های کادهرینی چندگانه و پردازش‌های متناوب RNA ایجاد می‌گردد. تعجب آور نیست که در مهره داران انواع بسیار متفاوتی از کادهرین ها یافت می‌شود، زیرا اکثر انواع مختلف سلول ها در بافت‌های مختلف، از این CAMs ها برای وساطت اتصال و برقراری ارتباط استفاده می‌کنند. مغز، بیشترین تعداد از کادهرین‌های مختلف را بیان می‌کند که احتمالاً به علت لزوم تشکیل تعداد زیادی از اتصالات سلول - سلول بسیار اختصاصی به منظور

1-Gap junctions
2-Adherens junction
3-Desmasomes
4-Hemidesmosomes
5-Cadherin



▲ **شکل ۹-۱۹ انواع اصلی اتصالات سلولی، سلول‌های اپی‌تلیال ستونی را که روده کوچک را آستر نموده‌اند، بهم متصل می‌نمایند.** (a) طرح شماتیک سلول‌های اپی‌تلیال روده. سطح پایه‌ای سلول ها روی یک لامین پایه قرار گرفته‌اند و سطح رأسی با میکروویلی‌های انگشت مانندی که به داخل لومن روده‌ای قرار گرفته‌اند پوشاننده شده است. اتصالات محکم، فقط در زیر میکروویلی ها قرار دارند و مانع انتشار بسیاری از مواد میان لومن روده‌ای و خون از میان فضاهای خارج سلولی لابلای سلول ها می‌شوند. اتصالات شکافدار به یون ها و مولکول‌های کوچک اجازه عبور از میان سیتوزول سلول‌های مجاور را می‌دهند. سه نوع باقیمانده از اتصالات، اتصالات ادهرنس، دسموزوم‌های نقطه‌ای و همی دسموزوم‌ها، برای چسبندگی سلول - سلول و سلول - ماتریکس و پیام رسانی، حیاتی هستند. (b) میکروگراف الکترونی از یک برش باریک از سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای که نشان دهنده موقعیت‌های نسبی اتصالات مختلف است.

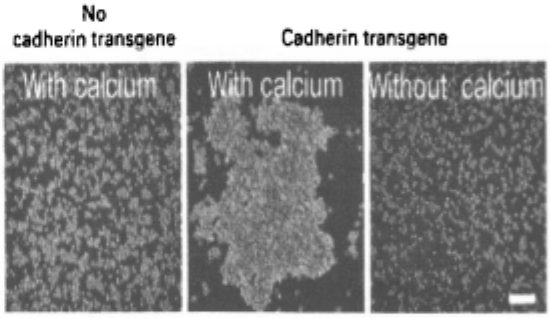
کمک به برقراری پیچیدگی آن به صورت یک دیاگرام سیمی شکل است. بنابراین مهره داران قادرند که با حداقل ۲۰ کادهرین عمل کنند.

کادهرین‌های کلاسیک: کادهرین‌های «کلاسیک» شامل کادهرین‌های ـ E، N و P هستند. کادهرین‌های ـ E و N، در یک طیف وسیع بیان می‌شوند خصوصاً در طی مراحل اولیه تمایز صفحات سلول ها اپی‌تلیومی قطبی، از قبیل آنهایی که روده کوچک یا توبول‌های کلیوی را آستر می‌نمایند، حاوی مقادیر فراوانی کادهرین E- در سطوح جانبی خود هستند. اگرچه کادهرین E- در اتصالات آدهرنس به میزان زیادی وجود دارد، اما در خارج از سطوح جانبی نیز یافت می‌شود که در آنجا به نظر می‌رسد غشاهای سلول‌های مجاور هم را به هم متصل می‌کند. نتایج حاصل از آزمایشات با سلول‌های L (یک رده از فیبروبلاست‌های موشی کشت داده شده) نشان می‌دهد که کادهرین‌های E- به طور ترجیحی برهمکنش‌های هموفیلیک را وساطت می‌کنند. سلول‌های L، کادهرین ها را بیان نکرده و به طور ضعیفی به خودشان یا سایر سلول ها متصل می‌شوند. زمانی که ژن کادهرین E- به داخل سلول L تلقیح می‌شود، سلول‌های L بیان‌کننده کادهرین که به صورت مهندسی شده ایجاد شده‌اند، به طور ترجیحی به سایر سلول‌های بیان‌کننده کادهرین E- متصل می‌شوند (شکل ۱۰-۱۹). این سلول‌های L بیان‌کننده کادهرین E-، تجمعات اپی‌تلیال مانندی با همدیگر و با سلول‌های اپی‌تلیال جدا شده از ریه ها تشکیل می‌دهند. اگرچه اکثر کادهرین‌های E-، در ابتدا اتصالات هموفیلیک از خود نشان داده‌اند، اما برخی از آن ها برهمکنش‌های هتروفیلیک نیز برقرار می‌کنند.

چسبندگی کادهرین ها به حضور Ca^{2+} خارج سلولی بستگی

جدول ۲-۱۹ اتصالات سلولی

اتصال	نوع چسبندگی	CAMهای اصلی یا گیرنده‌های چسبندگی	اتصال اسکلت سلولی	عملکرد
اتصالات لنگری				
۱- اتصالات آدهرنس	سلول - سلول	کادهرین‌ها	فیلامنت‌های اکتین	شکل، کشش، پیام‌رسانی
۲- دسموزوم‌ها	سلول - سلول	کادهرین‌های دسموزومی	فیلامنت‌های حد واسط	کشش، مقاومت، پیام‌رسانی
۳- همی‌دسموزوم‌ها	سلول - ماتریکس	اینتگرین ($\alpha6\beta4$)	فیلامنت‌های حد واسط	شکل، استحکام، پیام‌رسانی
اتصالات محکم	سلول - سلول	اکلودیون، کلودین، JAMs	فیلامنت‌های اکتین	کنترل جریان محلول، پیام‌رسانی
اتصالات شکاف‌دار	سلول - سلول	کانکسین‌ها، اینکسین‌ها، پانکسین‌ها	اتصالات مستقیم به اسکلت سلولی توسط آداپتورها به سایر اتصالات	برقراری ارتباط، انتقال مولکول‌های کوچک میان سلول‌ها
پلاسمودسماتا (تنها در گیاهان)	سلول - سلول	نامشخص	فیلامان‌های اکتین	برقراری ارتباط، انتقال مولکول‌ها میان سلول‌ها



▲**شکل تجربی ۱۰-۱۹. E- کادهرین، چسبندگی وابسته به Ca^{2+} را در سلول‌های L وساطت می‌کند.** تحت شرایط استاندارد کشت سلولی در حضور کلسیم در مایع خارج سلولی، سلول‌های L، به صورت صفحات تجمع نمی‌یابند (چپ). تزریق یک ژن که سبب بیان E- کادهرین در این سلول ها می‌گردد، باعث تجمع آن ها به صورت توده‌های شبه اپی‌تلیالی در حضور کلسیم می‌شود (وسط)، اما در غیاب کلسیم (راست) این عمل را نمی‌تواند انجام دهد.

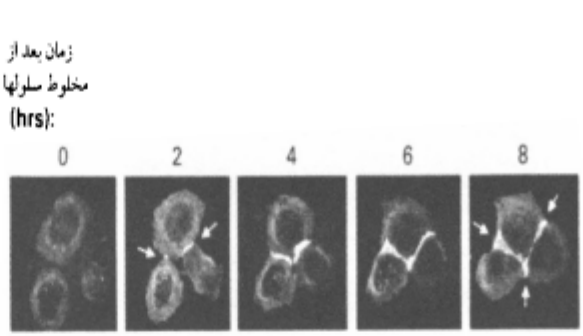
دارد که نامشان نیز از همین خاصیت‌شان گرفته شده است[1]. به عنوان مثال، چسبیدن سلول‌های L بیان‌کننده کادهرین E-، زمانی که سلول ها در یک محلول حاوی Ca^{2+} کم قرار می‌گیرند، کاهش می‌یابد (شکل ۱۰-۱۹). برخی از مولکول‌های چسبندگی به مقادیر جزئی Ca^{2+} در مایع خارج سلولی نیاز دارند تا بتوانند به درستی عمل کنند، در حتی که سایرین (مثل IgCAMs) مستقل از Ca^{2+} می‌باشند.

نقش کادهرین - E در اتصال را می‌توان توسط آزمایشات انجام شده روی سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده که MDCK[2] نام دارند نیز بررسی نمود (شکل ۳۴-۹). یک شکل نشاندار شده با پروتئین فلورسانت سبز رنگ از کادهرین - E را در این سلول ها استفاده نمودند تا نشان دهند که کلاسترهای کادهرین - E، اتصالات اولیه را برقرار کرده و در نتیجه سبب می‌شوند که سلول ها در صفحات قرار گیرند (شکل ۱۱-۱۹). در این سیستم آزمایشگاهی، افزون آنتی بادی که به کادهرین - E وصل می‌شود، مانع از برهمکنش‌های هموفیلیک آن شده و اتصالات وابسته به Ca^{2+} سلول‌های MDCK معلق را به هم مهار کرده و سبب ممانعت از تشکیل اتصالات ادهرنس بین سلولی می‌شوند.

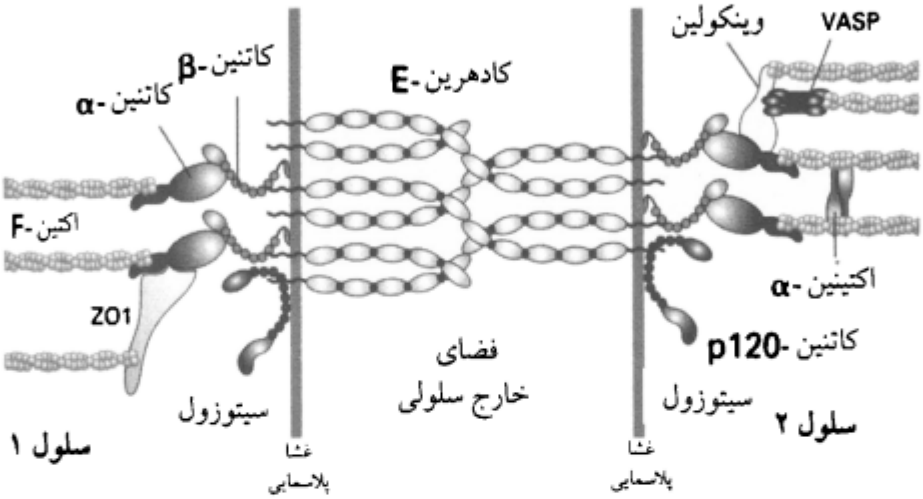
هر کادهرین کلاسیک حاوی یک دُمین گذارغشایی ساده، یک دُمین سیتوزولی C- ترمینال نسبتاً کوتاه و پنج دُمین خارج سلولی «کادهرین» می‌باشد (شکل ۲-۱۹ را ملاحظه کنید). دُمین‌های خارج سلولی برای اتصال Ca^{2+} و اتصال سلول - سلول با واسطه کادهرین ضرورینند. اتصال باواسطه کادهرین، موجب برهمکنش‌های مولکولی جانبی (درون سلولی) و ترانس (بین سلولی) می‌شود (شکل ۳-۱۹). جایگاه اتصالی Ca^{2+} میان تکرارهای کادهرین، برای

1- Calcium adhering

2- Madin - Darby Canine Kidney



شکل تجربی ۱۱ـ۱۹ کادهرین E اتصالات چسبندگی در سلول‌های اپی‌تلیالی MDCK کشت داده شده را وساطت می‌کند. ژن E- کادهرین را به پروتئین فلورسانت سبز (GFP) متصل کرده و آن را بـه داخـل سـلول‌های MDCK در محیط کشت وارد مـی‌کنند. سپس سلول ها با هم در یک زمینه حاوی کلسیم مخلوط شده و توزیع E- کادهرین فلورسانت در کل زمان مورد مشاهده قرار گرفت (در ساعت ها نشان داده شده است). توده‌های E- کادهرین، اتصال اولیه را وساطت کرده و سبب اتصالات بعدی سلول‌های اپی‌تلیال به هم می‌شوند.

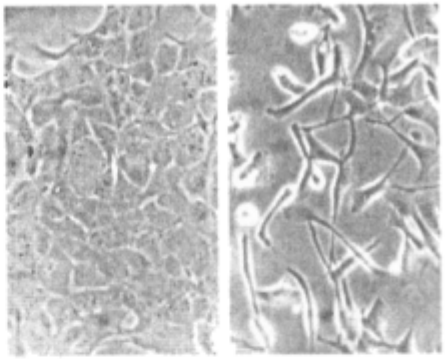


▲ **شکل ۱۲ـ۱۹ ترکیبات پروتئینی مهم در اتصالات چسبندگی معمول.** دُمین‌های خارج سلولی دیمرهای E- کادهرین که در اتصالات آدهرنس روی سلول‌های مجاور کلاستر شده‌اند، برهمکنش‌های هموفیلیک وابسته به Ca^{2+} ایجاد می‌کنند. دومین‌های سیتوزولی کادهرین‌های E- به صورت مستقیم یا غیرمستقیم به پروتئین‌های آداپتور چندگانه (مثل؛ β- کاتنین) متصل می‌شود که اتصالات را به فیلامان‌های اکتین (F-اکتین) اسکلت سلولی متصل کرده و در مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی شرکت می‌کنند. در اینجا دسته‌های متنوع پروتئین‌های آداپتور در دو سلول مشخص شده‌اند که تاکیدی بر این می‌باشد که آداپتورهای متنوعی می‌توانند با اتصالات آدهرنس برهمکنش نمایند. برخی از این آداپتور ها از قبل ZO1 می‌تواند با چندین CAMs مختلف برهمکنش نمایند.

استحکام‌دهی به الیگومرهای کادهرین به کار می‌رود. الیگومرهای کادهرین نهایتاً کمپلکس‌های بین سلولی تشکیل مـی‌دهند تـا چسبندگی سلول - سلول را ایجاد کرده و سپس برقراری تماس‌های جانبی بیشتری نموده و سبب "Zippering up" کادهرین ها به صورت کلاسترهایی می‌شود. در این طریق، برهمکنش‌های با تمایل کم، جمع می‌شوند تا یک چسبندگی بین سلولی بسیار محکم تولید نمایند.

نتایج حاصل از آزمایشات تعویض دُمین، که در آن یک دُمین خارج سلولی از یک نوع کادهرین با دُمین موردنظر از یک کادهرین مختلف جایگزین شده است، نشان داد که ویژگی ریشه‌های اتصالی، دست کم در برخی از آن ها در دورترین دُمین‌های خـارج سـلولی (دورترین نسبت به غشا) که همان دُمین N-ترمینال است می‌باشد. به نظر می‌رسد که چسبندگی با واسطه کادهرین عموماً فقط نیازمند برقراری برهمکنش‌های سر به سر میان دُمـین‌های N-تـرمینال اولیگومرهای کادهرین روی سلول‌های مجاور هم است کـه ایـن موضوع در شکل ۱۲ـ۱۹ نشان داده شده است. بنابراین، برخی از آزمایشات پیشنهاد می‌کنند که تحت برخی شرایط، حداقل سه دُمین کادهرین از هر مولکول، و نه فقط دُمین‌های N-ترمینال، توسط متصل شدن بهم، در برقراری اتصالات ترانس شرکت می‌نمایند.

دُمین C-ترمینال سیتوزولی در کادهرین‌های کلاسیک، توسط پروتئین‌های آداپتور به اکتین اسکلت سلولی متصل می‌شوند (شکل ۱۲ـ۱۹). این پیوند ها برای قدرت اتصال ضروریند کـه ظـاهراً بـه



(c) سلولهای سرطانی ، فاقد کادهرین

▲شکل تجربی ۱۳ـ۱۹ (شکل رنگی) فعالیت کادهرین -E در طی انتقال اپی‌تلیال - مزانشیمی و پیشروی سرطان کاهش می‌یابد. یک پروتئینی که Snail نام دارد بیان کادهرین -E را مهار کرده و با فرایند انتقال اپی‌تلیال - مزانشیمی مرتبط است. (a) سلول‌های MDCK اپی‌تلیوم عادی در محیط کشت پرورش داده شده‌اند. (b) بیان ژن Snail در سلول‌های MCDK سبب می‌شود که آن‌ها فرایند انتقال اپی‌تلیال - مزانشیمال را انجام دهند. (c) توزیع کادهرین -E توسط رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (قهوه‌ای تاریک) در بخش‌های نازک بافت مربوط به یک بیمار با سرطان منتشره گوارشی ارثی مشخص شده است. کادهرین -E در صفحات داخل سلولی سلول‌های اپی‌تلیال غدد گوارشی معده‌ای سالم (بالا سمت راست) دیده می‌شود؛ کادهرین -E در صفحات پوشاننده سلول‌های سرطانی مهاجم دیده نمی‌شوند.

واسطه مشارکت اولیه آن‌ها در افزایش‌دهی به اتصالات جانبی می‌باشد. به عنوان مثال، تخریب برهمکنش میان کادهرین‌های کلاسیک و α- و β- کاتنین (دو پروتئین آداپتور معمولی که این کادهرین ها را به فیلامنت‌های اکتین متصل می‌کنند) به مقدار زیادی چسبندگی سلول - سلول با وساطت کادهرین را کاهش می‌دهد. این تخریب به طور خودبخودی در سلول‌های توموری رخ می‌دهد که گاهی اوقات به علت اختلال در بیان α-کاتنین بوده و می‌تواند به طور آزمایشی توسط تهی‌سازی منبع سیتوزولی β- کاتنین‌های در دسترس القا شود. دُمین‌های سیتوزولی کادهرین‌ها، همچنین با مولکول‌های پیام رسانی داخل سلولی از قبیل β- کاتنین و کاتنین - p120 نیز برهمکنش می‌کنند. به طور شگفت‌انگیزی، β- کاتنین فقط اتصالات اسکلت سلولی را وساطت نمی‌کند، بلکه همچنین می‌تواند به هسته انتقال یافته و بیان ژن را در مسیر پیام رسانی Wnt تغییر دهد (شکل ۳۲ـ۱۶).

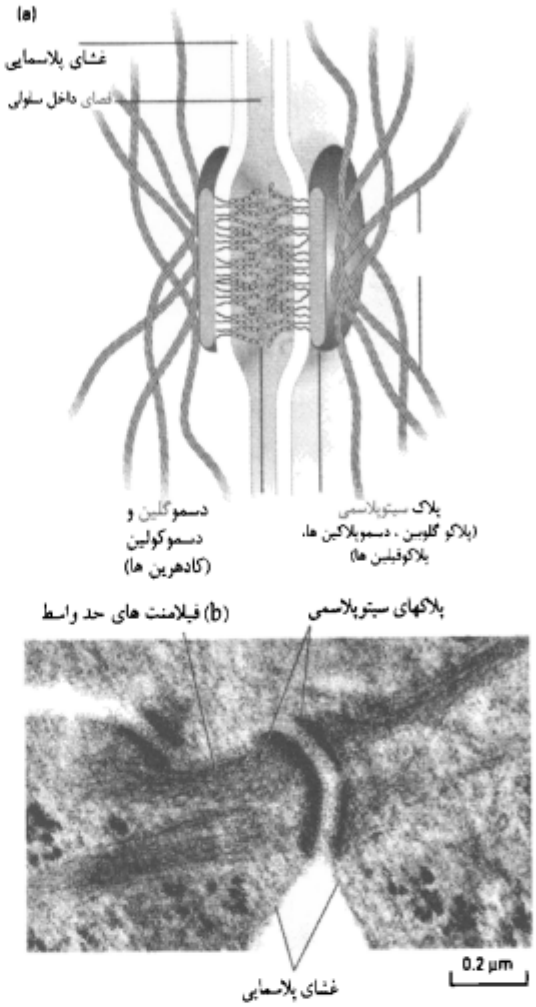
کادهرین‌ها نقش حیاتی در طی تمایز بافتی ایفا می‌کنند. هر کدام از کادهرین‌های کلاسیک دارای یک توزیع بافتی مشخص می‌باشد. در طی دوره تمایز، مقدار یا ماهیت کادهرین‌های سطح سلول تغییر کرده و بر بسیاری از جنبه‌های اتصالات سلول - سلول و مهاجرت سلولی اثر می‌گذارد. به عنوان مثال، سازمان‌یابی بافت ها در طی اندام زایی، اغلب توسط تبدیل سلول‌های اپی‌تلیال ثابت به سلول‌های پیش ساز متحرک برای سایر بافت‌ها (سلول‌های مزانشیمی) همراه می‌گردد. چنین انتقالات مزانشیمی - اپی‌تلیالی، با کاهش در میزان بیان E-کادهرین مرتبط می‌باشد (شکل b و a۱۳ـ۱۹). تبدیل سلول‌های اپی‌تلیال به سلول‌های سرطانی بدخیم، از قبیل تومورهای مجاری پستان یا سرطان ارثی منتشره دستگاه گوارشی (شکل ۱۳۲ـ۱۹) نیز به واسطه کاهش در فعالیت E-کادهرین مشخص می‌گردد.

کادهرین‌های دسموزمی

دسموزم ها (شکل ۱۴ـ۱۹) حاوی دو پروتئین کادهرین تخصص یافته شامل دسموگلین[1] و دسموکولین[2] هستند که دُمین‌های سیتوزولی آن‌ها متفاوت از کادهرین‌های کلاسیک می‌باشد. دُمین‌های سیتوزولی کادهرین‌های دسموزومی با پروتئین‌های آداپتور از جمله پلاکوگلوبین[3] (که ساختمانی مشابه β-کاتنین دارد)، پلاکوفیلین[4]ها، و یک عضو از خانواده پلاکین آداپتورها بنام دسموپلاکین[5] برهمکنش می‌یابند. این آداپتورها، که پلاک‌های ضخیم سیتوپلاسمی که مشخصه دسموزم است را تشکیل می‌دهند، در حقیقت با فیلامنت‌های حدواسط برهمکنش می‌یابند.

کادهرین دسموگلین توسط مطالعه یک بیماری پوستی غیرطبیعی اما آشکار بنام پمفیگوس وولگاریس[6] که یک بیماری خود ایمنی می‌باشد کشف گردید. بیماران دارای

1- Desmoglein
2- Desmocollin
3- Plakoglobin
4- Plakophilins
5- Desmoplekin
6-Pemphigus vulgaris



▲ **شکل ۱۴ـ۱۹ دسموزم‌ها.** (a) شکل یک دسموزم میان سلول‌های اپی‌تلیال که دارای اتصالاتی با کناره‌های فیلامنت‌های حدواسط می‌باشد. CAMsهای غشاگذر دسموگلین و دسموکولین مربوط به خانواده کادهرین هستند. پروتئین‌های آداپتور به دُمین‌های سیتوپلاسمی CAMs ها شامل پلاکوگلوبین، دسموپلاکین ها و پلاکوفیلین ها متصل می‌شوند. (b) میکروگراف الکترونی یک بخش نازک از یک دسموزم متصل‌کننده دو کراتینوسیت انسانی تمایز یافته در محیط کشت نشان داده شده است. دستجات فیلامنت‌های حدواسط از دو پلاک سیتوپلاسمی که رنگ تاریکی دارند به صورت شعاعی منشعب شده‌اند که این پلاک‌ها، سطح داخلی غشاهای پلاسمایی مجاور هم را آستر می‌کند.

بیماری‌های خودایمنی آنتی‌بادی‌های سنتز می‌کنند که به یک پروتئین بدنی نرمال متصل می‌شود. در پمفیگوس وولگاریس، این اتوآنتی‌بادی ها اتصال میان سلول‌های اپی‌تلیال را از بین برده و باعث تاول زدن پوست و غشاهای موکوسی می‌شود. نشان داده شده است که عمده این اتوآنتی‌بادی ها برعلیه دسموگلین هستند و در حقیقت، افزودن چنین آنتی بادی‌هایی به پوست طبیعی، تشکیل تاول ها و از بین رفتن اتصالات سلولی را القاء می‌کند.

اتصالات محکم سلول - سلول اپی‌تلیالی که توسط کادهرین‌های اتصالات ادهرنس وساطت می‌شود، امکان تشکیل کلاس دوم اتصالات بین سلولی را در اتصالات محکم اپی‌تلیال فراهم می‌آورد.

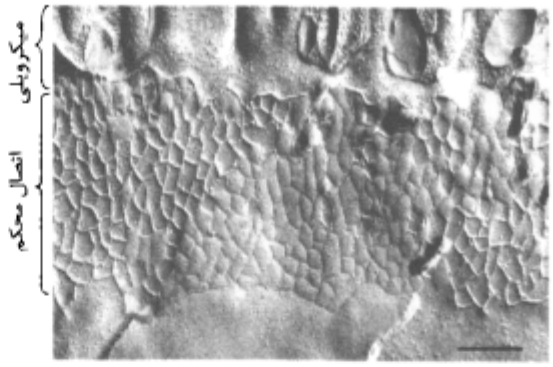
اتصالات محکم اجسام حفره‌ای را بهم دوخته و انتشار محتویات غشایی را محدود می‌کنند

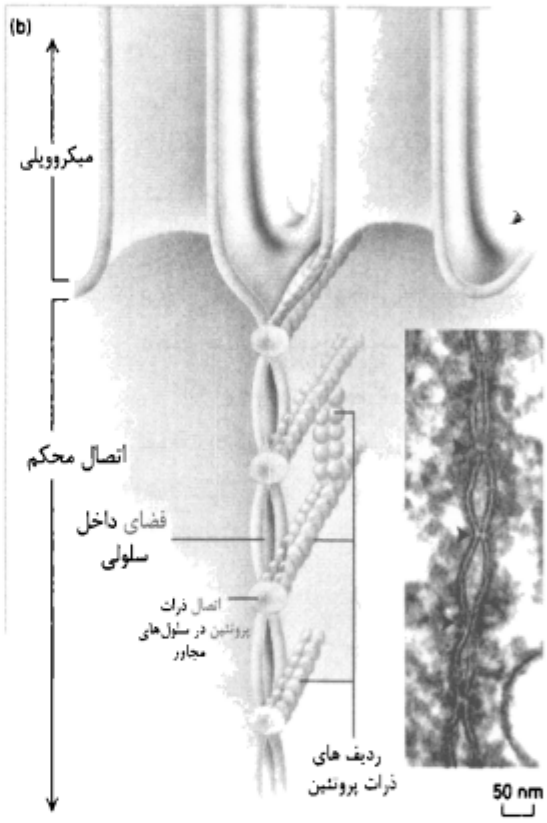
سلول‌های اپی‌تلیال قطبی، به عنوان سد ها و تنظیم‌کننده‌های انتقال، انتخابی عمل می‌کنند که مایعات خارج سلولی احاطه‌کننده غشاهای رأسی و بازولترال آن ها را باید از هم جدا نگه دارند. اتصالات محکم میان سلول‌های اپی‌تلیال مجاور هم معمولاً در یک نوار که سرتاسر سلول و فقط در زیر سطح رأسی را احاطه کرده، به حفظ و نگهداری قطبیت سلول کمک می‌کنند (شکل ۱۵ـ۱۹). این اتصالات تخصص یافته سدی را تشکیل می‌دهند که اجسام حفره‌ای از قبیل لومن روده و خون را بهم می‌دوزند (مثل سد خونی - مغزی).

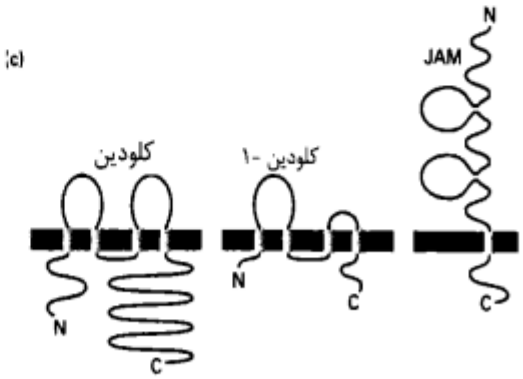
اتصالات محکم مانع از انتشار ماکرو مولکول ها و در درجات متفاوت، مولکول‌های کوچک محلول در آب و یون ها از عرض صفحه اپی‌تلیال توسط فضاهای میان سلول ها می‌شوند. آن ها همچنین سبب حفظ قطبیت سلول‌های اپی‌تلیال می‌شوند که این عمل را توسط ممانعت از انتشار پروتئین ها و گلیکوزیدهای غشایی از میان نواحی رأسی و بازولترال غشا پلاسمایی انجام می‌دهند که سبب می‌شوند این نواحی حاوی محتویات غشایی متفاوت از هم باشند. در نتیجه حرکت اکثر مواد غذایی از خلال اپی‌تلیوم روده در یک بخش وسیع توسط یک مسیر ترانس سلولار که به واسطه پروتئین‌های انتقالی ویژه متصل به غشا انجام می‌شود صورت می‌گیرد (شکل ۲۹ـ۱۱).

اتصالات محکم از دسته‌های نازک پروتئین‌های غشای پلاسمایی تشکیل شده‌اند که به طور کامل سلول را احاطه کرده و در تماس با دسته‌های نازک مشابه روی سلول‌های مجاور قرار می‌گیرند. زمانی که بخش‌های نازک سلول ها در یک میکروگراف الکترونی مشاهده می‌شوند سطوح رأسی سلول‌های مجاور به نظر می‌رسد که این سلول‌ها، همدیگر را در فواصل موجود، لمس کرده و فقط در نواحی زیرین سطح رأسی به هم ملحق می‌شوند (شکل ۹ـ۱۹b). در مقاطع حاصل از **شکست نمونه‌های فریزشده**[1]، اتصالات محکم به صورت شبکه متصل به هم از برآمدگی ها و فرورفتگی ها در غشای

1-Freeze-fracture







◀شکل ۱۵-۱۹ اتصالات محکم. (a) مقاطع حاصل از شکست نمونه‌های فریز شده در ناحیه اتصالات محکم میان سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ای نشان داده شده است. خط برش از میان غشای پلاسمایی یکی از دو سلول مجاور گذشته است. یک شبکه، مشابه شانهٔ عسل از فرو رفتگی ها و برجستگی ها در زیر میکروویلی منطقه اتصالات محکم را تشکیل می‌دهد. (b) طرح شماتیک نشان می‌دهد که چگونه یک اتصال محکم توسط اتصال صفوف ذرات پروتئینی در سلول مجاور شکل می‌گیرد. در میکروگراف موجود در شکل b نمایی از یک بخش فوق العاده نازک از یک اتصال محکم نشان داده شده که سلول‌های مجاور می‌توانند جایی که صفوف پروتئینی با هم برهمکنش کرده‌اند، با هم به طور تنگاتنگ تماس یابند. (c) همانطور که در این تصاویر شماتیک نشان داده شده است، پروتئین‌های اصلی موجود در اتصالات محکم، هم اکلودین و هم کلودین-۱ حاوی چهار مارپیچ غشاگذر هستند، در حالی که مولکول اتصال چسبندگی (JAM) دارای یک دُمین غشاگذر و یک ناحیه بلند خارج سلولی می‌باشند.

پلاسمایی دیده می‌شوند (شکل ۱۵a-۱۹).

بزرگنمایی‌های بسیار بالا نشان می‌دهند که ردیف‌هایی از ذرات پروتئینی با قطر ۳-۴nm برجستگی‌هایی را تشکیل می‌دهند که در میکروگراف‌های حاصل از برش نمونه‌های فریز شده اتصالات محکم دیده می‌شود. در شکل نشان داده شده در تصویر ۱۵b-۱۹، اتصال محکم توسط یک ردیف دوتایی از این ذرات تشکیل شده است که یک ردیف توسط سلول دیگر گرفته شده است. تیمار یک اپی‌تلیوم با پروتئاز تریپسین، این اتصالات محکم را از بین می‌برد و این فرضیه را تقویت می‌کند که پروتئین ها، جزو اجزاء ساختمانی ضروری برای این اتصالات هستند. دو پروتئین اصلی اینتگرال غشایی که در اتصالات سلولی شناسایی شده‌اند شامل اکلودین[1] و کلودین[2] هستند. زمانی که محققان موش‌هایی با جهش‌های غیرفعال‌کننده ژن اکلودین مهندسی کردند معلوم شد که این پروتئین برای تشکیل اتصالات محکم لازم است و موش‌ها دارای اتصالات محکمی بودند که از لحاظ ریخت‌شناسی متفاوت بودند. بررسی‌های بیشتر منجر به کشف کلودین گردید. هر کدام از این پروتئین ها حاوی چهار مارپیچ a هستند که روی غشا پل می‌زنند (شکل ۱۵c-۱۹). خانواده ژن‌های چندگانه کلودین، تعداد زیادی از پروتئین‌های مشابه بهم را کد می‌کنند که الگوهای بیان بافتی متفاوتی را نشان می‌دهند. یک گروه از مولکول‌های اتصالات چسبندگی (JAMs) مشخص شده‌اند که در ایجاد اتصالات هموفیلیک و سایر اعمال اتصالات محکم شرکت می‌کنند. این مولکول ها که حاوی یک a- هلیکس

1- Occludin 2- Claudin

منفرد هستند جزو سوپرفامیلی Ig از CAMs ها هستند. دُمین‌های خارج سلولی ردیف‌های اکلودین، کلودین و پروتئین‌های JAM در غشای پلاسمایی یک سلول به طور آشکار پیوندهای بسیار محکم با صفوف مشابه پروتئین‌های یکسان در سلول مجاور تشکیل داده و یک ارتباط بسیار محکم را ایجاد می‌کند. اتصال وابسته به Ca^{2+} با واسطه کادهرین نقش مهمی در تشکیل پایداری و عملکرد اتصالات محکم ایفا می‌کند.

قطعه سیتوزولی و بلند C-ترمینال اکلودین به دُمین‌های PDZ در پروتئین‌های آداپتور سیتوزولی بلند و ویژه‌ای اتصال می‌یابد. این دُمین ها در پروتئین‌های سیتوزولی مختلفی یافت شده و اتصال به C- ترمینال پروتئین‌های غشاگذر اختصاصی یا به سایرین را وساطت می‌کند. پروتئین‌های آداپتور حاوی PDZ که با اکلودین ارتباط دارند، در واقع به سایر پروتئین‌های اسکلت سلولی و پروتئین‌های پیام رسانی و رشته‌های اکتین متصل می‌شوند. به نظر می‌رسد که این برهمکنش ها ارتباط میان اکلودین و مولکول‌های کلودین را که برای حفظ تمامیت اتصالات محکم ضروری‌اند پایدار می‌نماید. C- ترمینال کلودین‌ها، همچنین به پروتئین آداپتور حاوی دُمین‌های داخل سلول چندگانه PDZ، ZO-1 متصل شده که در اتصالات ادهرنس نیز یافت می‌شود(شکل ۱۲ـ۱۹). بنابراین، همانطور که برای اتصالات ادهرنس و دسموزم ها گفتیم، پروتئین‌های آداپتور سیتوزولی و اتصالات آن ها در اسکلت سلولی نیز از اجزاء اساسی و حیاتی اتصالات محکم می‌باشند.

پروتئین‌های غشای پلاسمایی نمی‌توانند در جایی که اتصالات محکم قرار دارند از سطح غشای بگذرند. این اتصالات همچنین حرکت جانبی لیپید ها در سمت اگزوپلاسمی غشا پلاسمایی را در نواحی رأسی و بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال مهار می‌کنند. در حقیقت، ترکیبات لیپیدی سمت اگزوپلاسمی در این دو ناحیه، مجزا می‌باشد. به صورت ضروری تمام گلیکولیپید ها در سطح اگزوپلاسمیک غشا رأسی وجود دارند و همگی پروتئین ها توسط لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) به غشا متصل شده‌اند (شکل ۱۹ـ۱۰). برعکس، لیپید ها در سطح سیتوزلی نواحی رأسی و بازولترال سلول‌های اپی‌تلیال دارای ترکیبات مشابه بوده و می‌توانند ظاهراً به طور جانبی از یک ناحیه غشا به سمت دیگر انتشار یابند.

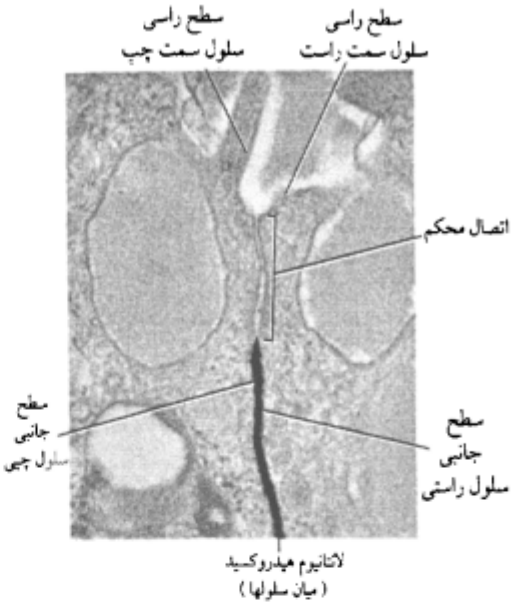
یک آزمایش ساده نفوذناپذیری اتصالات محکم ویژه را در برابر بسیاری از مواد محلول در آب مشخص نمود. در این آزمایش، هیدروکسید لانتانیوم (یک کلوئید متراکم به الکترون با وزن مولکولی بالا) به درون رگ‌های خونی پانکراس یک حیوان آزمایشگاهی تزریق شد؛ چند دقیقه بعد، سلول‌های آسینی اپی‌تلیال پانکراسی، تثبیت شده و برای بررسی‌های میکروسکوپی آماده گردیدند. همانطور که در شکل ۱۶ـ۱۹ نشان داده شد، هیدروکسید لانتانیوم از خون به داخل فضاهایی که سطوح جانبی سلول‌های آسینی مجاور هم را جدا می‌کند انتشار یافت. اما توانایی تراوش از عرض اتصالات محکم را نداشت.

سد مربوط به انتشار که توسط اتصالات محکم فراهم شده است، کامل نیست. دست کم در برخی از نقاط، به واسطه وجود خصوصیات متفاوت در انواع متفاوت مولکول‌های کلودین که در اتصالات محکم مختلف وجود دارند، نفوذپذیری آن ها به یون‌ها، مولکول‌های کوچک و آب به مقدار زیادی در میان بافت‌های اپی‌تلیال مختلف فرق می‌کند. در اپی‌تلیال‌های دارای اتصالات محکم «نشت‌کننده»، مولکول‌های کوچک می‌توانند از یک سمت لایه سلولی به سمت دیگر حرکت کنند و این امر توسط مسیر پاراسلولار به علاوه مسیر ترانس سلولار انجام می‌شود (شکل ۱۷ـ۱۹).

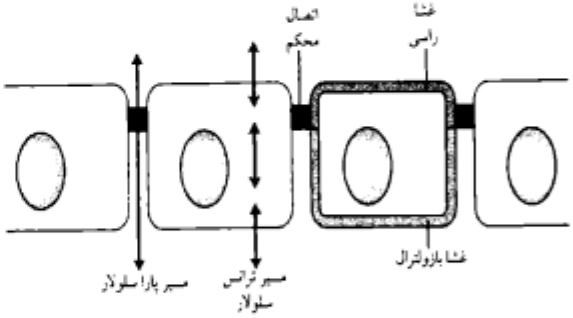
نشت‌پذیری این اتصالات محکم را می‌توان توسط مسیرهای پیام رسانی داخلی سلولی، خصوصا مسیرهای جفت شده با G-پروتئین و AMP حلقوی تغییر داد (فصل ۱۵). تنظیم نفوذپذیری اتصالات محکم توسط اندازه‌گیری جریان یونی (مقاومت الکتریکی) یا حرکت مولکول‌های رادیواکتیو یا فلورسانت از میان تک لایه سلول‌های MDCK مطالعه می‌شود.

اهمیت انتقال پاراسلولار در چندین بیماری انسانی مشخص شده است. در هیپومنیزیمیای ارثی، نقص ژن کلودین ۱۶، مانع جریان پاراسلولار نرمال منیزیوم در کلیه می‌شود. این امر سبب می‌شود که سطح خونی منیزیوم به طور غیرعادی کاهش یابد که می‌تواند منجر به تشنج شود. از این گذشته، جهشی در ژن کلودین ۱۴ سبب نقص ارثی شده که منجر به تغییر انتقال در اطراف اپی‌تلیال سلول مو (نوعی سلول در گوش) در کُشلای گوش داخلی می‌شود.

سموم تولید شده توسط باکتری ویبریوکلرا که سبب وبا می‌شود و چندین باکتری گوارشی دیگر (دستگاه معدی - روده‌ای) نفوذپری سد اپی‌تلیوم روده را توسط تغییر محتویات یا فعالیت اتصالات محکم، عوض می‌کنند. سایر سموم باکتریایی می‌توانند روی فعالیت پمپ یونی پروتئین‌های انتقالی غشا در سلول‌های اپی‌تلیال روده تاثیر بگذارند. تغییر القا شده توسط سم، در نفوذپذیری اتصال محکم (افزایش انتقال پاراسلولار) و در فعالیت پمپ یونی به واسطه پروتئین (افزایش انتقال ترانس سلولار)



▲شکل تجربی ۱۶-۱۹ اتصالات محکم مانع عبور مولکول‌های بزرگ از خلال فضای خارج سلولی میان سلول‌های اپی‌تلیال می‌شود. اتصالات محکم در پانکراس نسبت به کلوئید بزرگ محلول در آب هیدروکسید لانتانیوم (رنگ‌آمیزی تاریک) نفوذناپذیر است که در سمت بازولترال اپی‌تلیوم به کار گرفته شده است.



▲شکل ۱۷-۱۹ مسیرهای ترانس سلولار و پاراسلولار انتقال ترانس اپی‌تلیال. انتقال ترانس سلولار برای برداشت سلولی مولکول ها از یک سمت لازم است و سبب آزاد شدن آن از سمت مخالف توسط مکانیسم‌های شرح داده شده در فصل ۱۱ می‌شود. در انتقال پاراسلولار، مولکول ها به صورت خارج سلولی از میان قطعات اتصالات محکم حرکت می‌کنند که به مولکول‌های کوچک و یون ها نفوذپذیری دارد که این امر به ترکیب محتویات اتصالی و وضعیت فیزیولوژیکی سلول‌های اپی‌تلیال بستگی دارد.

می‌تواند سبب کاهش زیاد ورود یون ها و آب از دستگاه گوارشی به داخل بدن شده که در حقیقت منجر به اسهال و نهایتاً دهیدراسیون کشنده گردد.

اینتگرین ها اتصالات سلول ـ ECM را در سلول‌های اپی‌تلیال وساطت می‌کنند

برای اینکه بافت ها و اندام‌های جامد به طور ثابتی در جای خود قرار گیرند، صفحات اپی‌تلیوم ستونی ساده، باید ابتدا توسط سطوح پایه‌شان به ماتریکس خارج سلولی احاطه کننده‌شان (لامین پایه) اتصال یابند. این اتصال توسط گیرنده‌های چسبندگی که اینتگرین ها نامیده می‌شوند صورت می‌گیرد که هم در داخل و هم در خارج اتصالات لنگری که همی‌دسموزم ها نام دارد قرار می‌گیرد. (شکل ۹a-۱۹). همی‌دسموزم ها متشکل از چندین پروتئین اینتگرال غشایی هستند که توسط پروتئین‌های آداپتور سیتوپلاسمی (مثل پلاکین‌ها) به فیلامانت‌های حدواسط بر پایه کراتین متصل می‌شوند. گیرنده چسبندگی اصلی ECM در همی‌دسموزم ها اینتگرین $\alpha 6\beta 4$ می‌باشد که یک عضو از خانواده اینتگرین[1] پروتئین هاست (شکل ۲-۱۹).

اینتگرین ها به عنوان گیرنده‌های چسبندگی و CAMs ها عمل کرده و در یک طیف وسیع از سلول‌های اپی‌تلیال و غیر اپی‌تلیال، بسیاری از برهمکنش‌های سلول - ماتریکس و سلول - سلول را وساطت می‌کنند (جدول ۳-۱۹). در مهره داران، دست کم ۲۴ هترودیمر اینتگرین وجود دارد که متشکل از ۱۸ نوع زیرواحد α و ۸ نوع زیرواحد β در ترکیبات متنوع می‌باشند. یک زنجیر β مجزا می‌تواند با هر کدام از انواع زنجیره‌های α برهمکنش دهد و اینتگرین‌هایی را تشکیل دهد که به لیگاندهای مختلفی متصل می‌گردد. این پدیده **تنوع ترکیبی**[2] به اجزاء با تعداد کم این امکان را می‌دهد که بتوانند عملکردهای متفاوت بسیار زیادی را انجام دهند. گرچه اکثر سلول ها چندین اینتگرین مجزا را بیان می‌کنند که به لیگاندهای مشابه یا مختلفی متصل می‌گردند، اما اکثر اینتگرین ها غالباً در انواع سلول‌های خاصی بیان می‌گردند. بسیاری از اینتگرین ها نه تنها می‌توانند به بیش از یک لیگاند متصل شوند بلکه همچنین چندین نوع از لیگاندهای آن ها نیز می‌توانند به چندین اینتگرین اتصال یابند.

به نظر می‌رسد که تمام اینتگرین ها از دو زیر گروه کلی اجدادی مشتق شده‌اند. آنهایی که به پروتئین‌های حاوی توالی سه گانه Arg-Gly-Asp که عموما توالی RGD نامیده می‌شود متصل می‌گردند (مثل فیبرونکتین) و آنهایی که به لامین اتصال می‌یابند. زیرواحدهای α اینتگرین‌های چندگانه، حاوی یک دُمین مجزا

1- Integrin 2-Combinatonail diversity

هستند که دُمین - I (I-domain) نام دارد و می‌تواند اتصال اینتگرین‌های خاص (مثل $\alpha 1\beta 1$ و $\alpha 2\beta 2$) را به کلاژن‌های متفاوت در ECM وساطت کند. برخی از اینتگرین‌های حاوی دُمین‌های -I، به مقادیر زیاد روی لوکوسیت ها و سلول‌های پیش ساز سلول‌های سفید خونی (هماتوپوئیتیک) بیان می‌شوند. این دُمین ها مولکول‌های چسبندگی سلول را بر روی سلول‌های دیگر، شامل اعضای سوپرفامیلی Ig (مثل ICAMs، VCAMs) شناسایی کرده و بنابراین در فرایند چسبندگی سلول - سلول شرکت می‌نمایند. اینتگرین ها به طور معمول تمایل کمی برای لیگاندهای خود نشان می‌دهند و ثابت انفصال K_d بین 10^{-6} mol/L و 10^{-7} می‌باشد. بنابراین برهمکنش‌های متعدد ضعیف که به واسطه اتصال صد ها یا هزاران مولکول اینتگرین به لیگاندشان روی سلول ها یا درماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌شود به یک سلول اجازه می‌دهد که به طور محکم به هدف بیان‌کننده لیگاندش متصل گردد.

بخش‌هایی از زیرواحدهای α و β یک مولکول اینتگرین در ایجاد جایگاه اتصال به لیگاند خارج سلولی اولیه شرکت می‌کنند (شکل ۱۹-۲). اتصال لیگاند به اینتگرین ها نیازمند اتصال همزمان کاتیون‌های دوظرفیتی نیز می‌باشد. همانند سایر مولکول‌های چسبندگی سطح سلول، ناحیه سیتوزولی اینتگرین ها با پروتئین‌های آداپتوری که در حقیت به مولکول‌های اسکلت سلولی و مولکول‌های پیام رسانی داخل سلولی متصل می‌شوند برهمکنش می‌کنند. اکثر اینتگرین ها به اکتین اسکلت سلولی متصل می‌شوند و شامل اینتگرین‌های $\beta 1$ و $\alpha 6$ و $\alpha 3\beta 1$ می‌باشد که سطح پایه سلول‌های اپی‌تلیال را به وسیله لامینین به لامین پایه متصل می‌کنند. به این ترتیب، دُمین سیتوزلی زنجیره $\beta 4$ در اینتگرین $\alpha 6\beta 4$ در همی دسموزوم‌ها که بلندتر از سایر اینتگرین‌های β است، به پروتئین‌های آداپتور تخصص یافته متصل می‌شود که در واقع با فیلامانت‌های حداوسط بر پایه کراتین برهمکنش نموده است.

همانطور که خواهیم دید، تنوع اینتگرین ها و لیگاندهای ECM آنها، اینتگرین ها را قادر ساخته که در طیف وسیعی از فرایندهای بیولوژیک کلیدی شامل مهاجرت سلول ها به موقعیت‌های صحیح‌شان در طی تشکیل طرح بدنی یک جنین (ریخت زایی) و در پاسخ التهابی شرکت نمایند. اهمیت اینتگرین ها در فرایندهای متنوع، توسط نقایص حاصل از حذف یک ژن در موش‌های مهندسی شده مشخص شده که دارای جهش‌هایی در هر کدام از تمامی ژن‌های مربوط به زیرواحدهای اینتگرین می‌باشند. این نقایص دربرگیرنده ناهنجاری‌های مهمی در تکوین، تشکیل رگ‌های خونی و هموستاز می‌باشند. علی رغم تفاوت‌هایی که میان آن ها به چشم می‌خورد، تمامی این فرایند ها وابسته به برهمکنش‌های تنظیم شده با وساطت اینتگرین ها هستند که میان اینتگرین ها و اسکلت سلولی، ECM شان و یا CAMs های موجود روی سلول‌های دیگر برقرار می‌شود.

علاوه بر نقش اینتگرین ها در چسبندگی، آنها می‌توانند پیام رسانی خارج به داخل و داخل به خارج را نیز وساطت کنند (شکل ۱۹-۷). به کارگیری اینتگرین ها توسط لیگاندهای خارج سلولی‌شان، توسط پروتئین‌های آداپتوری که به ناحیه سیتوزولی اینتگرین ها متصل می‌شوند می‌تواند روی اسکلت سلولی و مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی (پیام رسانی خارج به داخل) اثر بگذارد. از طرف دیگر، مسیرهای پیام رسانی درون سلولی از سیتوپلاسم می‌توانند ساختار اینتگرین ها را تغییر داده و نهایتاً سبب تغییر توانایی آن ها برای اتصال به لیگاندهای خارج سلولی‌شان و وساطت برهمکنش‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس (پیام رسانی داخل به خارج) گردند. مسیرهای پیام رسانی با واسطه اینتگرین، روی فرایندهای مختلفی از جمله بقاء سلولی، تکثیر سلول و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول اثر می‌گذارد (فصل ۲۱).

اتصالات شکافدار متشکل از کانکسین‌ها، به مولکول‌های کوچک اجازه عبور مستقیم از میان سلول‌های مجاور هم را می‌دهد

میکروگراف الکترونی حاصل از تمامی سلول‌های حیوانی دارای نواحی فشرده‌ای در محل اتصال سلول به سلول هستند که شکاف بین سلول‌ها را ایجاد می‌کند. این نوع آرایش، ریخت شناسان اولیه را بر آن داشت که این نواحی را اتصالات شکافدار بنامند. برخلاف انتظار اکثر ترکیبات مهم این اتصالات، خودشان شکاف ندارند ولی یک دسته از ذرات به خوبی شناخته شدهٔ سلیندری هستند که از بین شکاف گذشته و منافذی را تشکیل می‌دهند که سیتوپلاسم‌های دو سلول مجاور را به هم وصل می‌کند.

در اکثر بافت‌ها، تعداد زیادی از ذرات اتصالی شکافدار، با هم به صورت کلاسترهایی در نزدیک هم قرار گرفته‌اند (مثل سطوح جانبی سلول‌های اپی‌تلیال؛ شکل ۱۹-۹). زمانی که غشای پلاسمایی تخلیص می‌شود و سپس به صورت بخش‌های کوچک در می‌آید، برخی از قطعات به مقدار زیادی حاوی تکه‌هایی هستند که از مقدار زیادی اتصالات شکافدار تشکیل شده‌اند. به دلیل وجود مقادیر نسبتاً زیادی از محتویات پروتئینی، این بخش ها تراکم بیشتری از توده‌های

جدول ۳ـ۱۹ اینتگرین‌های انتخاب شده در مهره داران*

محتویات زیرواحد	توزیع سلولی اولیه	لیگاندها
$\alpha_1\beta_1$	اکثر انواع	اکثراً کلاژن‌ها
$\alpha_2\beta_1$	اکثر انواع	اکثراً کلاژن‌ها و نیز لامینینها
$\alpha_3\beta_1$	اکثر انواع	لامینین‌ها
$\alpha_4\beta_1$	سلول‌های هماتوپوئیتیک	فیبرونکتین؛ VACM-1
$\alpha_6\beta_1$	فیبروبلاست‌ها	فیبرونکتین
$\alpha_L\beta_2$	اکثر انواع	لامینین‌ها
$\alpha_M\beta_2$	لنفوسیت‌های T منوسیت‌ها	ICAM-2 و ICAM-1 پروتئین‌های سرم (مثل فیبرینوژن، فاکتور X) ICAM-1 ؛
$\alpha_{IIb}\beta_3$	پلاکت‌ها	پروتئین‌های سرم (مثل فیبرینوژن، فاکتور وان ویلبراند، ویترونکتین)؛فیبرونکتین
$\alpha_6\beta_4$	سلول‌های اپی‌تلیال	لامینین

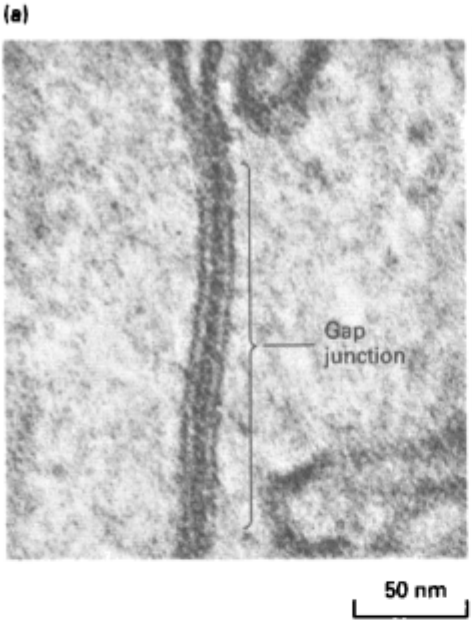
*اینتگرین ها به صورت زیرخانواده‌هایی طبقه‌بندی می‌شوند که دارای یک زیرواحد b مشترک هستند. لیگاندهایی که با قرمز نشان داده شده‌اند، CAMs ها هستند؛ سایرین ECM یا پروتئین‌های سرم می‌باشند. برخی از زیرواحد ها می‌توانند دارای ایزوفرم‌های چندگانه پیرایشی باشند که دارای دُمین‌های سیتوزولی متفاوت هستند.

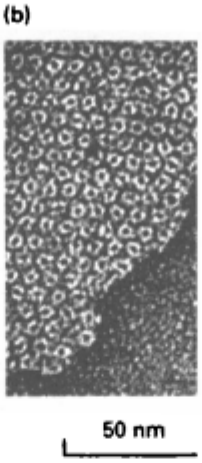
غشای پلاسمایی داشته و می‌توان توسط سانتریفوژ شیب چگالی آن ها را تخلیص نمود (شکل ۲۶ـ۱۹). زمانی که این مقاطع را از زاویه قائم بر غشای نگاه می‌کنیم، اتصالات شکافدار به صورت ستونی از ذرات شش ضلعی به نظر می‌رسند که یک کانال پر از آب را احاطه کرده‌اند (شکل ۱۸bـ۱۹)

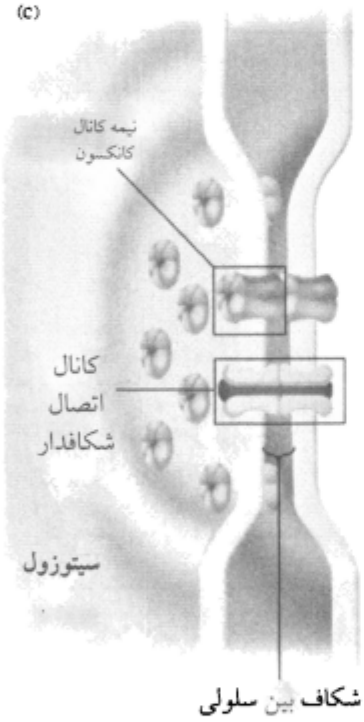
اندازه مؤثر منافذ اتصالات شکافدار را می‌توان توسط تزریق یک رنگ فلورسانت به سلول که به طور کوالان به مولکول‌هایی با اندازه متفاوت متصل شده است اندازه‌گیری کرد و در حالی که رنگ به داخل سلول‌های همسایه وارد می‌شود می‌توان آن را زیر یک میکروسکوپ فلورسانس مشاهده نمود. اتصالات شکافدار میان سلول‌های پستانداران به مولکول‌های بزرگتر از ۲nm اجازه عبور می‌دهد. در حشرات، این اتصالات نسبت به مولکول‌هایی با بزرگی ۲nm، نفوذپذیر هستند. به طور کلی، مولکول‌هایی کوچکتر از ۱۲۰۰Da به طور آزادانه می‌گذرند و آنهایی که بزرگتر از ۲۰۰۰Da هستند نمی‌توانند عبور کنند؛ عبور مولکول‌هایی با اندازه متوسط متغیر و محدود است. بنابراین یون‌ها، اکثر پیش سازهای با وزن مولکولی کم ماکرومولکول‌های سلولی، محصولات حاصل از متابولیسم حدواسط و مولکول‌های کوچک پیام رسانی داخل سلولی می‌توانند توسط اتصالات شکافدار از سلولی به سلول دیگر بروند.

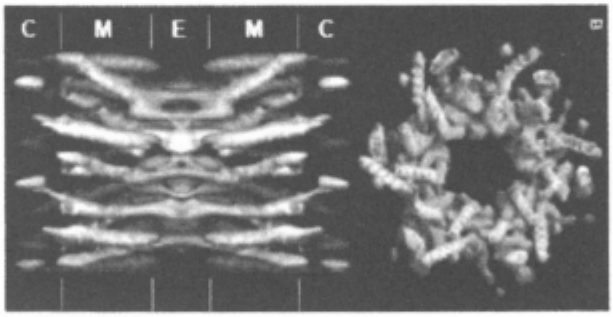
در بافت عصبی، برخی از نورون ها توسط اتصالات شکافداری بهم متصل شده‌اند که از میان آن ها یون ها به آسانی می‌گذرند، بنابراین سبب می‌شوند که پیام‌های الکتریکی سریعاً انتقال یابند. انتقال ایمپالس ها توسط این اتصالات که سیناپس‌های الکتریکی نام دارند تقریباً حدود هزاران بار سریع‌تر از سیناپس‌های شیمیایی صورت می‌گیرد (فصل ۲۳). اتصالات شکافدار همچنین در بسیاری از بافت‌های غیرعصبی وجود دارد که در آنجا به تکمیل فعالیت‌های الکتریکی و متابولیکی سلول‌های بیشماری کمک می‌کنند. به عنوان مثال، در قلب، اتصالات شکافدار، پیام‌های یونی را به سرعت در میان سلول‌های ماهیچه‌ای منتقل نموده که این سلول ها توسط دسموزم ها به طور محکم به هم متصل شده‌اند و بنابراین در فرایند تحریک الکتریکی همزمان با انقباض سلول‌های عضله قلبی در طی یک ضربان شرکت می‌کنند. همانطور که در فصل ۱۵ توضیح دادیم، برخی از پیام‌های هورمونی خارج سلولی، تولید یا آزادسازی مولکول‌های پیام رسان درون سلولی کوچک را که **پیامبرهای ثانویه**[1] (مثل AMP حلقوی، IP3 و Ca^{2+}) نام دارند تحریک کرده و به این ترتیب سبب تنظیم متابولیسم سلولی می‌شوند. به دلیل اینکه پیامبرهای ثانویه می‌توانند توسط اتصالات شکافدار میان سلول ها انتقال یابند، تحریک هورمونی یک سلول

1-Second messengers









◀ **شکل ۱۸ـ۱۹ اتصالات شکافدار.** (a) در این برش نازک توسط اتصال شکافدار متصل‌کننده دو سلول کبد موش، دو غشا پلاسمایی به طور تنگاتنگ در یک فاصله چند صدنانومتری در کنار هم قرار گرفته‌اند و توسط یک «شکاف» ۲ـ۳nm از هم جدا شده‌اند. (b) تعداد زیادی از ذرات تقریباً شش ضلعی در این تصویر وجود دارد که به طور عمودی و از سطح سیتوزلی به یک ناحیه از غشا پلاسمایی که غنی از اتصالات شکافدار است قرار می‌گیرد. هر ذره با ذرات مشابه خود روی سلول مجاور در یک صف قرار می‌گیرد و کانالی را تشکیل می‌دهد که دو سلول را بهم متصل می‌کند. (c) طرح شماتیک از یک اتصال شکافدار که دو غشا پلاسمایی را بهم متصل کرده است. هر دو غشا حاوی نیمه کانال‌های کانکسون هستند که استوانه‌هایی متشکل از شش مولکول کانکسین دمبلی شکل می‌باشد. دو کانکسون در محل شکاف میان دو سلول به هم متصل شده و یک کانال اتصال شکافدار با قطر ۱/۵ـ۲/۰nm تشکیل می‌دهد که سیتوزول‌های دو سلول را بهم مرتبط کرده است. (d) چگالی الکترونی یک کانال اتصال شکافدار نوترکیب توسط کریستالوگرافی الکترونی مشخص گردیده است. (چپ) نگاه جانبی به قسمتی از ساختمان کامل (c). M= غشا دو لایه‌ای؛ E= شکاف خارج سلولی؛ C= سیتوزول. (راست) نگاه از سمت پائین از ناحیه سیتوزل به سمت غشا دو لایه به کانکسون. قسمتهای بسیار متراکم در نقشهٔ چگالی الکترون مدلهای هلیکس‌های αگذار غشایی (طلایی) (چهار تا در هر زیر واحد و ۲۴ تا در نیمه کانالی کانکسون) را نشان می‌دهد.

می‌تواند یک پاسخ هماهنگ را توسط یک سلول مشابه و اکثر سلول‌های مجاور آن راه اندازی کند. این پیام رسانی با واسطه اتصال شکافدار، نقش مهمی را مثلاً در ترشح آنزیم‌های هضم‌کننده توسط پانکراس و در موج‌های متحد انقباضی ماهیچه (حرکت دودی) در روده ایفا می‌کند. یک مثال واضح دیگر از انتقال با واسطه اتصال شکافدار، پدیده **جفت سازی متابولیک**[1] یا **همکاری متابولیک**[2] می‌باشد که در آن یک سلول، مواد غذایی یا متابولیت‌های حد واسط را به سلول مجاورش که قادر به سنتز آن ها نیست، انتقال می‌دهد. اتصالات شکافدار نقش‌های حیاتی را در تکوین سلول‌های تخم در تخمدان توسط وساطت حرکت متابولیت ها و مولکول‌های پیام رسانی میان یک اووسیت و سلول‌های گرانولوزای احاطه کننده آن ایفا می‌کند که این عمل را میان سلول‌های گرانولوزای مجاور هم نیز انجام می‌دهد.

یک مدل واضح از ساختار اتصال شکافدار در شکل d و ۱۸c ـ۱۹ نشان داده شده است. اتصالات شکافدار مهره داران از **کانکسین‌ها**[3] (خانواده‌ای از پروتئین‌های گذار غشایی مرتبط که وزن مولکولی میان ۲۶۰۰۰ و ۶۰۰۰۰ دارند) تشکیل شده‌اند. یک خانواده کاملاً متفاوت

1-Metabolic coupling 2-Metabolic cooperation
3-Connexins

پروتئینی، اینکسین‌ها[1] هستند که اتصالات شکافدار در بی‌مهرگان را تشکیل می‌دهند. سومین خانواده از پروتئین‌های شبه اینکسین که پانکسین‌ها[2] نام دارند اخیراً در بی مهرگان و مهره داران کشف شده‌اند. هر کدام از ذرات شش وجهی مهره داران حاوی ۱۲ مولکول کانکسین هستند که به صورت غیرکوالان به هم متصل شده‌اند: ۶ تا از آنها یک نیمه کانال استوانه‌ای کانکسین را در یک غشای پلاسمایی تشکیل می‌دهند که به یک نیمه کانال کانکسین در غشا سلول مجاور متصل شده و یک کانال آبی پیوسته را میان سلول ها تشکیل می‌دهد. هر مولکول منحصر به فرد کانکسین، چهار بار از عرض غشاء پل می‌زند که توپولوژی آن مشابه با اُکلودین می‌باشد (شکل ۱۵ـ۱۹). پانکسین ها قادر به تشکیل کانالهای بین سلولی هستند. به این ترتیب، نیمه کانال‌های پانکسین نیز ممکن است به نحوی عمل کنند که امکان تبادل مستقیم میان فضاهای داخل سلولی و خارج سلولی را فراهم کنند.

در انسان ۲۱ ژن مختلف کانکسین به همراه دسته‌های مختلفی از کانکسین‌های مختلف وجود دارد که در انواع سلولی مختلف بیان می‌گردند. این تنوع به همراه تولید موش جهش یافته‌ای که در ژن‌های کانکسین دارای جهش‌های غیرفعال‌کننده بود، نقش کانکسین ها را در طیف متنوعی از سیستم‌های سلولی، پررنگ نموده است. برخی از سلول ها یک کانکسین واحد را بیان می‌کنند که کانال‌های همسان را تشکیل می‌دهد. با این حال برخی از سلول‌ها، حداقل دو کانکسین را بیان می‌کنند؛ این پروتئین‌های مختلف به صورت کانکسین‌های هترومری آرایش می‌یابند که در حقیقت کانالهای اتصال شکافدار ناهمسان تشکیل می‌دهند. وجود تنوع در ترکیب کانال، منجر به تفاوت در نفوذپذیری کانال می‌شود. به عنوان مثال، کانال ها از یک ایزوفرم کانکسین ۴۳ کیلودالتونی بنام Cx43 (کانکسینی که در اکثر نقاط بیان می‌شود) ساخته شده است که بیش از ۱۰۰ بار به ATP و ADP نفوذپذیرتر از انواع ساخته شده از Cx32 (۳۲kDa) است.

نفوذپذیری اتصالات شکافدار توسط تغییر در pH و غلظت Ca^{2+} داخل سلولی و فسفریلاسیون کانکسین تنظیم می‌شود. یک مثال از تنظیم فیزیولوژیکی اتصالات شکافدار در زمان تولد نوزادان پستانداران به چشم می‌خورد. سلول‌های ماهیچه‌ای در رحم پستانداران باید به صورت قوی و همزمان در طی زایمان منقبض شده تا جنین بیرون آید. به منظور تسهیل این فعالیت همزمان، بلافاصله در ابتدا و در طی زایمان، افزایشی تقریباً حدود پنج تا ده برابر در مقدار کانکسین اصلی میومتریوم، Cx43 ایجاد می‌شود و افزایشی در تعداد و اندازه اتصالات شکافدار ایجاد شده که سبب کاهش سریع Postpartum می‌شود.

آرایش کانکسین‌ها، رفت و آمد آن ها در میان سلول ها و تشکیل اتصالات شکافدار کارآمد، ظاهراً به کادهرین -N و پروتئین‌های اتصالی مرتبط به آن (مثل α و β-کاتنین‌های ZO-1 و ZO-2) و پروتئین‌های دسموزمی (پلاکوگلوبین، دسموپلاکین و پلاکوفیلین-۲) بستگی دارد. دُمین‌های PDZ در ZO-1 و ZO-2 به C-ترمینال Cx43 متصل شده و ظاهراً برهمکنش آن با کاتنین ها و کادهرین -N را وساطت می‌کنند. مثال واضح این روابط در قلب دیده می‌شود که وابسته به اتصالات شکافدار مجاور (به منظور جفت‌سازی سریع الکتریکی متحد) و اتصالات ادهرنس و دسموزم ها (به منظور جفت‌سازی مکانیکی میان کاردیومیوسیت‌ها) دارد تا در آن فعالیت الکتریکی داخل سلولی و حرکت مورد نیاز برای اعمال قلبی عادی میسر گردد. نکته قابل ملاحظه این است که ZO-1 به عنوان یک آداپتور برای اتصالات ادهرنس (شکل ۱۲ـ۱۹)، محکم و شکافدار بکار می‌رود که این موضوع پیشنهاد می‌کند ZO-1 و سایر آداپتور ها می‌توانند به تشکیل و عملکرد این اتصالات متفاوت کمک کنند.

بروز جهش‌هایی در ژن‌های کانکسین سبب حداقل هشت بیماری انسانی می‌شود که شامل کری (Cx31 و Cx26)، آب مروارید یا نقایص قلبی (Cx43,Cx46,Cx50) و شکل وابسته به X بیماری شارکوت - مری - توس[3] (Cx32) است که نشانه آن ها تحلیل پیشرونده اعصاب محیطی است.

نکات کلیدی بخش ۲-۱۹

اتصالات سلول - سلول و سلول -ECM و مولکول‌های چسبانندهٔ آنها

- سلول‌های اپیتلیال قطبی دارای سطوح جداگانهٔ رأسی، پایه‌ای و جانبی هستند. میکروویلی‌ها سطوح رأسی بسیاری از سلول‌های اپیتلیال را محافظت می‌کنند.
- سه خانوادهٔ اصلی از اتصالات سلولی یعنی اتصالات لنگری، اتصالات محکم و اتصالات منفذ دار سلول‌های اپتلیال را به صورت صفحاتی درآورده و بین آنها ارتباط برقرار می‌کند (شکلهای ۱-۱۹ و ۲-۱۹ را ملاحظه کنید). اتصالات لنگری می‌تواند به اتصالات چسبندگی، اتصالات دسموزوم و

1-Innexins 2-Pannexins

3-Charcot-Marie-Tooth

همی‌دسموزوم‌ها تقسیم‌بندی شود.

■ اتصالات چسبندگی و دسموزوم دارای اتصالات لنگری کادهرین می‌باشند که به غشای سلول‌های مجاور چسبیده و در کل بافت یک حالت سختی و کشش ایجاد می‌کند.

■ کادهرین‌ها مولکول‌های چسبندگی سلولی (CAMs) هستند که برای برهمکنش‌های وابسته به Ca^{2+} بین سلول‌ها در بافت‌های اپی‌تلیال و سایر بافت‌ها لازم هستند. آنها برهمکنش قوی سلول-سلول را با تنظیم برهمکنش‌های جانبی درون سلولی و بین سلولی ایجاد می‌کنند.

■ پروتئین‌های آداپتوری که با دُمین‌های سیتوزولی کادهرین و سایر CAMها و گیرنده‌های چسبندگی متصل می‌شوند ارتباط بین اسکلت سلولی و مولکول‌های پیام‌رسان را با غشای پلاسمایی تنظیم می‌کنند (شکل ۱۲-۱۹ را ملاحظه کنید). چسبندگی قوی سلول - سلول به ارتباط بین برهمکنش‌های CAMها با اسکلت سلولی بستگی دارد.

■ اتصالات محکم انتشار پروتئین‌ها و برخی از لیپیدها را در صفحه غشای پلاسمایی مسدود کرده و در قطبیت سلول‌های اپتلیال مشارکت می‌کنند آنها همچنین جریان آب و مواد محلول خارج سلول (پاراسلولی) از یک طرف اپی‌تلیوم به طرف دیگر آن محدود تنظیم می‌کنند (شکل ۱۷-۱۹ را ملاحظه کنید).

■ همی دسموزوم‌ها دارای اتصالات لنگری اینتگرین هستند که سلول را به عناصر موجود در زیر ماتریکس خارج سلولی متصل می‌کند.

■ اینتگرین‌ها خانوادهٔ بزرگ از پروتئین‌های هترودیمری $\alpha\beta$ سطح سلولی هستند که اتصالات سلول - سلول و سلول - ماتریکس و همچنین پیامهای درون و بیرون سلولی را در برخی از بافت‌ها تنظیم می‌کنند.

■ اتصالات منفذدار حاوی کپی‌های زیادی از پروتئین‌های کانکسین هست که به صورت یک کانال گذار غشایی همایش پیدا کرده و سیتوپلاسم دو سلول مجاور را به هم مرتبط می‌سازند (شکل ۱۸-۱۹ را ملاحظه کنید) مولکول‌های کوچک و یونها می‌توانند از میان منافذ عبور کرده و ارتباط متابولیکی و الکتریکی بین دو سلول مجاور را فراهم می‌آورند.

۱۹-۳ ماتریکس خارج سلولی I: لامین پایه

در حیوانات، ماتریکس خارج سلولی کمک می‌کند که سلول ها به صورت بافت ها سازمان‌یابی شده و عملکردهای سلولی آن ها را به واسطه فعال‌سازی مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی که رشد، تکثیر و بیان ژنی را کنترل می‌کنند، هماهنگ می‌کند. اکثر فعالیت‌های ماتریکس نیازمند گیرنده‌های چسبندگی غشاگذری است که به طور مستقیم به اجزاء ECM متصل شده‌اند و همچنین توسط پروتئین‌های آداپتور با اسکلت سلولی نیز برهمکنش می‌کند. یک کلاس اصلی از گیرنده‌های چسبندگی که چسبندگی سلول - ماتریکس را وساطت می‌کنند، اینتگرین ها است (بخش ۲-۱۹). با این حال، سایر انواع مولکول ها نیز به عنوان گیرنده‌های مهم چسبندگی نیز عمل می‌کنند.

گیرنده‌های چسبندگی به سه نوع مولکول فراوان در ماتریکس خارج سلولی در تمام بافت ها اتصال می‌یابند.

■ **پروتئوگلیکان‌ها**، گروهی از گلیکوپروتئین ها هستند که مانع اصطکاک میان سلول ها شده و به طیف متنوعی از مولکول‌های خارج سلولی متصل می‌شوند.

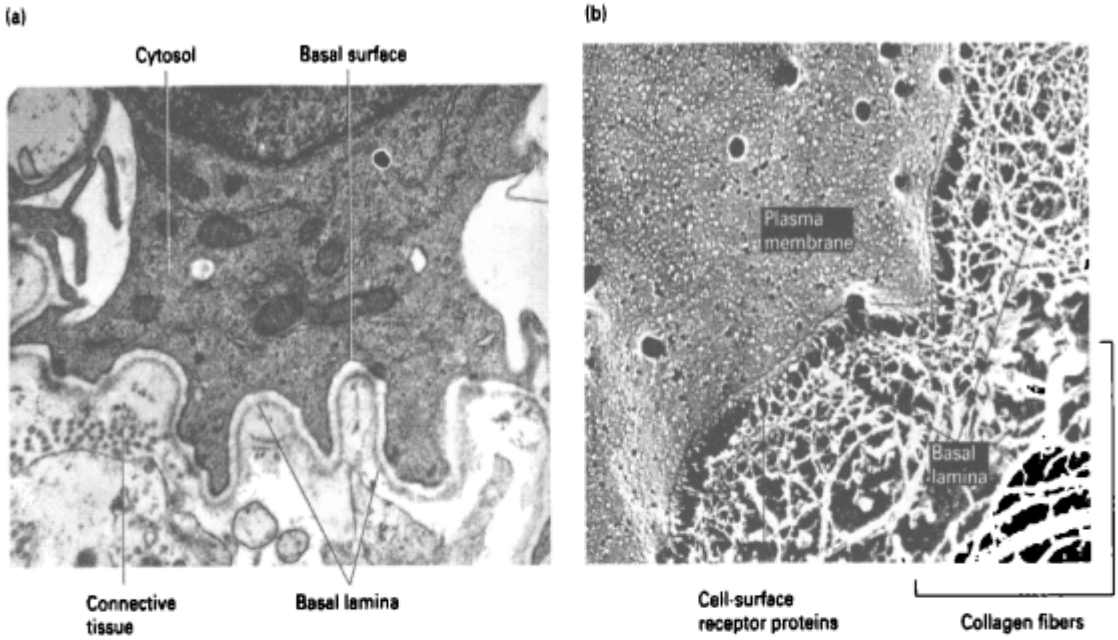
■ **رشته‌های کلاژن** که سبب ایجاد تکامل ساختاری و کشش مکانیکی و خاصیت ارتجاعی می‌شود.

■ **پروتئین‌های ماتریکس چند اتصالی محلول** مثل لامینین و فیبرونکتین که به گیرنده‌های چسبندگی با اتصالات متقاطع در سطح سلول و سایر محتویات ECM متصل می‌شوند.

ما بحث خود را با شرح ساختار ها و عملکردهای این اجزاء مهم ECM در زمینه لامین پایه (صفحات ماتریکس خارج سلولی تخصص یافته که نقش بسیار مهمی را در تعیین معماری کلی و عملکرد بافت اپی‌تلیال بازی می‌کنند) شروع می‌کنیم. در بخش بعدی، به شرح مولکول‌های ECM که عموما در بافت‌های غیر اپی‌تلیومی از جمله بافت پیوندی وجود دارند می‌پردازیم.

لامین پایه، داربستی را برای آرایش سلول ها به شکل بافت فراهم می‌کنند

در حیوانات، گروه‌های تخصص یافته سلول ها در بافت‌های اپی‌تلیال و غیر اپی‌تلیال، توسط لامین پایه، (یک شبکه صفحه مانند از محتویات ECM که معمولاً ضخامتی بیش از ۱۲۰-۱۶۰nm ندارند) یا در برگرفته شده‌اند و یا روی آن قرار گرفته‌اند (شکل ۱۹-۱۹). لامین پایه در بافت‌های مختلف از لحاظ ساختمانی تفاوت‌هایی دارد. در اپی‌تلیای ستونی و سایر اپی‌تلیاها (مثل آستر روده و پوست) به صورت یک داربستی است که تنها یک سطح سلول ها روی آن قرار می‌گیرد. در سایر بافت ها از قبیل بافت ماهیچه یا پوست، لامین پایه هر سلول را در بر گرفته است. لامین پایه



▲ **شکل ۱۹ـ۱۹ لامین پایه سلول‌های اپی‌تلیال و برخی از سلول‌های دیگر را از بافت پیوندی جدا می‌کند.** (a) میکروگراف الکترونی گذاره از یک بخش نازک از سلول ها (بالا) و بافت پیوندی زیرین آن ها (پایین). لایه متراکم به الکترون لامین پایه را می‌توان در زیر سطح پایه سلول ها که به صورت غیرمتراکم است، مشاهده نمود. (b) میکروگراف الکترونی از یک مقطع quick-freeze,deep-etch از ماهیچه اسکلتی که نشان دهنده ارتباط میان غشا پلاسمایی، لامین پایه و بافت پیوندی احاطه‌کننده آنهاست. در این مقطع، لامین پایه به صورت شبکه‌ای از پروتئین‌های رشته‌ای دیده می‌شود که با غشا پلاسمایی و رشته‌های ضخیم‌تر کلاژن بافت پیوندی اتصال برقرار کرده‌اند.

نقش‌های مهمی در ترمیم بعد از آسیب دیدن بافت و در تکوین جنینی ایفا می‌کند. به عنوان مثال، لامین پایه کمک می‌کند که جنین‌های چهار و هشت سلولی به صورت یک توپ به هم بچسبند. در تکوین سیستم عصبی، نورون ها در امتداد مسیرهای ECM مهاجرت می‌کنند که مستلزم محتویات لامین پایه می‌باشد. در حیوانات بزرگتر، دو لامین پایه مجزا برای تشکیل یک سد محکم که انتشار مولکول ها از میان خون و مغز (سد خونی - مغزی) را محدود می‌کند به کار گرفته می‌شود و در کلیه یک لامین پایه تخصص یافته به عنوان یک فیلتر انتخابی که نسبت به خون نفوذپذیر است عمل می‌کند. به این ترتیب، اهمیت لامین پایه در سازمان‌یابی سلول ها به صورت بافت و بخش‌های مجزا، ترمیم بافتی و هدایت سلول‌های در حال مهاجرت در طی تکوین، قابل بررسی می‌باشد. بنابراین تعجب آور نیست که اجزاء لامین پایه در طی تکامل حفظ شده باشند.

اکثر اجزاء ECM در لامین پایه توسط سلول‌هایی سنتز می‌شوند که در آن قرار دارند. چهار ترکیب پروتئینی قابل توجه در لامین پایه یافت می‌شوند (شکل ۲۰ـ۱۹):

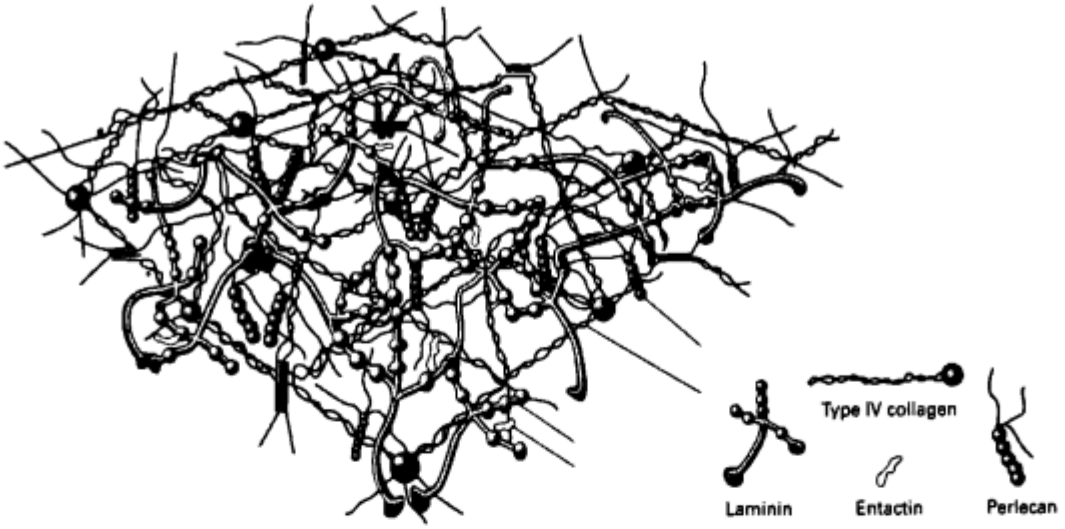
■ **کلاژن تیپ IV**، مولکول‌های تریمری که دارای دُمین‌های لوله مانند و کروی هستند که یک شبکه دو بعدی تشکیل داده است.

■ **لامین‌ها**، یک خانواده از پروتئین‌های چند اتصالی و دارای شکل‌عرضی که یک شبکه رشته مانند دوبعدی با کلاژن تیپ IV تشکیل می‌دهند وهمچنین به اینتگرین ها و سایر گیرنده‌های چسبدگی نیز متصل می‌گردد.

■ **پرلکان** یک پروتئوگلیکان چند دومینی که به اکثر اجزاء ECM و مولکول‌های سطح سلول متصل شده و با آن ها پیوند عرضی می‌دهد.

■ **نیدوژن (که انتاکتین نیز نامیده می‌شود)**، یک مولکول شبه میله که با کلاژن تیپ IV، پرلکان و لامین پیوندهای عرضی داده و به سایر اجزاء کمک می‌کند که در ECM شرکت کنند.

سایر مولکول‌های ECM بسته به بافت و نیازهای عملکردی ویژه لامین پایه، در لامین‌های پایه مختلفی شرکت می‌کنند. همانطور که در شکل ۱ـ۱۹ نشان داده شده است، یک سمت لامین پایه به وسیله گیرنده‌های چسبندگی شامل اینتگرین $\alpha6\beta4$ در همی دسموزم‌ها به سلول ها چسبیده است که در لامین پایه به لامینین متصل شده است. سمت دیگر لامین پایه دور بافت پیوندی مجاور، توسط یک لایه از رشته‌های کلاژن که در یک ماتریکس غنی از



▲ **شکل ۲۰ـ۱۹ محتویات اصلی پروتئینی لامینای پایه.** کلاژن تیپ IV و لامینین، هر کدام شبکه‌های دو بعدی را تشکیل می‌دهند که توسط مولکول‌های انتاکتین و پرلکان به صورت عرضی به هم متصل شده‌اند.

پروتئوگلیکان احاطه شده است، لنگر انداخته است. در اپی‌تلیای سنگفرشی مطبق (مثل پوست)، این اتصال توسط لنگرهای فیبریلهای کلاژن تیپ VII وساطت می‌شود. لامین پایه و فیبریل‌های لنگری کلاژن، ساختاری را تشکیل می‌دهند که **غشاپایه**[1] نام دارد.

لامینین، یک پروتئین چند اتصالی ماتریکس، به اتصالات عرضی ترکیبات لامین پایه کمک می‌کند

لامینین[2]، پروتئین چنداتصالی اصلی ماتریکس در لامینای پایه، یک پروتئین هتروتریمری با شکل عرضی است که وزن مولکولی آن ۸۲۰۰۰۰ می‌باشد (شکل ۲۱ـ۱۹). حداقل ۱۵ ایزوفرم لامینین که هر کدام حاوی زنجیره‌های پلی پپتیدی مختلف هستند شناسایی شده است. دُمین‌های کروی LG در انتهای C زیرواحد α لامینی اتصال وابسته به Ca^{2+} را به کربوهیدرات‌های ویژه روی مولکول‌های سطح سلولی از قبیل سین‌دکان و دیستروگلیکان وساطت می‌کند که در بخش ۴ـ۱۹ توضیح داده خواهند شد. دُمین‌های LG در طیف وسیعی از پروتئین‌ها یافت شده‌اند و می‌توانند به استروئیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها متصل شوند. به عنوان مثال، دُمین‌های LG در زنجیره α لامینی می‌تواند اتصال به اینتگرین‌های ویژه شامل اینتگرین $\alpha6\beta4$ را وساطت کند که در همی‌دسموزوم‌های موجود روی سطوح پایه سلول‌های اپی‌تلیال وجود دارد. لامینین، لیگاند اصلی پایه برای $\alpha6\beta4$ و سایر اینتگرین‌ها می‌باشد (جدول ۳ـ۱۹).

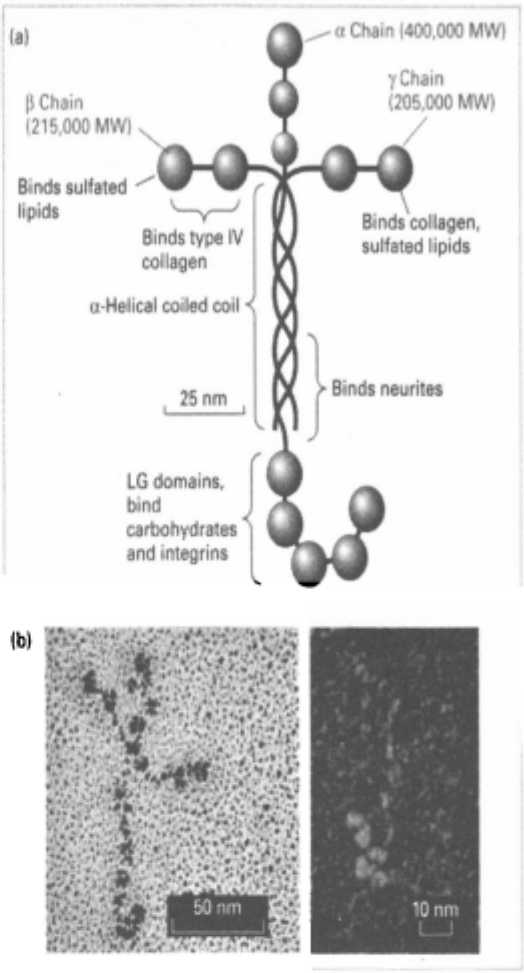
کلاژن تیپ IV که صفحه تشکیل می‌دهد یکی از اجزاء اصلی ساختمانی لامین پایه است

کلاژن تیپ IV، یکی از اجزاء ساختاری اصلی تمام لامیناهای پایه بوده و می‌تواند به گیرنده‌های چسبندگی ویژه اینتگرین اتصال یابد. کلاژن IV یکی از بیش از ۲۰ نوع کلاژنی است که در تشکیل ماتریکس‌های خارج سلولی مجزا در بافت‌های مختلف شرکت دارد (جدول ۴ـ۱۹). اگرچه این ها از لحاظ ترکیبات ساختاری ویژه و توزیع بافتی با هم متفاوتند، اما تمام کلاژن‌ها، پروتئین‌های تریمری هستند که از سه پلی پپتید که عموماً زنجیره‌های α کلاژن نامیده می‌شوند ساخته شده‌اند. تمام سه زنجیره α می‌توانند با هم مشابه (هموتریمر) یا متفاوت (هتروتریمر) باشند. یک مولکول کلاژن تریمری، حاوی یک یا بیش از یک قطعه سه زنجیره‌ای می‌باشد که هر کدام دارای ساختمان مشابه مارپیچ سه گانه هستند (شکل ۲۲a ـ۱۹). هر زنجیره توسط یکی از زنجیره‌های α به صورت یک مارپیچ چپ گرد پیچ خورده سه تا از این زنجیره ها که از سه زنجیره α تشکیل شده‌اند، بدور هم پیچ می‌خورند تا یک مارپیچ سه تایی راست گردان ایجاد کنند.

مارپیچ سه تایی کلاژن می‌تواند از یک محدوده غیرطبیعی از سه اسید آمینه تشکیل شود: گلایسین، پرولین و یک شکل تغییر یافته از پرولین که هیدروکسی پرولین (شکل ۱۵ـ۲) نامیده می‌شود.

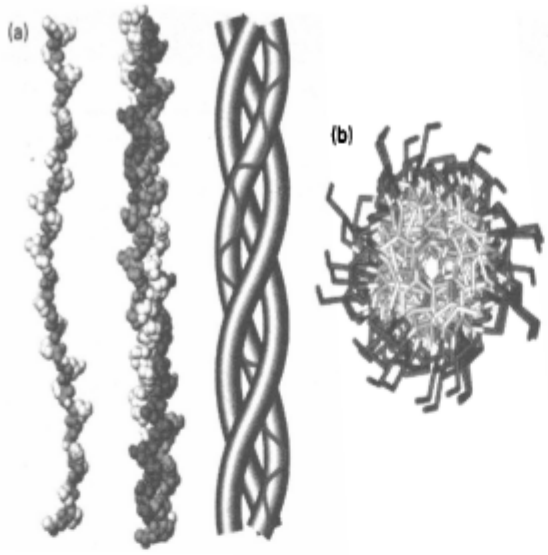
1-Basement membrane

2-Laminin



▲ **شکل ۱۹ـ۲۱ لامینین، یک پروتئین هتروتریمری چند اتصالی موجود در ماتریکس در تمامی لامیناهای پایه یافت می‌شود.** (a) شکل شماتیک از شکل کلی و موقعیت دُمین‌های کروی و ناحیه مارپیچ مارپیچی شده که در آن سه زنجیره لامینین به طور کوالان توسط چندین پیوند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند. نواحی متفاوت لامینین، بر گیرنده‌های سطح سلول و اجزاء مختلف ماتریکس می‌چسبند. (b) میکروگراف‌های الکترونی از یک مولکول لامینین کامل که مشخصه ظاهری آن در نگاه عرضی (چپ) و دُمین‌های LG متصل شونده به کربوهیدرات که در نزدیکی C-ترمینال قرار دارد (راست) نشان داده شده است.

این اسیدهای آمینه موتیف تکرار شونده مشخصی را ایجاد می‌کنند که به صورت Gly-X-Y می‌باشد و در آن X و Y می‌توانند هر اسید آمینه‌ای باشند، اما اغلب پرولین و هیدروکسی پرولین و به میزان کمتر لیزین و هیدروکسی لیزین هستند. گلیسین به دلیل زنجیره جانبی کوچکش تغییرناپذیر است و یک اتم هیدروژن، تنها اتمی است که می‌تواند در داخل مرکز مارپیچ زنجیره‌ای سه تایی قرار گیرد (شکل



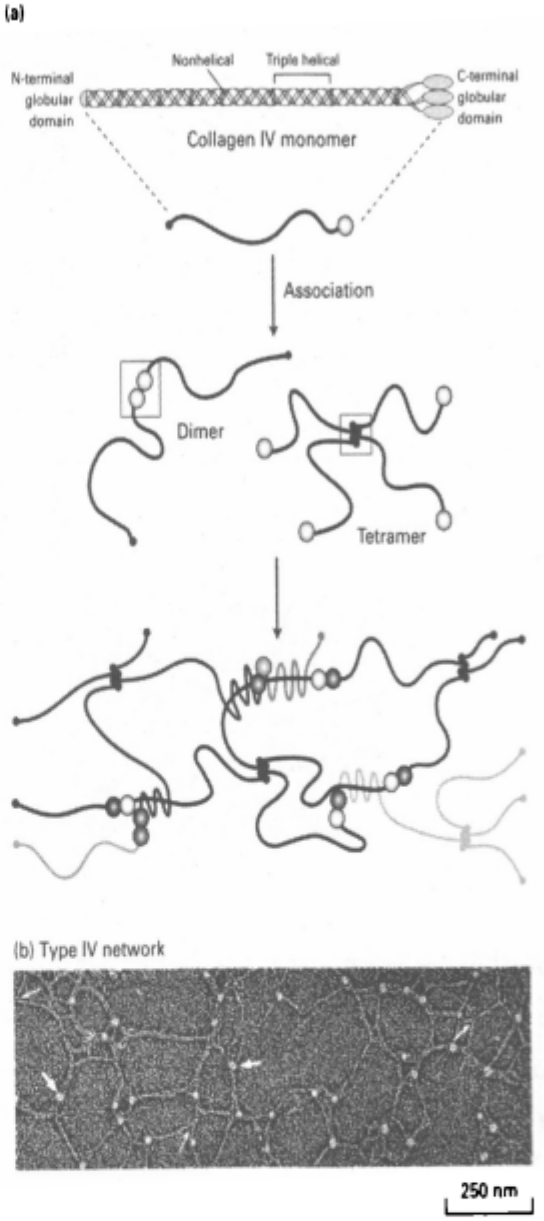
▲ **شکل ۱۹ـ۲۲ (شکل رنگی) مارپیچ سه تایی کلاژن.** (a) (چپ) مقطع عرضی ساختمان کریستالی قطعه پلی پپتیدی که توالی آن براساس دسته تکرار شونده از سه اسید آمینه، Gly-X-Y که مشخصه زنجیره‌های α کلاژن است ایجاد می‌گردد. (وسط) هر زنجیره به صورت یک مارپیچ چپ گردان پیچ می‌خورد و سه زنجیره به دور هم پیچ می‌خورند تا یک مارپیچ سه‌تایی راست گرد ایجاد گردد. شکل شماتیک (راست) که به طور واضح ساختمان طبیعی مارپیچ سه گانه را نشان می‌دهد. (b) نگاه از سمت پایین محور به مارپیچ سه گانه. زنجیره‌های جانبی پروتون ریشه‌های گلاسین (نارنجی) به داخل فضای بسیار باریک میان زنجیره‌های پلی پپتیدی در مرکز مارپیچ سه‌تایی جهت‌گیری کرده‌اند. در یک کلاژن جهش یافته که در آن سایر اسیدهای آمینه با گلایسن جایگزین شده‌اند (پروتون گلایسین توسط گروه‌های بزرگتر جایگزین گشته‌اند) سبب از بین رفتن فشردگی زنجیره ها و ناپایدار شدن مارپیچ سه گانه گشته‌اند.

کمک می‌کنند که سه زنجیره در کنار هم قرار گیرند. اگرچه پیوندهای ۱۹ـ۲۲b). پیوندهای هیدروژنی‌پپتیدیل - پرولین و پپتیدیل - هیدروکسی پرولیل، پیوندهای محکم هستند اما مانع تشکیل مارپیچ α با ساختار منفرد و کلاسیک نمی‌شوند و سبب پایدار کردن مارپیچ سه تایی کلاژن می‌گردند. گروه هیدروکسیل در هیدروکسی پرولین کمک می‌کند تا حلقه آن در ساختمان فضایی قرار گیرد که سبب پایدار کردن مارپیچ سه زنجیره‌ای شود. خصوصیات منحصر به فرد هر کدام از انواع کلاژن اساساً در اثر سه ویژگی تفاوت می‌کند. (۱) تعداد و طول قطعات مارپیچ سه تایی کلاژن؛ (۲) قطعاتی که قسمتهای هلیکس سه‌تایی را اشغال کرده و یا به سایر ساختارهای سه‌بعدی چین بخورد و (۳) تغییرات کوالانی زنجیره‌های α (مثل هیدروکسیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، اکسیداسیون، پیوندهای متقاطع). به عنوان مثال،

جدول ۴-۱۹ کلاژن‌های انتخاب شده

نوع	ترکیب مولکولی	ترکیبات ساختمانی	توزیع بافتی
کلاژن‌های رشته‌ای			
I	$[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$	فیبریلهایی با طول ۳۰۰nm	پوست، تاندون، استخوان، لیگامانها، عاج دندان، بافت‌های بینابینی
II	$[\alpha1(II)]_3$	فیبریهایی با طول ۳۰۰nm	غضروف، زجاجیه
III	$[\alpha1(III)]_3$	فیبریلهایی با طول ۳۰۰nm؛ اغلب بهمراه نوع I	پوست، ماهیچه، رگهای خونی
V	$[\alpha1(V)]_2\alpha2(V)],[\alpha1(V)_3]$	فیبریلهایی با طول ۳۹۰nm با زواید کروی در N ترمینال، اغلب بهمراه تیپ I	قرنیه، دندان، استخوان، جفت، پوست، ماهیچه صاف
کلاژن‌های متصل به فیبریل			
VI	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$	اتصال جانبی با تیپ I، دُمینهای کروی تکرارشونده	اکثر بافت‌های بینابینی
IX	$[\alpha1(IX)][\alpha2(IX)][\alpha3(IX)]$	اتصال جانبی با تیپ II، دُمین کروی N- ترمینال؛ GAG متصل	غضروف، زجاجیه
کلاژن‌های تشکیل‌دهنده ورقه و لنگری			
IV	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$	شبکه دوبعدی	تمامی لامیناهای پایه
VII	$[\alpha1(VII)]_3$	فیبریلهای دراز	پائین لامین پایه پوست
XV	$[\alpha1(XV)]_3$	مرکز پروتئین کندروئیتین، یک پروتئوگلیکان سولفاته	همه جا منتشر؛ نزدیک لامین پایه در ماهیچه
کلاژن‌های گذار غشایی			
XIII	$[\alpha1(XIII)]_3$	پروتئین اینتگرال غشا	همی‌دسموزومها در پوست
XVII	$[\alpha1(XVII)]_3$	پروتئین اینتگرال غشا	همی‌دسموزمها در پوست
کلاژن‌های دفاعی میزبان			
کالکتین‌ها		اولیگومرهای مارپیچ سه‌تایی؛ دُمینهای لکتین	خون، فضای ریوی
C1q		اولیگومرهای مارپیچ سه‌تایی	خون (کمپلمان)
کلاس A گیرنده‌های جارو روب		پروتئینهای غشایی هموتریمر	ماکروفاژها

زنجیره‌های کلاژن تیپ IV که برای لامین پایه منحصر به فرد است، با زنجیره‌های IVα مشخص می‌شوند. پستانداران شش زنجیره IVα مشابه را بیان می‌کنند که به صورت یک سری کلاژن تیپ IV آرایش می‌یابد که دارای خصوصیاتی مجزاست. تمام زیرگونه‌های کلاژن تیپ IV، یک مارپیچ سه تایی با طول ۴۰۰nm تشکیل می‌دهند (شکل ۲۳-۱۹)که توسط قطعات غیرمارپیچی حدود ۲۴ بار فاصله در آن ایجاد شده است و توسط دُمین‌های کروی بزرگ در انتهای C زنجیره ها و دُمین‌های کروی کوچکتر در انتهای N احاطه شده است. نواحی غیرمارپیچی سبب انعطاف‌پذیری مولکول می‌شوند. اتصالات جانبی و برهمکنش‌ها در انتهاهای کروی N و C مولکول‌های کلاژن تیپ IV، آن را به صورت یک شبکه فیبری دو بعدی نامنظم و شاخه‌دار آرایش می‌دهند که یک شبکه روی ساختارهای ساخته شده توسط لامین پایه را تشکیل می‌دهند (شکل ۲۳-۱۹).



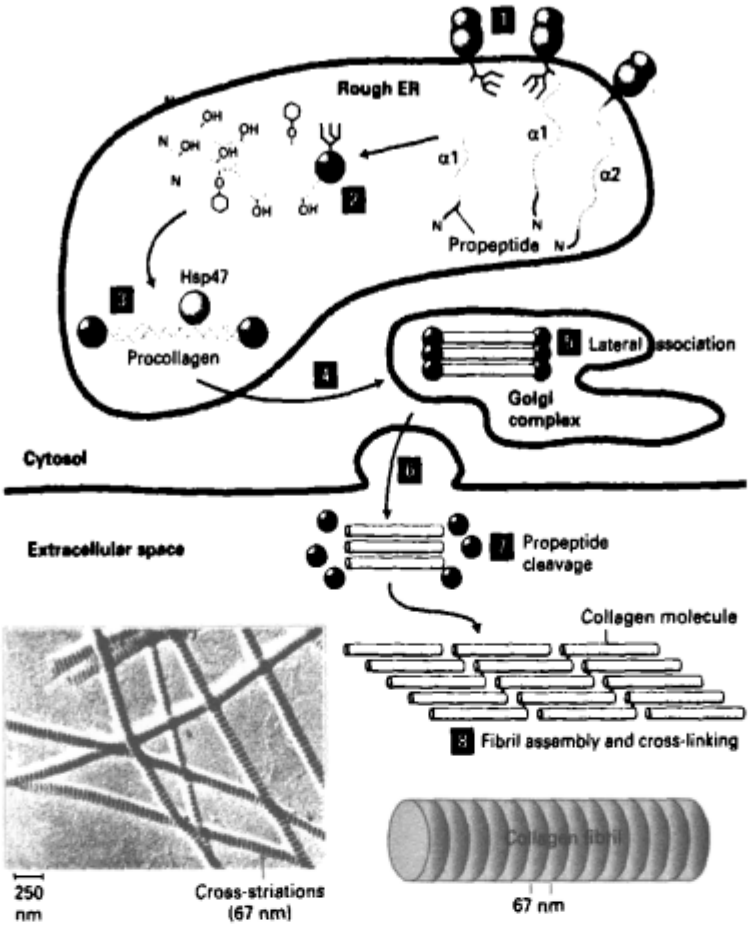
▲ **شکل ۲۳-۱۹ ساختمان و نحوه آرایش کلاژن تیپ IV.** (a) نمای شماتیک کلاژن تیپ IV. این مولکول با طول ۴۰۰nm دارای یک دُمین کروی کوچک غیرکلاژنی در انتهای N-ترمینال و یک دُمین کروی بلند در انتهای C- ترمینال خود می‌باشد. مارپیچ سه گانه به نواحی غیرمارپیچی ختم می‌شود که سبب ایجاد خمش‌های انعطاف‌پذیر در مولکول می‌گردند. برهمکنش‌های جانبی میان قطعات مارپیچ سه گانه که به صورت برهمکنش‌های سربه سر و دم به دم میان دمین‌های کروی هستند کمپلکس‌های دیمر، تترامر و کمپلکس‌های منظم‌تری را تشکیل می‌دهد که باعث ایجاد یک شبکه ورقه مانند می‌شود. (b) میکروگراف الکترونی از شبکه کلاژن تیپ IV که در محیط *In Vitro* تشکیل شده است. ظاهر تورمانند آن ناشی از انعطاف‌پذیری مولکول و اتصال کنار به کنار قطعات مارپیچ سه گانه (پیکان‌های نازک) و برهمکنش‌های میان دُمین‌های کروی C-ترمینال (پیکان‌های ضخیم) است.

در کلیه، یک لامین پایه دو تایی (غشا پایه گلومرولی) اپی‌تلیوم را که فضاهای ادراری را آستر کرده است، از اندوتلیومی که مویرگ‌های پر از خون را آستر کرده است جدا می‌کند. بروز نقص در این ساختار که مسئول اولترا فیلتراسیون خون و تشکیل اولیه ادرار است، می‌تواند منجر به نقایص کلیوی گردد. به عنوان مثال، جهش‌هایی که سبب تغییر دُمین کروی C-ترمینال زنجیره‌های IVα مشخص می‌گردند با نقایص پیشرونده کلیه، کاهش شنوایی مربوط به نورون‌های حسی و ناهنجاری‌های مشهود که همگی تحت عنوان سندرم آلپورت خوانده می‌شوند ارتباط دارد. در سندرم گودپاستور[1] (یک بیماری خود ایمنی نسبتاً نادر) آنتی بادی‌های حمله‌کننده به خود یا «خودی» به زنجیره‌های α3 در کلاژن تیپ IV که در غشا پایه گلومرولی و ریه‌ها وجود دارد متصل می‌شود. این اتصال سبب راه‌اندازی یک پاسخ ایمنی می‌شود که سبب آسیب رسانی و نقص پیش رونده کلیه و خونریزی ریوی می‌گردد.

پرلکان یکی از اجزاء پروتئوگلیکان با اتصالات عرضی در لامین پایه وگیرنده‌های سطح سلول می‌باشد

پرلکان، پروتئوگلیکان اصلی ترشحی در لامین پایه است که حاوی یک هسته پروتئینی چند دُمینی بزرگ (۴۷۰kDa≈) متشکل از پنج دُمین مجزای تکراری شامل دُمین‌های شبه لامینین LG و Ig است. به دلیل وجود تکرارهای کروی، زمانی که آن را توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌کنیم، به صورت یک رشته مروارید دیده می‌شود. بنابراین آن را پرلکان نامیده‌اند. پرلکان گلیکوپروتئینی است (پروتئینی با قندهایی که به صورت کوالان به آن متصل شده‌اند) که حاوی سه نوع زنجیره گلیکوپروتئینی با اتصال کوالان است: قندهای با پیوند N (فصل ۱۴)، قندهای با اتصال O (بخش ۱۹.۴) و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) که پلیمرهایی بلند حاوی دی ساکاریدهای تکراری هستند (پایین را ملاحظه کنید). گلیکوپروتئین‌ها حاوی زنجیره‌های GAG با اتصال کوالان هستند که پروتئوگلیکان‌ها نامیده می‌شوند. هسته پروتئینی محلی است که زنجیره‌های GAG به آن متصل شده‌اند. هم قسمت پروتئینی و هم بخش GAG پرلکان، در توانایی آن برای ایجاد ساختار و عملکرد لامین پایه مشارکت دارند. به دلیل وجود دُمین‌های چندگانه و زنجیره‌های پلی ساکاریدی که خصوصیات اتصالی مجزایی دارند، پرلکان به دوجین از مولکول‌های دیگر نیز اتصال می‌یابد که شامل

1- Good pasteur's syndrome



▲ **شکل ۲۴-۱۹ بیوسنتز کلاژن‌های رشته‌ای.** مرحله (❶): زنجیره‌های α پروکلاژن توسط ریبوزوم‌های متصل به غشا شبکه آندوپلاسمی (ER) سنتز شده و الیگوساکاریدهای متصل به آسپاراژین به انتهای C-ترمینال پروپپتید متصل می‌شوند. مرحله (❷): پروپپتید ها بهم متصل می‌شوند تا تریمرها را تشکیل دهند و سپس توسط پیوندهای کوالان دی سولفید بهم متصل شده و ریشه‌های انتخاب شده در تکرارهای سه گانه Gly-X-Y دچار تغییرات کوالان می‌شوند (پرولین ها و لیزین‌های ویژه هیدروکسیله می‌شوند، گالاکتوز [Gal] یا گالاکتوز - گلوکز [هگزاگون‌ها] به برخی از هیدروکسی لیزین ها متصل شده و پرولین ها به صورت سیس ← ترانس، ایزومریزه گردند). مرحله (❸): این تغییرات، تشکیل شبه زیپ را تسهیل کرده و پایداری مارپیچ‌های سه تایی و اتصال به پروتئین چاپرون Hsp47 (فصل ۱۳) را تسهیل می‌کند که ممکن است مارپیچ ها را پایدار کرده و مانع از تجمع تریمرهای نابالغ و یا هر دو را شود. مراحل (❹) و (❺): پروکلاژن‌های تاخورده به دستگاه گلژی انتقال یافته و در آن‌جا توسط اتصالات جانبی به صورت دستجات کوچک در می‌آیند. سپس زنجیره ها ترشح شده (مرحله ❻: و پروپپتیدهای N و C-ترمینال برش می‌یابند و حذف می‌گردند (مرحله (❼) و تریمر ها به صورت فیبریل‌ها آرایش یافته و سپس به صورت کوالان اتصالات عرضی میان آن ها ایجاد می‌شود (مرحله (❽). تریمرهای ۶۷nm در زیر میکروسکوپ الکترونی به صورت فیبریل‌های شیاردار دیده می‌شوند (تصویر کوچک در سمت چپ تصویر).

محتویات دیگر ECM (مثل لامینین، نیدروژن)، گیرنده‌های سطح سلولی و فاکتورهای رشد پلی پپتیدی است. اتصال همزمان به این مولکول ها سبب ایجاد اتصالات عرضی با واسطه پرلکان می‌شود. پرلکان را می‌توان در لامین پایه و ECM غیرلامین پایه یافت. گیرنده اتصالی دیستروگلیکان می‌تواند مستقیما توسط دُمین‌های LG خود و به صورت غیرمستقیم توسط اتصال آن به لامین، به پرلکان اتصال یابد. در انسان‌ها، بروز جهش در ژن پرلکان می‌تواند منجر به کوتولگی یا ناهنجاری‌های ماهیچه‌ای می‌شود که ظاهراً در نتیجه عملکرد نادرست اتصالات عصبی ـ عضلانی که کنترل‌کننده ضربات ماهیچه‌ای هستند ایجاد می‌گردند.

نکات کلیدی بخش ۳-۱۹

ماتریکس خارج سلولی I: غشای پایه

■ غشای پایه، شبکه‌ای از مولکول‌های ماتریکس خارج

سلولی (ECM)، بسیاری از سلول‌های اپیتلیال و سایر گروههای سازمان یافته سلول‌ها را از بافت پیوندی مجاور جدا می‌کند. لامین پایه به همراه شبکه کلاژنی نزدیک آن ساختاری بنام غشای پایه را تشکیل می‌دهند.

■ چهار نوع پروتئین در غشای پایه یافت شده‌اند (شکل ۲۰-۱۹ را ملاحظه کنید): لامینین (پروتئین چند اتصالی ماتریکس)، کلاژن تیپ IV، پرلکان (یک نوع پروتئوگلیکان) و انتاکتین / نیدوژن.

■ گیرنده‌های چسبندگی سطح سلول (مثل اینتگرین a6β4 در همی دسموزوم‌ها) سلول‌ها را به لامین پایه متصل می‌کند که خود لامین پایه به سایر ترکیبات ECM متصل شده است (شکل ۱-۱۹ را ملاحظه کنید). لامینین در لامین پایه لیگاند اصلی برای اینتگرین $\alpha 6\beta 4$ می‌باشد.

■ لامینین و سایر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی دارای چندین اتصال، مولکول‌های چندُمینی هستند که به چندین گیرندهٔ چسبندگی و ترکیبات ECM متصل می‌شود.

■ مولکول‌های بزرگ و قابل انعطاف کلاژن نوع IV انتها به انتها و به طور جانبی برهمکنش داده و یک ساختار بزرگی را به همراه سایر ترکیبات ECM و گیرنده‌های چسبندگی تشکیل می‌دهد که می‌توانند به آن متصل شوند. کلاژن یک ساختار مارپیچ سه گانه دارد (شکل ۲۲-۱۹ را ملاحظه کنید). کلاژن‌های مختلف بوسیله طول و تغییرات شیمیایی زنجیره‌های α آنها و با حضور بخش‌هایی که در ساختار مارپیچ سه‌گانه تداخل ایجاد می‌کند از هم قابل تمییز هستند.

■ پرلکان که یک پروتئوگلیکان بزرگ ترشحی موجود در لامین پایه است به بسیاری از ترکیبات ECM و گیرنده‌های چسبندگی متصل می‌شوند. پروتئوگلیکان‌ها حاوی پروتئین‌های متصل به غشاء، ترشحی هستند که به طور اختصاصی به صورت کووالان به زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی ویژه‌ای بنام گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) متصل شده است.

۱۹-۴ ماتریکس خارج سلولی II: بافت پیوندی و سایر بافت ها

تفاوت بافت پیوندی از قبیل تاندون و غضروف با سایر بافت‌های جامد در این است که قسمت اعظم حجم آن بیشتر از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده است تا سلول. این ماتریکس با رشته‌های پروتئینی غیرمحلول اشغال شده است و حاوی پروتئوگلیکان‌ها، پروتئین‌های چند اتصالی مختلف و گلیکوزآمینوگلیکان تخصص یافته‌ای که هیالورونات نام دارد می‌باشد. فراوان‌ترین پروتئین رشته‌ای در بافت پیوندی، کلاژن می‌باشد. رشته‌های الاستین لاستیک مانند که می‌توانند کشیده و آزاد گردند نیز در جایگاه‌های تغییر یابنده (مثل پوست، تاندون‌ها، قلب) وجود دارند. فیبرونکتین‌ها (خانواده‌ای از پروتئین‌های چند اتصالی ماتریکس) فیبریل‌های مجزایی در ماتریکس اکثر بافت‌های پیوندی تشکیل می‌دهند. اگرچه چندین نوع سلول در بافت‌های پیوندی یافت شده‌اند، اما بیشتر اجزاء مختلف ECM اکثراً توسط سلول‌هایی بنام **فیبروبلاست ها**[1] تولید می‌گردد.

کلاژن‌های فیبریلی، پروتئین‌های رشته‌ای اصلی در ECM بافت‌های پیوندی هستند

حدود ۹۰-۸۰ درصد کلاژن در بدن، شامل کلاژن‌های فیبریلی (تیپ‌های I، II و III) می‌باشد که اساساً در بافت‌های پیوندی وجود دارد (جدول ۴-۱۹). کلاژن تیپ I به دلیل اینکه در مقادیر زیاد در بافت غنی از تاندون از جمله دم موش موجود می‌باشند، به آسانی جداسازی شد و اولین کلاژنی بود که شناخته شد. واحد ساختمانی آن یک مارپیچ سه تایی بلند (۳۰۰nm)، باریک (قطر ۱/۵nm) (شکل ۱-۲۲) می‌باشد که حاوی دو زنجیره $\alpha 1$ (I) و یک زنجیره $\alpha 2$(I) است که هر کدام دارای طولی برابر با ۱۰۵۰ اسید آمینه هستند. مولکول‌های زنجیره سه تایی به صورت پلیمرهای منظم‌تری پیچ می‌خورند که فیبریل‌های کلاژن نام دارند و در حقیقت، غالباً به صورت دستجات بلندتری تجمع می‌یابند که فیبرهای کلاژن نام دارند (شکل ۲۴-۱۹).

دسته‌بندی‌های کلاژن که از لحاظ کمّی کوچکترند شامل کلاژن‌های مرتبط با فیبریل که در آن کلاژن‌های فیبریلی با هم و یا با سایر محتویات ECM متصل شده‌اند، کلاژن‌های تشکیل دهنده صفحه و کلاژن‌های لنگری که شبکه‌های دوبعدی در لامین پایه تشکیل (تیپ IV) داده و لامین پایه در پوست را به بافت پیوندی زیرین آن ها اتصال می‌دهند (تیپ VII). کلاژن‌های غشاگذر که به عنوان گیرنده‌های چسبندگی عمل می‌کنند (مثل BP180 در همی‌دسموزم‌ها) و کلاژن‌های دفاعی میزبان که به بدن در شناسایی و حذف عوامل بیماری‌زا کمک می‌کنند. جالب این است که چند نوع از کلاژن ها (مثل تیپ‌های XVIII و XV) نیز پروتئوگلیکان‌هایی هستند که به طور کووالان به GAGs ها اتصال یافته‌اند (جدول ۴-۱۹).

1- Fibroblasts

کلاژن فیبریلی به خارج از سلول ترشح شده و در آنجا به صورت فیبریل‌هایی آرایش می‌یابد

کلاژن‌های فیبریلی، پروتئین‌های ترشحی هستند که ابتدا توسط فیبروبلاست ها در ECM ساخته می‌شوند. بیوسنتز و ترشح کلاژن از مسیر عادی برای یک پروتئین ترشحی پیروی می‌کند که جزئیات دقیق آن در فصل‌های ۱۳ و ۱۴ شرح داده شده است. زنجیره‌های αکلاژن به صورت پیش سازهای بلندتر که زنجیره‌های پروα نامیده می‌شوند، توسط ریبوزوم‌های متصل به شبکه آندوپلاسمی (ER) سنتز می‌گردند. زنجیره‌های پرو α، تحت یک سری تغییرات کوالان قرار گرفته و به صورت مولکول‌های پروکلاژن مارپیچ سه تایی قبل از آنکه از سلول ها آزاد شوند تا می‌خورند (شکل ۱۹ـ۲۴).

پس از ترشح کلاژن از سلول، پپتیدازهای خارج سلولی، پروپپتیدهای N-ترمینال و C-ترمینال را برش می‌دهند. در کلاژن‌های فیبریلی، مولکول‌های ایجاد شده، که حاوی تقریباً تمام قسمت‌های یک مارپیچ سه زنجیره‌ای هستند، به طور جانبی بهم متصل می‌شوند تا فیبریل‌هایی با قطر ۵۰ـ۲۰۰nm را تشکیل بدهند. در فیبریل‌ها، مولکول‌های کلاژن مجاور هم، حدود ۶۷nm از هم فاصله دارند که چیزی حدود یک چهارم طول هر کدام است. این آرایش یک ساختار شیاردار تولید می‌کند که هم در تصاویر میکروسکوپ الکترونی و هم میکروسکوپ نوری از فیبریل‌های کلاژن به چشم می‌خورد. (شکل ۱۹ـ۲۴، تصویر کوچک). خصوصیات منحصربفرد کلاژن‌های رشته‌ای (مثل انواع I، II و III) اساساً در نتیجه تشکیل فیبریلهاست.

قطعات غیرمارپیچ سه تایی کوتاه در دو انتهای زنجیره‌های α کلاژن فیبریلی، اهمیت ویژه‌ای در تشکیل فیبریل‌های کلاژن دارد. زنجیره‌های جانبی لیزین و هیدروکسی لیزین در این قطعات توسط لیزین اکسیدازهای خارج سلولی دچار تغییر می‌شود تا آلدئیدهایی در موقعیت گروه آمین در انتهای زنجیره جانبی تشکیل بدهد. این گروه‌های آلدئید واکنش‌گر اتصالات عرضی کوالان با ریشه‌های لیزین، هیدروکسی لیزین و هیستیدین در مولکول‌های مجاور تشکیل می‌دهند. این اتصالات عرضی سبب پایداری مولکول‌های کلاژن که به صورت کنار - کنار به هم چسبیده‌اند می‌شود و یک فیبریل بسیار قوی را ایجاد می‌کند. حذف پروپپتیدها و اتصالات عرضی کوالان در فضای خارج سلولی رخ می‌دهد تا مانع از آرایش نامناسب فیبریل‌های کلاژن در داخل سلول شود.

تغییرات پس از ترجمه زنجیره‌های پروα برای تشکیل مولکول‌های کلاژن بالغ و آرایش آن ها به صورت فیبریل، حیاتی است. نقص در این تغییرات، نتایج حادی را به بار می‌آورد. به عنوان مثال، اسید آسکوربیک (ویتامین C) یک کوفاکتور ضروری برای هیدروکسیلازهای مسئول اضافه کردن گروه‌های هیدروکسیل به ریشه‌های پرولین و لیزین در زنجیره‌های پرو α محسوب می‌شود. وقتی که ذخیره آسکوربات سلول ها تخلیه می‌شود و بیماری اسکوروی[1] ایجاد می‌شود، زنجیره‌های پرو α به میزان مناسب برای تشکیل مارپیچ سه گانه پروکلاژن پایدار در درجه حرارت نرمال بدن هیدروکسیله نمی‌شوند و پروکلاژنی که تشکیل می‌شود نمی‌تواند به صورت فیبریل‌های نرمال آرایش یابد. بدون حمایت ساختمانی کلاژن، رگ‌های خونی، تاندون ها و پوست شکننده می‌شوند. مصرف میوه تازه در رژیم غذایی می‌تواند میزان کافی ویتامین C را به منظور تشکیل کلاژن عادی، فراهم سازد. از لحاظ تاریخی، ملوانان بریتانیایی به منظور جلوگیری از اسکوروی با مقادیر کافی از لیمو در رژیم غذایی تغذیه می‌شدند و این امر منجر به این شد که آن ها این بیماری را "Limeys" بنامند. بروز جهش‌هایی در ژن هیدروکسیلاز نیز می‌تواند منجر به نقایص بافت پیوندی شود.

کلاژن‌های تیپ I و II برای تشکیل ساختارهای متنوع به کلاژن‌های غیرفیبریلی اتصال می‌یابند.

کلاژن ها از لحاظ ساختمان‌های فیبرهایی که آن ها را تشکیل می‌دهند و چگونگی سازمانیابی این فیبرها به شکل شبکه‌ها، با هم متفاوت می‌باشند. انواع غالب کلاژن ها در بافت‌های پیوندی یافت می‌شوند که شامل تیپ کلاژن I است که رشته‌های بلند تشکیل می‌دهد. در حالی که شبکه‌های تیپ کلاژن II غالباً شبکه‌های تورمانندی را تشکیل می‌دهند. به عنوان مثال در تاندون‌ها، رشته‌های بلند کلاژن تیپ I، ماهیچه ها را به استخوان ها پیوند می‌دهند و باید نیروهای زیادی را تحمل نمایند. به دلیل آنکه رشته‌های کلاژن تیپ I کلاژن دارای نیروی کشسانی زیادی هستند تاندون ها می‌توانند بدون آن‌که پاره شوند، تحت کشش قرار گیرند. با این حال، از لحاظ گِرَمی، یک گرم کلاژن تیپ I قویتر از یک گرم فولاد است.

دو نوع کلاژن که از لحاظ کمّی در مقادیر کمی هستند، تیپ

1- Scurvy

V و XI می‌باشد که با هم به صورت رشته‌هایی همراه با کلاژن تیپ I آرایش می‌یابند و به این ترتیب ساختارها و ویژگی‌های رشته ها را تنظیم می‌کنند. به عنوان مثال، تشکیل کلاژن تیپ V، باعث ایجاد فیبرهایی با قطر کمتر می‌شود.

فیبریل‌های کلاژن تیپ I، همچنین به عنوان میله‌های استحکام‌بخشی در ساختمان استخوان به کار می‌روند. استخوان ها و دندان ها به این دلیل سخت و محکم هستند که حاوی مقادیر زیادی از دالیت[1]، یک ماده معدنی حاوی کلسیم کریستالی و فسفات هستند. در اکثر استخوان ها حدود ۷۰ درصد مواد معدنی و ۳۰٪ پروتئین که بخش اعظم آن را کلاژن تیپ I تشکیل داده است، وجود دارد. استخوان ها زمانی تشکیل می‌شوند که سلول‌های ویژه‌ای (کندروسیت ها و استئوبلاست‌ها) فیبریل‌های کلاژنی را ترشح کنند که سپس توسط رسوب کریستال‌های کوچک دالیت، مینرالیزه می‌شوند.

در اکثر بافت‌های پیوندی، خصوصا ماهیچه‌های اسکلتی، کلاژن تیپ VI و پروتئوگلیکان ها به صورت غیرکوالان به کناره‌های فیبریل‌های تیپ I متصل می‌شوند و ممکن است فیبریل ها به هم متصل شوند تا فیبرهای ضخیم‌تر کلاژن را تشکیل بدهند (شکل ۱۹ـ۲۵a). کلاژن تیپ VI شکلی غیرمعمول دارد زیرا مولکول حاوی یک مارپیچ سه تایی نسبتاً کوتاه است که دارای دُمین‌های کروی در هر دو انتهای خود می‌باشد. اتصال جانبی دو منومر تیپ VI، یک دیمر «غیرهمسو» را ایجاد می‌کند. اتصال انتها به انتهای این دیمر ها توسط دُمین‌های کروی‌شان سبب ایجاد «میکروفیبریل‌های» تیپ VII می‌شود. این میکروفیبریل ها دارای یک ظاهر دانه‌دار روی یک زنجیره هستند که نواحی مارپیچی سه تایی با طول ۶۰nm توسط دُمین‌های کروی به طول ۴۰nm از هم جدا شده‌اند.

فیبریل‌های کلاژن تیپ II، مهمترین کلاژن در غضروف، قطری کمتر از فیبریل‌های تیپ I دارند و در ماتریکس پروتئوگلیکانی چسبنده به صورت تصادفی جهت‌گیری کرده‌اند. فیبریل‌های محکم کلاژن سبب استحکام ماتریکس شده و به آن این امکان را می‌دهد که در مقابل عوامل از بین برنده شکل، مقاومت نماید. فیبریل‌های تیپ II توسط کلاژن تیپ IX که کلاژن متصل به فیبریل دیگری است، به پروتئوگلیکان‌های ماتریکس اتصال می‌یابد. کلاژن تیپ IX و چند نوع مرتبط دیگر دارای دو یا سه قطعه مارپیچ سه تایی هستند که توسط خمش‌های انعطاف‌پذیر و یک قطعه کروی در N-ترمینال بهم متصل شده‌اند (شکل ۱۹ـ۲۵b). قطعه کروی N-ترمینال در کلاژن تیپ IX، حاوی فیبریل‌هایی در انتهای یکی از قطعات مارپیچی خود است که دارای یک زنجیره GAG می‌باشد که گاهی مواقع به یکی از زنجیره‌های تیپ IX اتصال می‌یابد. به نظر می‌رسد که این نواحی غیرمارپیچی بیرون زده، سبب لنگراندازی فیبریل تیپ II روی پروتئوگلیکان ها و سایر اجزای ماتریکس می‌شوند. ساختمان مارپیچ سه گانه مقطوع در تیپ IX و کلاژن‌های مرتبط، مانع از این می‌شود که آن ها به صورت فیبریل ها آرایش یابند، گرچه آن ها می‌توانند با فیبریل‌هایی که از سایر انواع کلاژن ها تشکیل شده‌اند متصل شده و با آن ها اتصالات عرضی کوالان برقرار سازند.

جهش‌هایی که روی کلاژن تیپ I و پروتئین‌های وابسته به آن اثر می‌گذارند سبب ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی می‌شوند. جهش‌های خاص در ژن‌های کدکننده زنجیره‌های $\alpha1(I)$ یا $\alpha2(I)$ کلاژن تیپ I ، منجر به استئوژنز ایمپرفکتا[2] یا بیماری استخوان شکننده می‌شود. به دلیل آنکه سومین موقعیت ها در زنجیره α کلاژن باید یک گلایسین باشد تا مارپیچ سه تایی شکل بگیرد (شکل ۱۹ـ۲۲) جهش‌هایی که منجر به تعویض گلایسین با هر اسید آمینه دیگر می‌شوند، زیان آور بوده و منجر به تشکیل بسیار ضعیف مارپیچ ها و ناپایداری آن ها می‌شود. تنها یکی از زنجیره‌های معیوب α از سه زنجیره مولکول کلاژن می‌تواند کل ساختمان مارپیچ سه تایی مولکول و عملکرد آن را از بین ببرد. یک جهش در یک کپی تنها (آلل) از ژن دیگر $\alpha1(I)$ یا $\alpha2(I)$ که روی یکی از کروموزم‌های غیرجنسی (آتوزوم‌ها) قرار گرفته‌اند می‌تواند منجر به این ناهنجاری ها گردد. بنابراین غالباً الگوی غیرتوارثی اتوزمال بارز را نشان می‌دهد.

نبود یا عملکرد نادرست میکروفیبریل‌های متصل به فیبریل کلاژن در بافت ماهیچه درنتیجه بروز جهش‌هایی در ژن‌های کلاژن تیپ VI، سبب ایجاد دیستروفی‌های ماهیچه‌ای مادرزادی غالب یا مغلوب می‌شود که دربرگیرنده نقایصی از جمله ضعف عمومی ماهیچه، ناکارآمدی دستگاه تنفسی، تحلیل ماهیچه و ناهنجاری‌های مفصلی مرتبط با ماهیچه می‌باشد. ناهنجاریهای پوستی نیز به همراه بیماری‌های ناشی از کلاژن تیپ VI گزارش شده است.

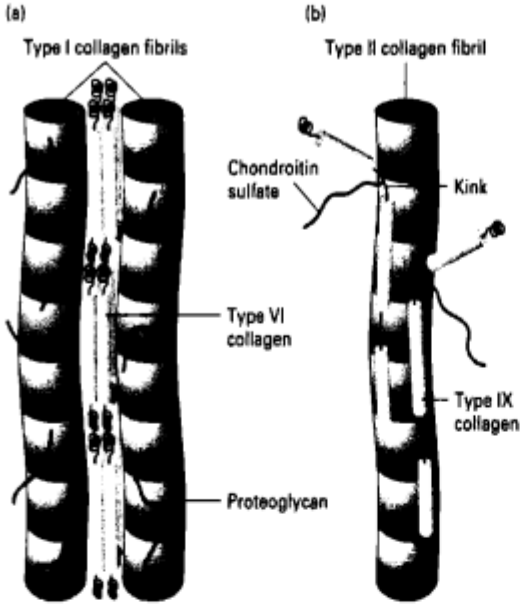
1- Dahllite

2- Osteogeneisis imperfecta

پروتئوگلیکان ها و GAGsهای تشکیل دهنده آن ها نقش‌های مختلفی را در ECM ایفامی‌کنند

همانطور که در مورد پرلکان در لامین پایه دیدیم، پروتئوگلیکان ها نیز نقش مهمی را در چسبندگی سلول ECM ایفا می‌کنند. پروتئوگلیکان‌ها، زیردسته‌ای از گلیکوپروتئین‌های ترشحی یا متصل به سطح سلول هستند که حاوی زنجیره‌های پلی ساکاریدی اختصاصی هستند که به صورت کوالان اتصال یافته‌اند و **گلیکوزآمیوگلیکان‌ها**[1] (GAGs) نام دارند. GAGsها، پلیمرهای بلندخطی از دی ساکاریدهای تکرار شونده اختصاصی هستند. معمولاً یک قند، اسید اورونیک (D- گلوکورونیک اسید یا L- ایدورونیک اسید) یا D-گالاکتوز می‌باشد و قند دیگر N-استیل گلوکز آمین یا N- استیل گالاکتوز آمین می‌باشد (شکل ۲۶ـ۱۹). یک یا هر دو قند حاوی دست کم یک گروه آنیونی (کربوکسیلات یا سولفات) است. بنابراین هر زنجیره GAG دارای بارهای منفی زیادی می‌باشد. GAGs ها براساس ماهیت واحد دی ساکاریدی تکرار شونده‌شان به چند نوع اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: هپاران سولفات، کندروئیتین سولفات، درماتان سولفات، کراتان سولفات و هیالورونات. یک شکل هیپرسولفاته از هپاران سولفات، هپارین نام دارد و اغلب توسط ماست سل ها تولید می‌شود که نقش اساسی در واکنش‌های آلرژیک داشته و از لحاظ بالینی نیز به عنوان ضدانعقاد استفاده می‌شود، زیرا دارای توانایی فعال‌سازی یک مهارکننده طبیعی لخته ساز بنام آنتی‌ترومبین III است.

تمامی GAGsهای اصلی، طبیعتاً به عنوان اجزاء پروتئوگلیکان ها محسوب می‌شوند. همانند سایر گلیکوپروتئین‌های ترشحی و غشاگذر، پروتئین‌های هسته پروتئوگلیکان روی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند (فصل ۱۳). زنجیره‌های GAG روی هسته ها در کمپلکس گلژی آرایش می‌یابند. به منظور تشکیل زنجیره‌های هپاران یا کندروئیتین سولفات، در ابتدا یک «اتصال‌گر» سه قندی به زنجیره‌های جانبی هیدروکسیل ریشه‌های سرین اختصاصی در یک هسته پروتئینی متصل می‌شود؛ بنابراین اتصال‌گر یک **اولیگوساکارید با اتصال O**[2] می‌باشد (شکل ۲۷ـ۱۹a). برعکس، اتصال گرهایی که زنجیره‌های کراتان سولفات را اضافه می‌کنند، زنجیره‌های اولیگوساکاریدی هستند که به ریشه‌های آسپاراژین اتصال می‌یابند؛ همچنین این **اولیگوساکاریدهای با اتصال N-**[3] در اکثر گلیکوپروتئین ها وجود دارند (فصل ۱۴)، اگرچه تنها یک زیردسته حاوی زنجیره‌های GAG هستند. تمامی زنجیره‌های GAG توسط اضافه شدن مکرر منومرهای قندی طویل می‌شوند



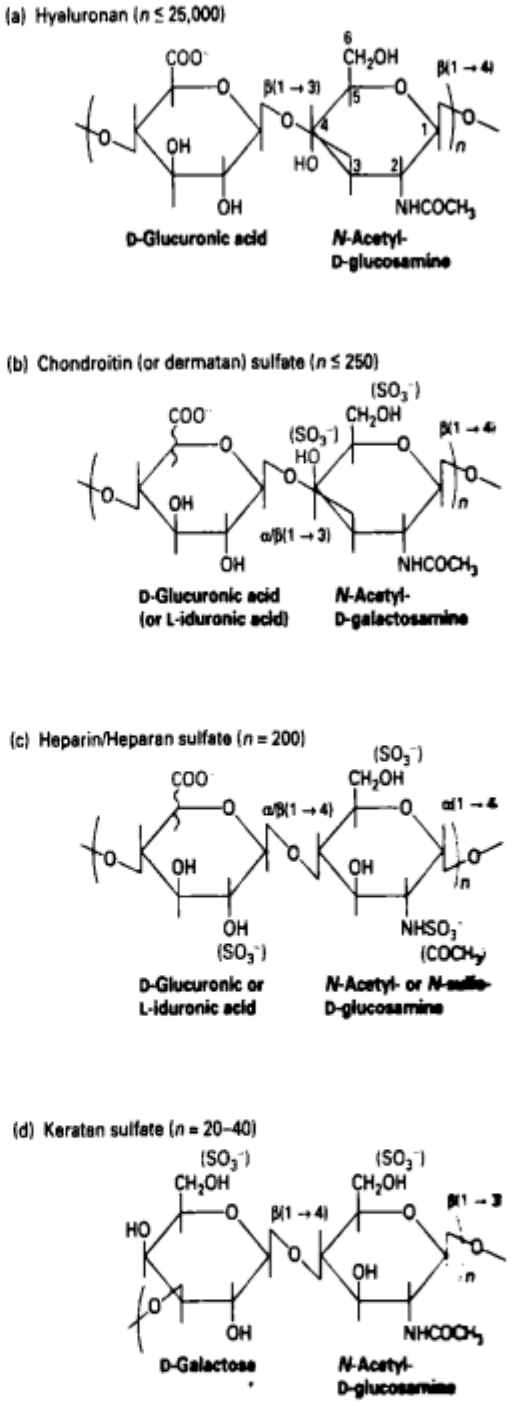
▲ **شکل ۲۵ـ۱۹ برهمکنش‌های کلاژن‌های رشته‌ای با کلاژن‌های غیررشته‌ای وابسته به فیبریل.** (a) در تاندون‌ها، فیبریل‌های تیپ I همگی در جهت فشارهایی که به تاندون وارد می‌شوند، قرار گرفته‌اند. پروتئوگلیکان ها و کلاژن تیپ VI، به صورت غیرکوالان به فیبریل ها متصل شده و سطح را می‌پوشاند. میکروفیبریل‌های کلاژن تیپ VI که حاوی قطعات کروی و مارپیچی سه گانه هستند، به فیبریل‌های تیپ I متصل شده و آن ها را به هم متصل می‌کند تا فیبرهای ضخیم‌تری را تشکیل بدهند. (b) در غضروف، مولکول‌های کلاژن تیپ IX به صورت کوالان و در فواصل منظم به فیبریل‌های تیپ II متصل می‌شود. یک زنجیره کندروئیتین سولفات به طور کوالان به زنجیره (IX) $\alpha 2$ در خمش انعطاف‌پذیر متصل شده که مانند ناحیه کروی N-ترمینال به سمت خارج از فیبریل جهت‌گیری کرده است.

به استثنای هیالورونات که در پایین شرح داده شده است، که این منومر ها تکرارهای دی ساکاریدی مربوط به یک GAG ویژه را تشکیل می‌دهند؛ زنجیره ها اغلب نهایتاً توسط اتصال کوالان مولکول‌های کوچک از قبیل سولفات تغییر می‌یابند. مکانیسم‌های مسئول تشخیص اینکه کدام پروتئین ها با GAGs ها تغییر یابند، چه توالی الیگوساکاریدی باید افزوده شود، کدام جایگاه ها باید سولفاته گردند و طول GAG، هنوز نامشخص هستند. نسبت پلی

1- Glycosaminoglycans

2- O-Linked Oligosaccharide

3- N-Linked Oligosaccharide



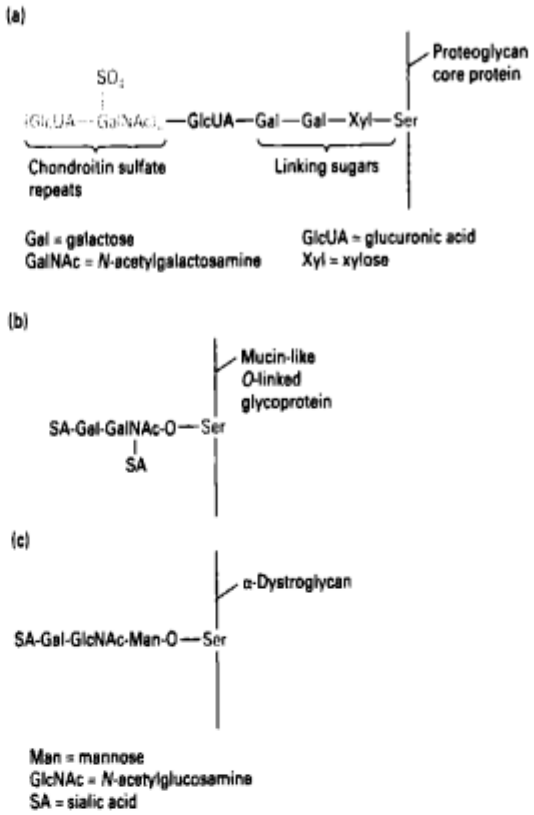
◀ **شکل ۲۶-۱۹ دی ساکاریدهای تکراری گلیکوزآمینو گلیکان ها (GAGs)، اجزاء پلی ساکاریدی پروتئوگلیکان ها هستند.** هر کدام از چهار کلاس GAGs‌ها، توسط پلیمریزاسیون واحدهای منومری به صورت تکرارهایی از یک دی ساکارید ویژه شکل می‌گیرند و نهایتاً تغییر می‌یابند که این تغییرات شامل اضافه شدن گروه‌های سولفات و دگرگون شدن (ایی مریزاسیون) گروه کربوکسیل روی کربن ۵ D- گلوکورونیک اسید و تبدیل آن به اسید L-ایدورونیک است. هپارین توسط هیپرسولفاته شدن هپاران سولفات ایجاد می‌شود، در حالی که هیالورونان غیرسولفاته است. تعداد (n) دی ساکارید ها که معمولاً در هر زنجیره گلیکوزآمینو گلیکان یافت می‌شود نیز نشان داده شده است. خطوط ماربیچ نشاندهندهٔ پیوندهای کوالانسی هستند که یا در بالا (D- گلوکورونیک اسید) یا در پائین (L- ایدورونیک اسید) حلقه قرار گرفته است.

زنجیره ها نیز می‌تواند عملکرد آن ها و پروتئوگلیکان‌های محتوی آن ها را مشخص سازد. به عنوان مثال، گروه‌بندی قندهای تغییریافته خاص در زنجیره‌های GAG پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات می‌تواند اتصال فاکتورهای رشد به گیرنده‌های ویژه را کنترل نموده و یا سبب تنظیم فعالیت پروتئین ها در آبشار انعقاد خون گردد.

برای سال‌های زیادی، پیچیدگی شیمیایی و ساختمانی پروتئوگلیکان ها به عنوان سد عظیمی مانع از بررسی ساختار آن ها و فهم عملکردهای متنوع آن ها شده بود. در سال‌های اخیر، محققان تکنیک‌های قدیمی بیوشیمیایی (مثل کروماتوگرافی مایع موئینه با فشار زیاد)، اسپکترومتری جرمی و ژنتیک را به منظور روشن نمودن جزئیات ساختاری و عملکردی این مولکول‌های منحصربفرد ECM، به کار گرفته‌اند. نتایج حاصل از این مطالعات در حال پیشرفت این است که دسته‌های توالی‌های ریشه‌های قندی در کل دارای تغییرات بیشتری نسبت به توالی‌های منحصربفرد مجزا هستند و این موضوع، مسئول اختصاصی کردن عملکردهای GAGهای مجزا از هم می‌باشد. یک نمونه از این موضوع، دسته‌ای از توالی‌های ریشه‌های پنج تایی (پنتاساکارید) است که در یک زیردسته از GAGهای هپارین یافت شده است و سبب کنترل فعالیت آنتی‌ترومبین (ATIII) III (یک مهارکننده پروتئاز کلیدی در انعقاد خون که ترومبین می‌باشد) می‌گردد.

زمانی که این توالی‌های پنتاساکاریدی در هپارین در دو موقعیت ویژه سولفاته شوند، هپارین می‌تواند ATIII را فعال کرده و بنابراین تشکیل لخته را مهار سازد (شکل ۲۸-۱۹). چندین سولفات دیگر

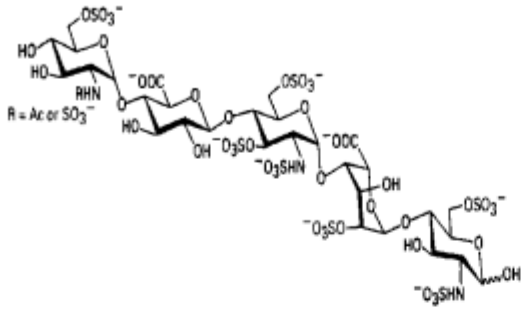
ـ کـ ـ ـ



▲ **شکل ۱۹ـ۲۷ پلی ساکاریدهای متصل به هیدروکسیل (-O).**

(a) سنتز یک گلیکوزآمینوگلیکان (GAG). در این مورد، کندروئیتین سولفات، توسط انتقال یک ریشه گزیلوز به یک ریشه سرین در هسته پروتئینی آغاز می‌شود که به احتمال زیاد در کمپلکس گلژی انجام می‌گیرد و سپس توسط افزوده شدن دو ریشه گالاکتوز ادامه می‌یابد. سپس ریشه‌های گلوکورونیک اسید و N-استیل گالاکتوز آمین به طور متوالی به این زنجیره‌های اتصال یافته اضافه می‌شوند و زنجیره کندروئیتین سولفات را تشکیل می‌دهند. زنجیره‌های هپاران سولفات به وسیله اتصال‌گرهای سه قندی یکسانی به پروتئین‌های هسته‌ای اتصال می‌یابند. (b) زنجیره‌های با اتصال نوع -O تیپ موسین توسط یک منوساکارید N-استیل گالاکتوز آمین (GalNAc) که به صورت کوالان به طیف وسیعی از قندهای دیگر اتصال یافته است، به صورت کوالان به گلیکوپروتئین ها اتصال می‌یابد. (c) اولیگوساکاریدهای با اتصال -O تخصص یافته ویژه، از قبیل آنهایی که در پروتئین دیستروگلیکان یافت می‌شوند توسط منوساکاریدهای مانوز (Man) به پروتئین ها اتصال می‌یابند.

می‌توانند در ترکیبات مختلف پنتاساکارید فعال قرار گیرند، اما آن ها برای فعالیت ضدانعقادی هپارین ضروری نیستند. دلیل تشکیل دسته‌های توالی‌های فعال مشابه نسبت به یک توالی منحصربفرد

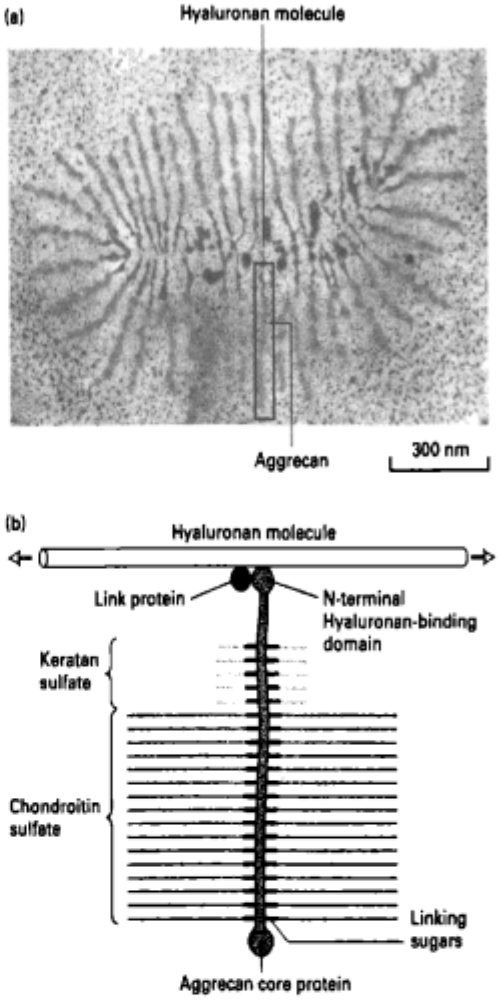


▲ **شکل ۱۹ـ۲۸ (شکل رنگی) توالی پنتاساکاریدی GAG که فعالیت آنتی ترومبین III(ATIII) را تنظیم می‌کند.** دسته‌های توالی‌های تغییریافته پنج ریشه‌ای در GAGهای بلندتر که هپارین نامیده می‌شود به همراه موقعیت‌شان که در اینجا نشان داده شده است به ATIII متصل شده و آن را فعال می‌کند بنابراین مانع انعقاد خون می‌شود. گروه‌های سولفات در نوع قرمز، برای این عملکرد هپارین ضروری می‌باشد. تغییرات صورت گرفته روی نوع آبی، ممکن است وجود داشته باشد اما ضروری نیست. سایر دسته‌های توالی‌های GAG تغییر یافته به نظر می‌رسد که فعالیت سایر پروتئین‌های هدف را تنظیم می‌کنند.

واحد و مکانیسم‌های کنترل‌کننده مسیرهای بیوسنتزی GAG، امکان تشکیل چنین توالی‌های فعالی، هنوز مشخص نشده است.

تنوع پروتئوگلیکان‌ها

پروتئوگلیکان ها یک گروه متنوع از مولکول ها را تشکیل می‌دهند که در ماتریکس خارج سلولی تمام بافت‌های حیوانی به میزان زیادی وجود دارند و نیز در سطح سلول بیان می‌شوند. به عنوان مثال، از پنج کلاس اصلی پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات، سه تا در ماتریکس خارج سلولی وجود دارند (پرلکان، اگرین و کلاژن تیپ XVIII) و دو تای دیگر جزو پروتئین‌های سطح سلول هستند. دوتای آخری شامل پروتئین‌های اینتگرال غشایی (سین دکان‌ها) و پروتئین‌های با لنگر GPI (گلی پیکان‌ها) می‌باشد؛ زنجیره‌های GAG در هر دو نوع از پروتئوگلیکان‌های سطح سلول در داخل فضای خارج گسترش یافته‌اند. توالی ها و طول پروتئین‌های هسته‌ای پروتئوگلیکان به میزان قابل توجهی تغییر می‌کنند و تعداد زنجیره‌های GAG متصل در محدوده‌ای کمی بیش از ۱۰۰ تاست. از این گذشته یک پروتئین هسته‌ای اغلب به دو نوع زنجیره متفاوت GAG اتصال یافته و یک پروتئوگلیکان «هیبرید»



▲ **شکل ۲۹ـ۱۹ ساختمان پروتئوگلیکان تجمع یافته در غضروف.** (a) میکروگراف الکترونی یک اگریکان که از غضروف اپی فیزی جنین گاو استخراج شده است. پروتئین‌های هسته‌ای اگریکان در فواصل ۴۰nm به یک مولکول هیالورونات متصل می‌شوند. (b) تصویر شماتیک از یک منومر اگریکان به هیالورونات متصل شده است. در اگریکان هم زنجیره‌های کراتان سولفات و هم کندروئتین سولفات به پروتئین هسته‌ای اتصال یافته‌اند. دُمین N-ترمینال هسته پروتئینی به صورت غیرکوالان به یک مولکول هیالورونات متصل می‌شود. این اتصال توسط یک پروتئین اتصالی که هم به مولکول هیالورونات و هم به پروتئین هسته‌ای اگریکان اتصال می‌یابد، تسهیل می‌شود. هر پروتئین هسته‌ای اگریکان دارای ۱۲۷ توالی Ser-Gly است که در زنجیره‌های GAG اضافه می‌شوند. متوسط وزن مولکولی یک منومر اگرکان تقریباً ۲×۱۰^{۶} است. کل این تجمع که ممکن است حاوی بیش از ۱۰۰ منومراگریکان باشد دارای وزن مولکولی بیش از ۲×۱۰^{۶} است و اندازه آن به بزرگی یک باکتری E.coli می‌باشند.

تولید می‌کند. پروتئین لامین پایه پرلکان در ابتدا یک پروتئوگلیکان هپاران سولفات (HSPG) است که دارای سه تا چهار زنجیره GAG است. اگرچه گاهی می‌تواند دارای یک زنجیره کندروئیتین سولفات متصل شده نیز باشد. تنوع زیاد پروتئوگلیکان ها بسته به تعداد زنجیره‌ها، موقعیت‌شان و توالی GAGsهای متصل به سایر پروتئین‌های هسته‌ای مشابه می‌تواند به میزان زیادی تغییر یابد. تولید آزمایشگاهی مگس سرکه، کرم حلقوی و موش‌های جهش یافته‌ای که دارای نقص در تولید پروتئوگلیکان ها هستند و بررسی آنها، به روشنی نشان می‌دهد که پروتئوگلیکان ها نقش‌های اساسی در تکوین دارند. آنها به احتمال زیاد به عنوان تنظیم کنندگان مسیرهای پیام رسانی متفاوت عمل می‌کنند.

سین دکان‌ها[1]، پروتئوگلیکان ها سطح سلولی هستند که توسط سلول‌های اپی‌تلیال و غیر اپی‌تلیالی بیان شده و به کلاژن ها و پروتئین‌های ماتریکس چنداتصالی (مثل فیبرونکتین) اتصال یافته و سبب لنگراندازی سلول ها روی ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. همانند اکثر پروتئین‌های اینتگرال غشایی، دُمین سیتوزولی سین دکان با اکتین اسکلت سلولی و در برخی موارد با مولکول‌های تنظیم‌کننده داخل سلولی برهمکنش می‌کند. به علاوه، پروتئوگلیکان‌های سطح سلولی مشابه سین دکان به اکثر فاکتورهای رشد پروتئینی و سایر مولکول‌های پیام رسانی خارجی دیگر اتصال یافته و به این ترتیب به تنظیم متابولیسم و عملکرد سلول کمک می‌نماید. به عنوان مثال، سین دکان‌های موجود در ناحیه هیپوتالاموس مغز، رفتار تغذیه‌ای را در پاسخ به گرسنگی تنظیم می‌کند. آن ها این عمل را توسط مشارکت در اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی پپتیدهای ضدسیری که به کنترل گرسنگی کمک می‌کنند انجام می‌دهند. در وضعیت سیری، دُمین خارج سلولی سین دکان که با زنجیره‌های هپاران سولفات آراسته شده است توسط پروتئولیز از سطح سلول آزاد می‌گردد و بنابراین فعالیت پپتیدهای ضدسیری و رفتار غذا خوردن را سرکوب می‌کند. در موش مهندسی شده که ژن سین دکان-۱ را به میزان زیادی در ناحیه هیپوتالاموس مغز و سایر بافت ها سنتز می‌کند، کنترل عادی غذا خوردن توسط پپتیدهای ضدسیری از بین رفته و حیوانات به میزان زیادی غذا خورده و چاق می‌شوند.

1- Syndecans

هیالورونان با جلوگیری از ایجاد تراکم، مهاجرت سلولی را تسهیل کرده و به غضروف ویژگی شبه ژل بودن می‌بخشد

هیالورونان[1] که هیالورونیک اسید (HA) یا هیالورونات هم نامیده می‌شود، یک GAG غیرسولفاته است (شکل ۱۹-۲۶a) که توسط یک آنزیم متصل به غشای پلاسمایی (HA سنتاز) سنتز شده و مستقیماً به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود. (یک بررسی مشابه نیز توسط استفاده از سلول‌های گیاهی برای ساختن ECM محتوی سلولزشان انجام گرفته است). HA یک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی است که سلول‌های در حال مهاجرت و در حال تکثیر را در بر گرفته و به طور اختصاصی در بافت‌های جنینی یافت می‌شود. به علاوه، هیالورونان چارچوبی را ایجاد می‌کند که پروتئوگلیکان‌های ویژه روی آن تجمع می‌یابند و در اکثر ماتریکس‌های خارج سلولی بویژه غضروف یافت می‌شود. به دلیل ویژگی‌های فیزیکی برجسته آن، هیالورونان سبب سختی و ارتجاعیت و نرمی اکثر انواع بافت‌های پیوندی از جمله مفاصل می‌گردد.

طول مولکول‌های هیالورونان که دارای تعداد کمی از دی ساکاریدهای تکراری است ۲۵۰۰۰ می‌باشد. هیالورونان معمول در مفاصل از قبیل آرنج دارای ۱۰۰۰۰ تکرار در یک جرم کلی ۴×۱۰^{۶}Da و طول $۱۰^{۹}$ (محدوده قطر یک سلول کوچک) می‌باشد. قطعات مجزای مولکول هیالورونان به صورت ساختمان فضایی میله مانند پیچ می‌خورند. زیرا اتصالات β گلیکوزیدی میان قندها و پیوندهای گسترده هیدروژنی درون زنجیره‌ای به میزان زیادی در آن ها وجود دارد. رانش متقابل میان گروه‌های کربوکسیلات دارای بار منفی که آن ها را در فواصل منظم به سمت خارج نگه می‌دارد نیز در ایجاد این ساختارهای محکم شرکت می‌کند. به طور کلی، هیالورونان به بلندی و سختی کلاژن فیبریلی نمی‌باشد و نسبت به آن در محلول بسیار انعطاف‌پذیر است و دارای خمش و پیچش زیادی است که آن را در ساختمان فضایی‌های متعددی قرار داده و یک مارپیچ تصادفی تشکیل می‌دهد.

به دلیل تعداد زیاد ریشه‌های آنیونی روی سطح آن، یک مولکول هیالورونان معمول به مقادیر زیادی آب متصل شده و اگر به صورت یک کره هیدراته بزرگ درآید، قطرش ≈۵۰۰nm می‌شود. همانطور که غلظت هیالورونان افزایش می‌یابد، زنجیره‌های بلند، پیچیده و یک ژل چسبنده تشکیل می‌دهند. حتی در غلظت‌های پایین، هیالورونان نیز یک ژل هیدراته را تشکیل می‌دهد؛ زمانی که در یک محیط محبوس شده از قبیل یک ماتریکس میان دو سلول قرار گیرد، مولکول‌های هیالورونان بلند به طرف خارج کشیده می‌شوند. این فشار به سمت خارج، یک تورم یا فشار تورگور[2] را داخل فضای خارج سلولی ایجاد می‌کند. به علاوه، اتصال کاتیون‌های ویژه به گروه‌های COO^- موجود در سطح هیالورونان، غلظت یون ها را افزایش داده و بنابراین سبب ایجاد فشار اسموتیک در ژل می‌گردد. در نتیجه، مقادیر زیادی از آب به داخل ماتریکس کشیده می‌شود و در افزایش فشار تورگور شرکت می‌کند. این نیروی وَرَمی به بافت‌های پیوندی این توانایی را می‌دهد که در مقابل نیروهای فشاری مقاومت نمایند و این عمل آن مخالف عملکرد فیبرهای کلاژن است که در برابر نیروهای کششی مقاومت می‌کنند.

هیالورونان به سطح اکثر سلول‌های در حال مهاجرت اتصال می‌یابد که این اتصال توسط تعداد زیادی از گیرنده‌های چسبندگی (مثل یک نوع آن که CD44 نام دارد) انجام می‌شود که حاوی دُمین‌های اتصال به HA هستند و هر کدام دارای یک ساختمان فضایی سه بعدی مشابه هستند. به دلیل طبیعت شل، هیدراته و متخلخل هیالورونان که به صورت «پوششی» به سلول ها چسبیده است، به نظر می‌رسد که سلول ها را دور از هم نگه می‌دارد و به آنها اجازه می‌دهد که آزادانه حرکت کنند و تکثیر شوند. توقف حرکت سلولی و شروع اتصالات سلول - سلول، غالباً مرتبط با کاهشی در میزان هیالورونان، کاهش مولکول‌های سلولی متصل به HA و افزایش آنزیم هیالورونیداز خارج سلولی که هیالورونان ماتریکس را تجزیه می‌کند، می‌باشد. این اعمال هیالورونان خصوصا زمانی مهم است که اکثر سلول ها مهاجرت می‌کنند و هیالورونان تمایز آن ها را تسهیل می‌کند و در زمان رهاسازی یک سلول تخم (اووسیت) پستانداران از سلول‌های احاطه‌کننده‌اش پس از تخمک‌گذاری نیز نقش مهمی ایفا می‌کند.

پروتئوگلیکان غالب در غضروف، اگریکان نام دارد که به همراه هیالورونان به صورت تجمعات بسیار بزرگ آرایش می‌یابند که نشانه ساختارهای پیچیده‌ای است که گاهی اوقات پروتئوگلیکان ها تشکیل می‌دهند. چارچوب تجمعات پروتئوگلیکان غضروف، مولکول طویلی از هیالورونان است که چندین مولکول اگریکان به صورت محکم ولی غیرکوالان به آن اتصال یافته است (شکل ۱۹-۲۹a). یک تجمع اگریکانی واحد، یکی از بزرگترین کمپلکس‌های ماکرومولکولی شناخته شده، می‌تواند بیش از ۴nm طول و حجمی بیشتر از یک سلول باکتریایی کسب کند. این تجمعات به غضروف ویژگی‌های منحصر به فرد شبه ژل بودن و مقاومت آن در برابر بدشکلی ها را

1- Hyaluronan 2- Turgor pressure

می‌دهد که این امر ضرورتاً در مفاصلی که نیروی وزن را تحمل می‌کنند دیده می‌شود.

پروتئین هسته‌ای اگریکان (جرم مولکولی ۲۵۰۰۰۰) دارای یک دُمین کروی N-ترمینال است که با تمایل بالا به یک توالی دی‌ساکاریدی خاص در داخل هیالورونان اتصال می‌یابد. این توالی اختصاصی توسط تغییرات کوالان برخی از دی ساکاریدهای تکراری در زنجیره‌های هیالورونان به وجود آمده است. برهمکنش میان اگریکان و هیالورونان توسط یک پروتئین اتصالی که هم به پروتئین هسته اگریکان و هم به هیالورونان متصل می‌شود، تسهیل می‌گردد (شکل ۱۹ـ۲۹b). اگریکان و پروتئین اتصالی عموماً دارای یک دُمین «اتصالی» با طول ≈۱۰۰ اسیدآمینه می‌باشد که در تعداد بیشماری از پروتئین‌های ماتریکس و پروتئین‌های سطح سلولی متصل شونده به هیالورونان در بافت‌های غضروفی و غیرغضروفی یافت می‌شود. تقریباً تمامی این پروتئین‌های ویژه از لحاظ تکاملی از یک ژن واجد اجدادی منشا گرفته‌اند که فقط این دُمین را کد می‌کند.

فیبرونکتین‌ها، سلول ها و ماتریکس را به هم متصل کرده و روی شکل، تمایز و جابجایی سلول تأثیر می‌گذارند

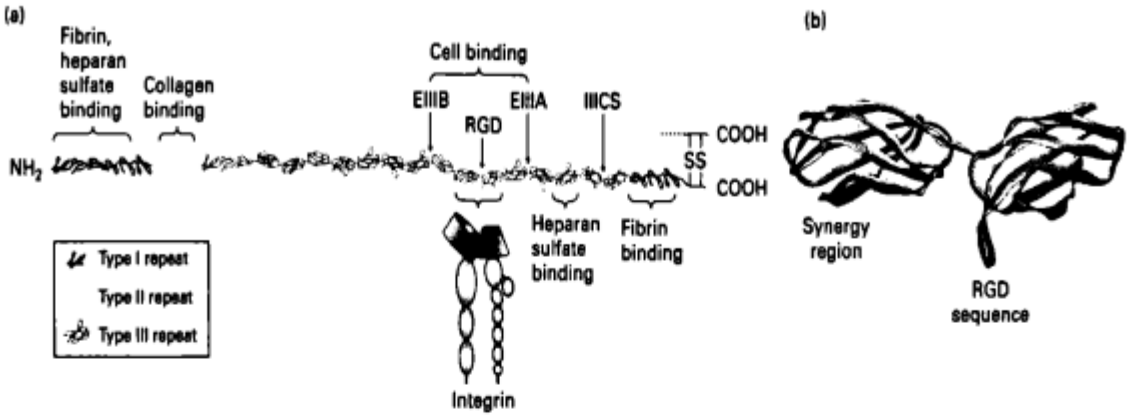
بسیاری از انواع مختلف سلول ها فیبرونکتین[1] را که یک پروتئین چنداتصالی ماتریکس بوده و به وفور در تمامی مهره داران یافت می‌شود سنتز می‌کنند. کشف این مطلب که فیبرونکتین به عنوان یک مولکول چسبندگی عمل می‌کند ناشی از مشاهده آن ها در سطح سلول‌های فیبروبلاست سالم است که این سلول ها به طور محکم به پتریدیش‌ها (ظروف کشت سلول) در تحقیقات آزمایشگاهی متصل می‌شدند اما در غیاب فیبرونکتین در سطح سلول‌های سرطانزا (مثل سرطان‌ها)، به طور ضعیفی متصل می‌شدند. حدود ۲۰ یا تعداد بیشتری از ایزوفرم‌های فیبرونکتین توسط پردازش‌های متناوب RNA رونویسی شده حاصل از یک ژن منفرد ایجاد می‌شوند (شکل ۱۶ـ۴). فیبرونکتین ها برای مهاجرت و تمایز اکثر انواع سلول ها در طی فرایند رشد جنین لازمند. این پروتئین ها همچنین برای بهبودی زخم ها ضروریند زیرا آن ها سبب شروع فرایند تشکیل لخته خونی وتسهیل مهاجرت ماکروفاژها و سایر سلول‌های سیستم ایمنی به محل آسیب دیده می‌شوند.

فیبرونکتین ها به سلول ها کمک می‌کنند که به وسیله اتصال به سایر اجزاء ECM خصوصا کلاژن‌های رشته‌ای و پروتئوگلیکان‌های هپاران سولفات و گیرنده‌های چسبندگی سطح سلول از قبیل اینتگرین‌ها، به ماتریکس خارج سلولی اتصال یابند (شکل ۱۹ـ۲). فیبرونکتین توسط برقراری این برهمکنش ها با گیرنده‌های چسبندگی (از قبیل اینتگرین $\alpha5\beta1$)، می‌تواند روی شکل و جابجایی سلول ها و سازمانیابی اسکلت سلولی اثر بگذارد. به طور عکس، فیبرونکتین و سایر اجزاء ECM سلول ها توسط تنظیم اتصالات با واسطه گیرنده سلول‌ها، می‌توانند نیازهایشان را با محیط ECM سازگار کنند.

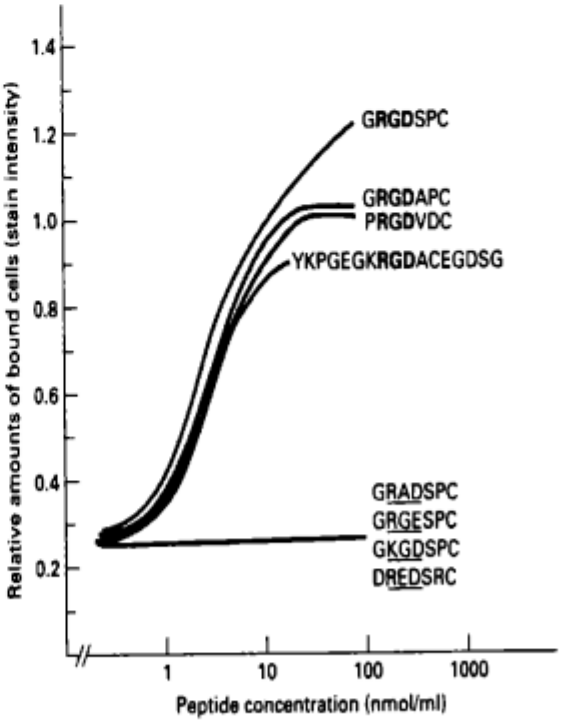
فیبرونکتین ها دیمرهایی از دو پلی پپتید مشابه هستند که در ناحیه C-ترمینال توسط دو پیوند دی سولفیدی بهم اتصال یافته‌اند. هر زنجیره به طول ۶۰ـ۷۰nm و ضخامتی حدود ۲-۳nm دارد. هضم نسبی فیبرونکتین با مقادیر پائین پروتئاز ها و بررسی قطعات حاصله نشان می‌دهد که هر زنجیره متشکل از چندین ناحیه عملگر است که خصوصیات اتصال به لیگاند متفاوتی دارند (شکل ۱۹ـ۳۰a). هر ناحیه در حقیقت، حاوی چندین کپی از توالی‌های اختصاصی است که می‌توان به صورت یکی از سه نوع دسته‌بندی نمود. طبقه‌بندی‌هایی که فیبرونکتین ها را مشخص می‌کند شامل تکرارهای تیپ I، II و III می‌باشد که براساس تشابهات توالی اسیدآمینه‌ای آنها صورت گرفته است گرچه توالی‌های هر کدام از دو تکرار از یک نوع مشابه نیستند. این تکرارهای مرتبط، به مولکول ظاهر دانه دانه در یک طناب را می‌دهند. ترکیب تکرارهای متفاوت نواحی‌ای را تشکیل می‌دهد که سبب توانایی فیبرونکتین برای اتصال به چندین لیگاند می‌شود.

یکی از تکرارهای تیپ III در ناحیه اتصال به سلول فیبرونکتین، اتصال به اینتگرین‌های اختصاصی را وساطت می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات انجام شده روی پپتیدهای سنتتیک نشان دهنده قطعاتی از این تکرارهاست که مشابه توالی سه پپتیدی Arg-Gly-Asp است که معمولاً با نام توالی RGD خوانده می‌شود و به عنوان یک توالی کوچک در داخل این تکرار ها برای شناسایی اینتگرین ها مورد نیاز است. در یکی از مطالعات، هپتاپپتیدهای حاوی توالی RGD یا یک نوع متفاوت از این توالی به منظور بررسی توانایی آن در وساطت چسبندگی سلول‌های کلیه موش صحرایی به ظرف کشت به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که هپتاپپتیدهای حاوی توالی RGD، توانایی فیبرونکتین سالم را برای تحریک چسبندگی با وساطت اینتگرین تقلید می‌کنند، در حالی که هپتاپپتیدهای متفاوتی که فاقد این توالی بودند، عملکردی نداشتند (شکل ۱۹ـ۳۱).

1- Fibronectin

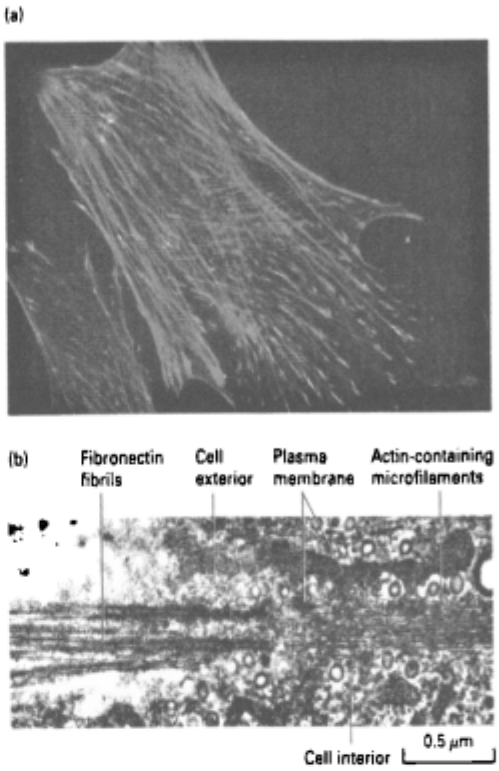


▲ **شکل ۳۰ـ۱۹ (شکل رنگی) سازمانیابی فیبرونکتین و اتصال آن به اینتگرین.** (a) شکل فیبرونکتین که توسط دو تکرار تیپ III به دُمین‌های خارج سلولی اینتگرین متصل می‌شود. تنها یکی از دو زنجیره‌های مشابه هم که توسط پیوندهای دی سولفیدی در مجاورت C-ترمینال آن ها به هم متصل شده‌اند، در مولکول فیبرونکتین دیمری نشان داده شده است. هر زنجیره حاوی حدودا ۲۴۴۶ اسیدآمینه است و از سه نوع توالی آمینواسیدی تکراری (تکرارهای تیپ I، II یا III) تشکیل شده است. دُمین EIIIA، EIIIB-هر دو تکرار تیپ III و IIICS توسط پردازش‌های متناوب به صورت ساختاری در نواحی نشان داده شده با پیکان ها در می‌آیند. فیبرونکتین رایج، فاقد یک یا هر دو توالی EIIIA و EIIIB است. دست کم پنج توالی مختلف ممکن است در ناحیه IIICS و در نتیجه پردازش‌های متناوب ایجاد شود (شکل ۱۶ـ۴). هر زنجیره حاوی چندین ناحیه حاوی تکرارهای چندگانه است که برخی از آن ها دارای نواحی اتصالی اختصاصی و ساخته شده از تکرارهای اتصالی چندگانه برای هپاران سولفات، فیبرین(یک جزء اصلی برای لخته‌های خونی)، کلاژن و اینتگرین‌های سطح سلولی می‌باشد. دُمین اتصال اینتگرین نیز به عنوان دُمین اتصال سلولی شناخته می‌شود. ساختار دُمین‌های فیبرونکتین از قطعاتی از مولکول مشخص شده‌اند. (b) ساختاری با بزرگنمایی بالا نشان می‌دهد که توالی اتصالی RGD (قرمز) به صورت یک لوپ از دُمین تیپ III بهم فشرده‌اش به سمت خارج گسترش می‌یابد که همانند ناحیه سینرژی (آبی) در سمت مشابهی از فیبرونکتین قرار می‌گیرد و این ناحیه در اتصال با تمایل بالا به اینتگرین ها شرکت می‌کند.



◀**شکل تجربی ۳۱ـ۱۹ یک توالی‌تری پپتیدی اختصاصی(RGD) در ناحیه اتصال به سلول فیبرونکتین برای اتصال سلول ها بهم نیاز است.** ناحیه اتصال سلولی فیبرونکتین حاوی یک توالی هپتاپپتیدی اتصال به اینتگرین است که کد تک حرفی اسید آمینه‌ای آن GRGDSP (شکل ۱۴ـ۲) به همراه یک ریشه سیستئین (C) اضافی در C-ترمینال است. این هپتاپپتید و چند نوع متفاوت از لحاظ شیمیایی سنتز شدند. غلظت‌های متفاوتی از هر پپتید سنتزی به ظروف پلی استیرن اضافه شدند که دارای پروتئین ایمونوگلوبولین G(IgG) بودند که به طور محکم به سطوح آن ها اتصال یافته بودند. سپس پپتید ها به صورت شیمیایی به IgG اتصال عرضی برقرار کردند. نهایتاً سلول‌های کلیه موش صحرایی سالم که کشت داده شده بودند، به ظروف اضافه شده و به منظور برقراری چسبندگی، به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از آن سلول‌های متصل نشده از داخل ظروف شسته شدند و مقادیر نسبی از سلول‌هایی که به طور محکم اتصال یافته بودند توسط رنگ‌آمیزی سلول‌های اتصال یافته با یک رنگ، رنگ‌آمیزی شده و توسط یک اسپکتروفتومتر، شدت رنگ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که چسبندگی سلول به همراه افزایش غلظت پپتید از آن دسته پپتیدهای حاوی توالی RGD و نه انواع مختلفی که فاقد توالی هستند[1] به میزانی بیشتر از سطح پایه افزایش می‌یابد.

1- Modification underlined



▲شکل تجربی ۱۹.۳۲ (شکل رنگی) اینتگرین‌ها اتصال میان فیبرونکتین در ماتریکس خارج سلولی و اسکلت سلولی را وساطت می‌کنند. (a) میکروگراف ایمنوفلورسنت از یک فیبروبلاست کشت داده شده و تثبیت شده که نشان دهنده موقعیت اینتگرین $\alpha_5\beta_1$ (سبز) و فیبرهای استرس حاوی اکتین (قرمز) است. سلول با دو نوع آنتی بادی منوکلونال انکوبه شد که شامل یک آنتی بادی اختصاصی به اینتگرین که به یک رنگ فلورسانت سبز متصل بود و یک آنتی بادی اختصاصی به اکتین که به یک رنگ فلورسانت قرمز متصل شده بود. رشته‌های استرس دستجات طویلی از میکروفیلمان‌های اکتین هستند که به صورت شعاعی به سمت داخل نقاطی که در آن‌جا سلول با یک زمینه تماس دارد قرار گرفته‌اند. در انتهای دیستال این رشته ها در مجاورت غشا پلاسمایی، انطباق اکتین (قرمز) و اینتگرین متصل شونده به فیبرونکتین (سبز) یک فلورسانت زردرنگ تولید می‌کند. (b)میکروگراف الکترونی اتصال فیبرونکتین و رشته‌های اکتین در فیبروبلاست کشت داده شده. هر میکروفیلامنت ۷nm حاوی اکتین، اجزاء یک رشته استرس، در غشاء سلولی که به طور مایل برش یافته، خاتمه یافته است. میکروفیلامنت ها در مجاورت نزدیک هم قرار گرفته و ضخیم‌تر می‌شوند بنابراین فیبریل‌های فیبرونکتین روی سطح خارجی سلول به صورت متراکمی رنگ‌آمیزی می‌شوند.

یک مدل سه بعدی از اتصال فیبرونکتین به اینتگرین براساس ساختارهای بخش‌های فیبرونکتین و اینتگرین، ساخته شد. در یک ساختار با بزرگنمایی بالا از تکرار تیپ III فیبرونکتین متصل به اینتگرین و دُمین تیپ III مجاور آن، مشخص گردید که توالی RGD به صورت یک لوپ درآمده است‌که به سمت خارج مولکول جهت‌گیری نموده و موقعیت آن سبب تسهیل اتصال به اینتگرین ها می‌شود (شکل ۱۹.۳۰b). اگرچه توالی RGD برای اتصال به چندین اینتگرین مورد نیاز است، اما تمایل آن برای اینتگرین اساساً کمتر از اینتگرین کامل یا کل ناحیه اتصالی سلول در فیبرونکتین می‌باشد. بنابراین آرایش ساختمانی در نزدیکی توالی RGD فیبرونکتین ها (مثل قسمت‌هایی از تکرارهای مجاور مثل ناحیه سینرژی، شکل ۱۹.۳۰b را ملاحظه کنید) و در سایر پروتئین‌های حاوی RGD سبب توانایی اتصال آن ها به اینتگرین‌های خاص می‌شود. به این ترتیب، شکل‌های دیمری، ساده و محلول فیبرونکتین که توسط کبد یا فیبروبلاست ها تولید می‌شوند در ابتدا یک ساختمان فضایی غیرفعال دارند که به میزان ضعیفی به اینتگرین ها متصل می‌شود که دلیل آن در دسترس نبودن توالی RGD می‌باشد. جذب فیبرونکتین به ماتریکس کلاژن یا لامین پایه یا در آزمایشگاه به یک ظرف کشت بافت پلاستیکی، در نتیجه تغییر ساختمان فضایی است که توانایی آن را برای اتصال به سلول ها افزایش می‌دهد. احتمالاً این تغییر ساختمان فضایی، دسترس‌پذیری توالی RGD را برای اتصال به اینتگرین افزایش می‌دهد.

بررسی‌های میکروسکوپی و سایر مطالعات آزمایشگاهی (مثل آزمایشات اتصال بیوشیمیایی) نقش اینتگرین ها را در اتصال متقاطع فیبرونکتین و سایر اجزاء ECM به اسکلت سلولی نشان داده‌اند. به عنوان مثال، انطباق فیلامنت‌های اکتین اسکلت سلولی و اینتگرین ها را در داخل سلول می‌توان توسط میکروسکوپ فلورسانت مشاهده نمود (شکل ۱۹.۳۲a). اتصال اینتگرین‌های سطح سلول به فیبرونکتین در ماتریکس، حرکت وابسته به اکتین اسکلت سلولی برخی از مولکول‌های اینتگرین در سطح غشا را القا می‌کند. به دنبال کشش مکانیکی ناشی از حرکت نسبی اینتگرین‌های مختلف متصل به یک دیمر منفرد فیبرونکتین، فیبرونکتین کشیده می‌شود. این کشش خودآرایی فیبرونکتین ها را به صورت فیبریل‌های چند واحدی (مولتی مرمی) راه اندازی می‌کند.

نیروی مورد نیاز برای باز شدن پیچش و در معرض قرار گرفتن جایگاه‌های خودآرایی فعال در فیبرونکتین بسیار کمتر از آن میزانی است که برای تخریب اتصالات فیبرونکتین - اینتگرین لازم است. بنابراین مولکول‌های فیبرونکتین به صورت متصل به اینتگرین باقی می‌مانند در حالی که نیروهای مکانیکی سازنده سلول، تشکیل فیبریل را القا می‌کند. در نتیجه، اینتگرین ها توسط پروتئین‌های آداپتور، نیروهای داخل سلولی ناشی از اکتین اسکلت سلول را به فیبرونکتین خارج سلولی انتقال می‌دهند. به تدریج، فیبریل‌های

فیبرونکتین که به طور اولیه تشکیل شده‌اند به صورت یکی از اجزاء بسیار پایدار ماتریکس که دارای اتصالات متقاطع کوالان است بالغ می‌شود. در برخی از تصاویر میکروگراف‌های الکترونی، فیبریل‌های فیبرونکتین خارجی، به صورت ردیفی در یک خط ممتد قرار می‌گیرند که دستجات فیبریل‌های اکتین در داخل سلول نیز همراه آن‌ها هستند (شکل ۳۲b-۱۹). این مشاهدات و نتایج حاصل از سایر مطالعات نمونه‌های اولیه‌ای از یک رسپتور چسبندگی (مثال، یک اینتگرین) است که از لحاظ مولکولی به خوبی شناخته شده است و یک پل میان اسکلت داخل سلولی و اجزاء ماتریکس خارج سلولی (یک پدیده‌ای که اکنون به طور وسیعی شناسایی شده است) تشکیل می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۴-۱۹

ماتریکس خارج سلولی II: بافت پیوندی و سایر بافت‌ها

- بافت‌های پیوندی مثل تاندون و غضروف، در اینکه آنها دارای حجم زیاد و متشکل از ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند از سایر بافت‌ها متفاوت می‌باشند.
- سنتز کلاژن فیبریلی (مثل تیپ I، II و III) با تغییرات شیمیایی در زنجیره‌های α تازه سنتز شده و همایش آنها به صورت پروکلاژن دارای مارپیچ سه گانه در شبکه آندوپلاسمی شروع می‌شود. بعد از ترشح، مولکول‌های پروکلاژن شکافته شده به صورت جانبی قرار گرفته و به صورت کووالانسی در قالب بسته‌هایی بنام فیبریل درمی آید که این فیبریلها در یک تجمع بزرگتر، فیبرها را بوجود می‌آورند (شکل ۲۴-۱۹ را ملاحظه کنید).
- انواع مختلف کلاژن‌ها بوسیله توانایی مناطق مارپیچی و غیر مارپیچی آنها در همایش به صورت فیبریلها، تشکیل صفحات و یا اتصال با سایر انواع کلاژن‌ها از هم قابل تمییز هستند (جدول ۴-۱۹ را ملاحظه کنید).
- پروتئوگلیکانها حاوی پروتئینهای همراه غشایی یا ترشحی در مرکز خود هستند که به یکی یا تعداد زیادی از زنجیره‌های گلیکوز آمینوگلیکانی (GAG) به طور کووالان متصل شده‌اند. گلیکوز آمینوگلیکان‌ها پلیمرهای خطی دی ساکاریدی هستند که اغلب توسط سولفاسیون تغییر پیدا می‌کنند.
- پروتئوگلیکان‌های سطح سلولی مثل سیندکان برهمکنش سلول - ماتریکس را تسهیل کرده و به بعضی از مولکول‌های پیام‌رسان خارجی در شناسایی گیرنده‌های سطح سلولی کمک می‌کند.
- هیالورونان، یک GAG بسیار هیدراته، ترکیب اصلی ECM سلول‌های مهاجر و تکثیری می‌باشد. برخی از گیرنده‌های چسبانندگی سطح سلولی بوسیله هیالورونان به سلول‌ها متصل می‌شوند.
- تجمع پروتئوگلیکان‌های بزرگ حاوی هیالورونان در مرکز که به طور غیرکووالان به پروتئین مرکزی چندین مولکول پروتئوگلیکان متصل شده است (مثل، آگریکان) در ویژگیهای مکانیکی ماتریکس نقش دارد (شکل ۲۹-۱۹ را ملاحظه کنید).
- فیبرونکتین‌ها پروتئین‌های ماتریکسی چند اتصالی هستند که نقش مهمی در مهاجرت و تمایز سلولی ایفاء می‌کنند. آنها حاوی جایگاههای اتصالی برای اینتگرین‌ها و ترکیبات ECM (کلاژنها، پروتئوگلیکانها) بوده و بنابراین قادر به اتصال سلول‌ها به ماتریکس می‌باشند (شکل ۳۰-۱۹ را ملاحظه کنید).
- توالی‌تری پپتیدی RGD (Arg-Gly-Asp) که در فیبرونکتین‌ها و بعضی از سایر پروتئین‌های ماتریکس یافت می‌شوند توسط اینتگرین‌های متعددی شناسایی می‌شوند.

۵-۱۹ برهمکنش‌های چسبندگی در سلول‌های متحرک و غیرمتحرک

پس از آن‌که برهمکنش‌های چسبندگی در اپی‌تلیال و در طی تمایز شکل گرفت، غالباً بسیار پایدار خواهند بود و می‌توانند در طی چرخه زندگی سلول ها یا تا زمانی که اپی‌تلیوم تحت تمایزات بیشتر واقع می‌شود باقی بمانند. اگر چه چنین اتصال درازمدتی (غیرمتحرک) نیز در بافت‌های اپی‌تلیال وجود دارد اما برخی از سلول‌های غیراپی‌تلیومی باید قادر به خزیدن از میان یا از عرض یک لایه ماتریکس خارج سلولی یا سایر سلول ها باشند. به این ترتیب، در طی تکوین یا ترمیم زخم‌ها و در حالات پاتولوژیک خاص (مثل سرطان)، سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند به صورت سلول‌هایی با تحرک بیشتر (انتقال اپی‌تلیال - مزانشیمال) تغییر کنند. بروز تغییرات در بیان مولکول‌های چسبندگی نقش کلیدی در اعمالی چون حرکت سلولی مثل خزیدن سلول‌های سفیدخونی به داخل بافت‌های عفونی بازی می‌کند. در این بخش ما به شرح ساختارهای سطح سلولی متنوعی می‌پردازیم که واسطه برهمکنش‌های چسبندگی انتقال هستند که به طور اختصاصی برای حرکت سلول ها سازش یافته‌اند و نیز انواعی که اتصال درازمدت را وساطت می‌کنند، می‌پردازیم. مکانیسم‌های داخل سلولی شرح داده شده برای ایجاد نیروهای مکانیکی به کار می‌روند که سلول ها را می‌چرخانند و شکل آن ها را به گونه‌ای که در فصل‌های ۱۷ و ۱۸ شرح دادیم اصلاح می‌کنند.

اینتگرین‌ها، پیام‌ها را میان سلول‌ها و محیط سه بعدی اطرافشان توزیع می‌کنند

طبق آنچه که تاکنون شرح دادیم، اینتگرین‌ها سلول‌های اپی‌تلیال را به لامین پایه متصل کرده و توسط پروتئین‌های آداپتور به فیلامنت‌های حدواسط اسکلت سلولی اتصال می‌یابند (شکل ۱-۱۹). بنابراین، اینتگرین‌ها پلی میان ECM و اسکلت سلول تشکیل می‌دهند؛ و نیز نقش مشابهی را در سلول‌های غیر اپی‌تلیال ایفا می‌کنند. در سلول‌های غیر اپی‌تلیال، اینتگرین‌ها در غشای پلاسمایی نیز با سایر مولکول‌ها در ساختارهای چسبندگی مختلفی دسته‌بندی می‌شوند که اتصالات کانونی، تماس‌های کانونی، کمپلکس‌های کانونی، اتصالات 3-D و نیز اتصالات فیبریلی در اتصالات حلقوی که دسموزم‌ها نام دارند. این ساختارها توسط میکروسکوپ فلورسانت و با استفاده از آنتی‌بادی‌هایی که اینتگرین‌ها یا سایر مولکول‌های دسته‌بندی شده را شناسایی می‌کنند، به سادگی قابل رویت هستند (شکل ۳۳-۱۹). همانند اتصالات لنگری ماتریکس - سلول در سلول‌های اپی‌تلیال، این ساختارهای چسبندگی متنوع، سلول‌های غیراپی‌تلیال را به وسیله مثلاً اتصال به فیبرونکتین به ماتریکس خارج سلولی می‌چسبانند (شکل ۳۲-۱۹). آن‌ها همچنین حاوی دوجین از پروتئین‌های آداپتور داخل سلولی و پروتئین‌های وابسته به آن‌ها هستند که اتصال به فیلامنت‌های اکتین اسکلت سلولی را وساطت کرده و پیام‌های وابسته به چسبندگی را برای رشد سلول و تحرک سلولی فعال می‌کنند (شکل ۷-۱۹).

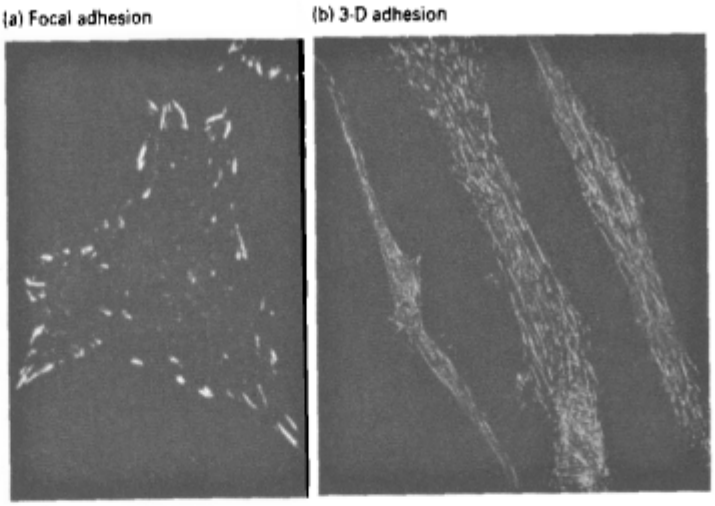
اگرچه ساختارهای چسبندگی حاوی اینتگرین در اکثر سلول‌های غیراپی‌تلیومی یافت می‌شوند، اما این ساختارها به مقدار زیاد در فیبروبلاست‌های رشد داده شده در سلول‌های کشت داده شده روی سطح شیشه یا زمینه پلاستیکی نیز مطالعه شده‌اند. این شرایط تنها به طور ضعیفی محیط سه بعدی ECM را که معمولاً چنین سلول‌هایی را در *In Vivo* در بر می‌گیرد، تخمین می‌زنند. زمانی که فیبروبلاست‌هایی که در ماتریکس‌های سه بعدی ECM کشت داده شده‌اند از سلول‌ها یا بافت‌ها جدا می‌شوند، اتصالاتی با زمینه سه بعدی را ECM تشکیل می‌دهند که اتصالات 3-D نام دارند. این ساختارها در برخی مواقع از لحاظ ترکیب، شکل، توزیع و فعالیت با اتصالات کانونی یا فیبریلی که در سلول‌های در حال رشد روی زمینه سطح که معمولاً در آزمایشات کشت سلولی استفاده می‌شوند، متفاوت هستند (شکل ۳۳-۱۹). فیبروبلاست‌های کشت داده شده با این اتصالات لنگری «طبیعی‌تر» اتصالات بزرگتری را برقرار کرده و تحرک و سرعت تکثیر سلول را افزایش داده و اشکال دوکی شکل شباهت بیشتری نسبت به سلول‌های کشت داده شده در سطح مسطح با آن دسته از فیبروبلاست‌هایی را دارند که در بافت‌ها کشت داده شده‌اند این مشاهدات مشخص می‌کند که خصوصیات توپولوژیک، ترکیبی و مکانیکی (از قبیل انعطاف‌پذیری) ماتریکس خارج سلولی، نقش کنترل شکل و فعالیت یک سلول را ایفا می‌کند. تفاوت‌های مختص بافت در این خصوصیات ماتریکس خارج سلولی احتمالاً سبب ایجاد خصوصیات مختص بافت سلول‌ها می‌شود.

اهمیت محیط 3-D سلول‌ها توسط مطالعه کشت سلولی در ارتباط با ریخت‌شناسی، عملکرد و پایداری سلول‌های اپی‌تلیال پستانی مولد شیر و تبدیل آن‌ها به سلول‌های سرطانی، پررنگ می‌شود. به عنوان مثال پیام رسانی خارج به داخل وابسته به ماتریکس 3-D که توسط اینتگرین‌ها وساطت می‌شود، روی سیستم پیام رسانی گیرنده تیروزین کیناز فاکتور رشد اپیدرمی و بالعکس اثر می‌گذارد. ماتریکس 3-D همچنین به سلول‌های اپی‌تلیال پستانی امکان می‌دهد که در ساختارهای اپی‌تلیال حلقوی که آسینی نام دارند ایجاد شوند که محتویات پروتئینی اصلی شیر را ترشح می‌کنند و اجازه می‌دهد که پاسخ‌های سلول‌های طبیعی و سرطانی را به داروهایی که پتانسیل شیمی درمانی را دارند مقایسه نماییم. سیستم‌های مشابه نیز هم ECMs‌های 3-D نرمال و هم سنتزی که برای ایجاد شرایط جثه زنده به کار می‌روند را فراهم می‌کنند تا سایر بافت‌های پیچیده و اندام‌هایی از قبیل کبد را مطالعه نماییم.

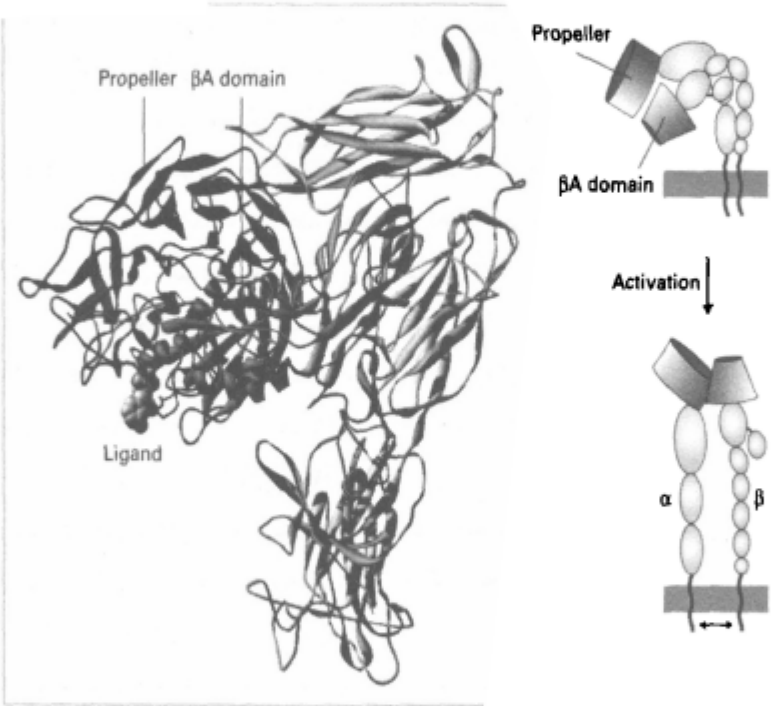
تنظیم چسبندگی با واسطه اینتگرین و پیام رسانی کنترل‌کننده حرکت سلولی

سلول‌ها می‌توانند قدرت برهمکنش‌های سلول - ماتریکس با واسطه اینتگرین را کنترل کنند که این عمل را توسط تنظیم تعداد اینتگرین‌ها (سطوح بیان)، فعالیت‌های اتصال به لیگاند یا هر دو، انجام می‌دهند. چنین تنظیمی برای نقش این برهمکنش‌ها در مهاجرت سلول و سایر اعمال دخیل در حرکت سلولی حیاتی هستند.

اتصال اینتگرین. اغلب و نه تمامی اینتگرین‌ها می‌توانند در دو ساختمان فضایی وجود داشته باشند: یک شکل با تمایل پایین (غیرفعال) و یک شکل با تمایل بالا (فعال) (شکل ۳۴-۱۹). نتایج مطالعات و آزمایشات ساختاری نشان می‌دهد که اتصال لیگاند‌ها توسط اینتگرین‌ها طرحی از تغییراتی را ایجاد می‌کند که در زمان فعال شدن اینتگرین‌ها به وقوع می‌پیوندند. در وضعیت غیرفعال، هترودیمر $\alpha\beta$ خمیده است و ساختمان فضایی جایگاه اتصال به لیگاند درسرمولکول تنها اجازه اتصال لیگاند با تمایل کم را می‌دهد و دم‌های C-ترمینال



شکل تجربی ۱۹.۳۳ اینتگرین‌ها به صورت ساختارهای چسبندگی دارای اشکال متنوع در سلول‌های غیراپی‌تلیال دسته‌بندی می‌شوند. روش‌های ایمونوفلورسانس برای تشخیص ساختارهای (سبز) روی سلول‌های کشت داده شده به کار گرفته می‌شوند. آنچه که در اینجا مشاهده می‌شود اتصالات کانونی (a) و اتصالات 3-D (b) روی سطوح فیبروبلاست‌های انسانی هستند. سلول‌ها به طور مستقیم روی سطح مسطح یک دیش کشت (a) یا روی یک ماتریکس سه بعدی از اجزاء ECM (b) کشت داده شده‌اند. شکل، توزیع و محتوای اتصالات وابسته به اینتگرین که توسط سلول‌ها ایجاد می‌شود بسته به محیط سلول‌ها تفاوت می‌کند.



شکل ۱۹.۳۴ (شکل رنگی) طرح فعال‌سازی اینتگرین. (چپ) طرح مولکولی براساس ساختاری کریستالی اشعه X ناحیه خارج سلولی اینتگرین $\alpha IIb\beta 3$ در وضعیت غیرفعال و با تمایل کم (خمیده) می‌باشد که زیرواحد α آبی رنگ و زیرواحد β قرمز رنگ است. جایگاه‌های اتصال به لیگاند اصلی در رأس مولکول قرار دارد در حالی که دُمین ملخی شکل زیرواحد α (آبی تیره) و دُمین β (قرمز تیره) با هم برهمکنش نموده‌اند. یک لیگاند پپتیدی RGD با رنگ زرد نشان داده شده است. (راست) فعال‌سازی اینتگرین‌ها در نتیجه تغییرات ساختمان فضایی صورت می‌گیرد که شامل راست شدن مولکول، حرکات کلیدی در مجاورت دُمین‌های ملخی و βA که تمایل به لیگاند‌ها را افزایش می‌دهند و جداسازی دُمین‌های سیتوپلاسمی در نتیجه تغییر برهمکنش‌ها با پروتئین‌های آداپتور.

سیتوپلاسمی هر دو زیرواحد به میزان بسیار نزدیکی به هم اتصال می‌یابند. در «وضعیت مستقیم» وضعیت فعال، تغییر ساختمان فضایی دُمین‌هایی که جایگاه اتصال را تشکیل می‌دهند سبب ایجاد اتصال محکمتر لیگاند (اتصال با تمایل بالا) می‌شوند و دم‌های سیتوپلاسمی از هم جدا می‌شوند.

این مدل‌های ساختمانی یک طرح جذاب از توانایی اینتگرین‌ها در پیام رسانی خارج به داخل و داخل به خارج را تولید می‌کند. اتصال مولکول‌های خاص ECM یا CAMs‌ها روی سایر سلول‌ها برای

ساختار با تمایل کم و خمیده، نیرویی را ایجاد می‌کند که مولکول را به صورت مستقیم در می‌آورند و نهایتاً دم‌های سیتوپلاسمی را از هم جدا می‌کنند. آداپتورهای داخل سلولی می‌توانند جدایی این دم ها را از هم «حس کنند» و در نتیجه یا به آن ها متصل می‌شوند و یا از آن ها جدا می‌شوند. سپس بروز تغییرات در این آداپتور ها می‌توانند اسکلت سلولی را تغییر داده و سبب فعال‌سازی یا مهار مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی شوند. به طور عکس، بروز تغییرات در وضعیت متابولیکی سلول ها می‌تواند سبب اتصال آداپتورهای داخل سلولی به دم ها و یا جداسازی آن ها از هم شده و بنابراین سبب می‌شود که دم ها به هم متصل شوند و یا از هم جدا گردند. در نتیجه، اینتگرین یا باید خمیده باشد (غیرفعال) یا مستقیم باشد (فعال)، که سبب تغییر در برهمکنش با ECM یا سایر سلول ها می‌شود.

عملکرد پلاکت‌ها، که با جزئیات بیشتر در زیر شرح داده شده است، یک نمونه خوب از نحوه برهمکنش سلول ماتریکس می‌باشد که توسط کنترل فعالیت اتصالی اینتگرین تنظیم می‌شود. پلاکت ها قطعات سلولی هستند که در گردش خون وجود دارند و به همراه مولکول‌های ECM در ضمن تشکیل یک لخته خونی به صورت توده در می‌آیند. در وضعیت پایه‌ای آن، اینتگرین $\alpha IIb\beta 3$ که به طور معمول روی غشا پلاسمایی پلاکت ها وجود دارد، نمی‌تواند به طور محکم به لیگاندهای پروتئینی خود (مثل فیبرینوژن، فیبرونکتین) که همه این لیگاند ها در تشکیل یک لخته خونی شرکت می‌کنند، اتصال یابد که علت آن قرار داشتن اینتگرین در وضعیت ساختمان فضایی غیرفعالش (خمیده) می‌باشد. در یک لخته در حال تشکیل، اتصال یک پلاکت به کلاژن یا یک پروتئین بزرگ ECM که فاکتور وان ویلبراند[1] نام دارد توسط سایر رسپتورهای پیام رسانی و یا فعال‌سازی پلاکت توسط ADP یا آنزیم لخته ساز ترومبین، پیام‌های داخل سلولی را ایجاد می‌کند. این پیام ها تغییراتی را در مسیرهای پیام رسانی سیتوپلاسم القا می‌کنند که سبب یک تغییر به سمت وضعیت ساختمان فضایی فعال در اینتگرین $\alpha III\beta 3$ می‌گردد. در نتیجه، این اینتگرین می‌تواند به طور محکمی به پروتئین‌های لخته ساز خارج سلولی اتصال یافته و در تشکیل لخته شرکت کند. افرادی که دارای نقایص ژنتیکی در زیرواحد $\beta 3$ اینتگرین هستند، دچار خونریزی‌های شدید می‌شوند که این امر یادآور نقش این اینتگرین در تشکیل لخته‌های خونی است.

بیان اینتگرین اتصال سلول ها به اجزاء ECM می‌توانند توسط تنظیم تعداد مولکول‌های اینتگرین که در سطح سلول در دسترس قرار گرفته‌اند تنظیم گردد. اینتگرین $\alpha 4\beta 1$ که در اکثر سلول‌های هماتوپوئیتیک یافت می‌شود، مثالی از این مکانیسم تنظیمی می‌باشد. برای تکثیر و تمایز یافتن این سلول‌های هماتوپوئیتیک، آن ها باید به فیبرونکتین سنتز شده توسط سلول‌های حفاظتی (استرومال) در مغز قرمز استخوان اتصال یابند. اینتگرین $\alpha 4\beta 1$ در روی سلول‌های هماتوپوئیتیک به یک توالی Glu-Ile-Leu-Asp-Val(EILDV) در فیبرونکتین اتصال می‌یابد و به این ترتیب سلول ها روی ماتریکس لنگراندازی می‌کنند. این اینتگرین همچنین به یک توالی در CAM که CAM-1 عروقی (VCAM-1) نام دارد اتصال می‌یابد که این توالی روی سلول‌های استرومال مغز قرمز استخوان وجود دارد. بنابراین سلول‌های هماتوپوئیتیک مستقیما به سلول‌های استرومال و به ماتریکس اتصال می‌یابند. در اواخر تمایزیابی، سلول‌های هماتوپوئیتیک بیان اینتگرین $\alpha 4\beta 1$ را در خود کاهش می‌دهند و در نتیجه تعداد مولکول‌های اینتگرین $\alpha 4\beta 1$ روی سطح سلول ها کاهش می‌یابد. این امر به سلول‌های بالغ خونی اجازه می‌دهند که از سلول‌های استرومال و ماتریکس در مغز قرمز استخوان جدا شده و نهایتاً وارد گردش خون شوند.

اتصالات میان ECM و اسکلت سلولی در دیستروفی ماهیچه‌ای دچار نقص می‌گردند

اهمیت اتصالات وابسته به گیرنده چسبندگی میان اجزاء ECM و اسکلت سلولی توسط یک سری از بیماری‌های توارثی تحلیل ماهیچه‌ای مشخص می‌شود که مجموعا دیستروفی‌های ماهیچه‌ای خوانده می‌شوند. دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن (DMD) رایج‌ترین نوع یک بیماری وابسته به جنس است که حدود ۱ در هر ۳۳۰۰ پسر را درگیر می‌کند و سبب نارسایی‌های قلبی یا تنفسی می‌شود که معمولاً در اواخر ده یا اوایل بیست سالگی بروز می‌یابد. اولین نشانه ها در فهم اساس مولکولی این بیماری توسط کشف افرادی با DMD حاصل شد که حامل جهش‌هایی در ژن کدکننده یک پروتئین با نام دیستروفین بودند. این پروتئین بسیار بزرگ یک پروتئین آداپتور سیتوزولی است که به فیلامنت‌های اکتین و یک گیرنده اتصالی به نام دیستروگلیکان اتصال می‌یابد.

دیستروگلیکان به صورت یک پیش ساز گلیکوپروتئینی بزرگ سنتز می‌شود که به صورت پروتئولیتیکی قطع می‌شود و دو

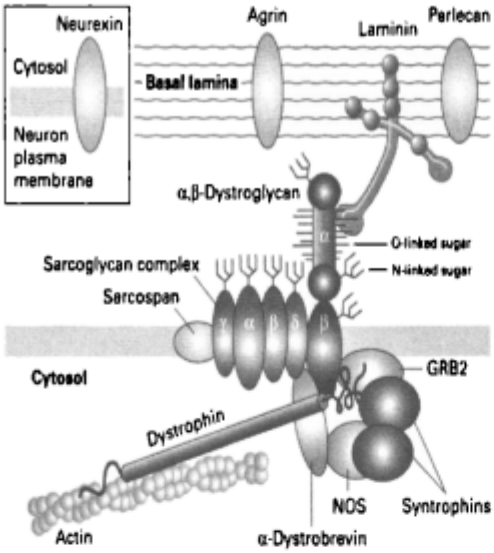
1- Von willibrand

زیرواحد ایجاد می‌کند. زیرواحد α یک پروتئین محیطی غشایی است و زیرواحد β یک پروتئین غشاگذر است که دُمین خارج سلولی آن با زیرواحد α اتصال دارد (شکل ۳۵ـ۱۹). اولیگوساکاریدهای چندگانه با اتصال -O، به صورت کوالان به گروه‌های هیدروکسیل زنجیره جانبی ریشه‌های سرین و ترئونین در زیرواحد α اتصال می‌یابند. برخلاف فراوان‌ترین اولیگوساکاریدهای با اتصال -O (که شبه موسین نیز نامیده می‌شوند) که در آن یک N-استیل گالاکتوز آمین (GalNAc) اولین قند در زنجیره‌ای است که به طور مستقیم به گروه هیدروکسی زنجیره جانبی سرین یا ترئونین یا پیوند در پروتئوگلیکان‌ها است، اکثر زنجیره‌های با اتصال O- در دیستروگلیکان مستقیما به گروه هیدروکسیل توسط یک قند مانوز اتصال یافته‌اند (شکل ۲۷ـ۱۹).

این اولیگوساکاریدهای اختصاص یافته با اتصال -O به اجزاء مختلف لامین پایه اتصال می‌یابند که این اجزاء شامل دُمین‌های LG پروتئین چنداتصالی ماتریکس لامینین و پروتئوگلیکان‌های پرلکان و اگرین هستند. نوروتوکسین‌ها، که خانواده‌ای از مولکول‌های چسبندگی بیان شده توسط نورون‌ها هستند توسط این الیگوساکاریدها اتصال می‌یابند که ساختارهای ناهمگون دقیق و مکانیسم‌های سنتز آن‌ها هنوز به درستی روشن نشده است.

قطعه غشاگذر زیرواحد β دیستروگلیکان به یک کمپلکس از پروتئین‌های اینتگرال غشایی اتصال می‌یابد. دُمین سیتوزلی آن به دیستروفین و سایر پروتئین‌های آداپتور و پروتئین‌های پیام‌رسان داخل سلولی مختلفی اتصال می‌یابد (شکل ۳۳ـ۱۹). در نتیجهٔ آرایش بزرگ و هترومری، کمپلکس گلیکوپروتئینی دیستروفین (DGC) ماتریکس خارج سلولی را به اسکلت سلولی و مسیرهای پیام رسانی در داخل ماهیچه و سایر انواع سلول‌ها به هم مرتبط می‌سازد. به عنوان مثال، آنزیم پیام رسانی نیتریک اکسیدسنتاز (NOS) توسط سینتروفین به زیرکمپلکس سیتوزلی دیستروفین در ماهیچه اسکلتی اتصال می‌یابد. افزایش Ca^{2+} داخل سلولی در طی انقباض ماهیچه‌ای، NOS را برای تولید نیتریک اکسید (NO) که یک مولکول پیام رسانی است فعال می‌سازد که NO به داخل سلول‌های ماهیچه صاف احاطه کننده دیواره رگ‌های خونی انتشار می‌یابد. NO سبب راه اندازی شل شدن عضله صاف می‌شود که منجر به افزایش موضعی جریان خون حاوی مواد مغذی و اکسیژن به ماهیچه اسکلتی می‌شود.

جهش‌های دیستروفین، سایر اجزاء DGC، لامینین یا آنزیم‌هایی که قندهای با اتصال O- را به دیستروگلیکان اتصال



▲ **شکل ۳۵ـ۱۹ کمپلکس‌های گلیکوپروتئینی دیستروفین (DGC) در سلول‌های ماهیچه اسکلتی.** این طرح شماتیک نشان می‌دهد که DGC متشکل از سه ساب کمپلکس است که شامل: ساب کمپلکس $\beta\alpha$ دیستروگلیکان، ساب کمپلکس سارکوگلیکان / سارکوسپان پروتئین‌های اینتگرال غشایی؛ و ساب کمپلکس سیتوزولی آداپتور تشکیل دهنده دیستروفین، سایر پروتئین‌های آداپتور و مولکول‌های پیام‌رسانی. توسط قندهای با اتصال O، β- دیستروگلیکان به محتویات لامین پایه از قبیل لامینین و پرلکان و پروتئین‌های سطح سلولی از قبیل نورکسین در نورون ها اتصال می‌یابد. دیستروفین (پروتئین معیوب در دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن) β دیستروگلیکان را به اکتین اسکلت سلولی اتصال می‌دهد و α- دیستروبروین، دیستروفین را به ساب کمپلکس سارکوگلیکان/سارکوسپان متصل می‌کند. نیتریک اکسیدسنتاز (NOS) نیتریک اکسید را تولید می‌کند که یک مولکول گازی شکل پیام رسان است و GRB2 یکی از اجزاء مسیرهای پیام رسانی توسط گیرنده‌های سطح سلولی ویژه فعال می‌گردد (فصل ۱۵).

می‌دهند، همگی می‌توانند پیوند با واسطه DGC میان سلول‌های ماهیچه‌ای داخلی و خارجی را از بین برده و سبب دیستروفی‌های ماهیچه‌ای شوند. به علاوه، جهش‌های دیستروگلیکان به میزان زیادی تجمع گیرنده‌های استیل کولین را روی سلول‌های ماهیچه‌ای در اتصالات عصبی ـ عضلانی که وابسته به پروتئین‌های لامین پایه لامینین و اگرین هستند کاهش می‌دهد. این ها و احتمالاً سایر اثرات ناشی از نقایص DGC ظاهراً منجر به ضعف پیشرونده توانایی مکانیکی سلول‌های ماهیچه‌ای در زمانی که تحت انقباض و انبساط قرار می‌گیرند شده و منجر به زوال سلول ها و دیستروفی ماهیچه‌ای می‌شود.

دیستروگلیکان یک مثال برجسته (و از لحاظ بالینی آشکار) از شبکه‌های پیچیده ارتباط در زیست‌شناسی سلول می‌باشد. دیستروگلیکان در ابتدا در ضمن مطالعه DMD کشف شد. بنابراین بعداً نشان داده شده که در سلول‌های غیرماهیچه‌ای نیز بیان شده و توسط اتصال به لامین نقشی کلیدی در آرایش‌یابی و پایداری دست کم برخی از غشاهای پایه‌ای نقش دارد. بنابراین، برای تکوین عادی ضروری است (فصل ۲۲). مطالعات بعدی منجر به شناسایی آن به عنوان یک گیرنده سطح سلولی برای ویروس‌هایی شد که سبب بیماری مکرر جنین انسان به نام تب لاسا[1] و سایر ویروس‌های مرتبط که همگی توسط اتصال به قندهای اختصاصی با اتصال O- مشابه به لامین متصل می‌شوند، می‌گردد. علاوه بر این، دیستروگلیکان یک گیرنده در روی سلول‌های تخصص یافته سیستم عصبی (سلول‌های شوان) است که به باکتری بیماری‌زای مایکوباکتریوم لپراکه عامل جذام در موجود زنده است متصل می‌شود.

IgCAMs ها اتصالات سلول - سلول را در بافت‌های عصبی و سایر بافت ها وساطت می‌کنند

پروتئین‌های غشایی نورون ها توسط حضور دُمین‌های چندگانه ایمونوگلوبولین (تکرارها) در نواحی خارج سلولی‌شان شناسایی می‌شوند که سوپرفامیلی ایمونوگلوبولین CAMs ها یا IgCAMs ها را تشکیل می‌دهد. دُمین Ig یک موتیف پروتئینی مشترک است که حاوی ۷۰ تا ۱۱۰ ریشه است که ابتدا در آنتی‌بادی‌ها (ایمونوگلوبولین‌های متصل شونده به آنتی‌ژن) شناسایی شدند اما دارای یک منشاء تکاملی قدیمی‌تر در CAMs ها هستند. ژنوم انسان، دروزوفیلا و کرم حلقوی الگانس به ترتیب حاوی حدوداً ۷۶۵، ۱۵۰ و ۶۴ ژن است که پروتئین‌های حاوی دُمین‌های Ig را کد می‌کنند. دُمین‌های Ig در یک محدوده وسیع از پروتئین‌های سطح سلولی، شامل گیرنده‌های سلول T که توسط لنفوسیت ها و اکثر پروتئین‌هایی که در برهمکنش‌های چسبندگی شرکت دارند یافت می‌شوند. از جمله IgCAMs ها، CAMs های نورونی، CAMs های بین سلولی (ICAMs) که در انتقال لنفوسیت ها به درون بافت ها و مولکول‌های چسبندگی اتصالات (JAMs) که در اتصالات محکم وجود دارند را می‌توان نام برد.

همانطور که نام CAMs های نورونی نشان می‌دهد، این نوع CAMs ها از اجزاء مهم و اختصاصی بافت‌های عصبی هستند. یک نوع از آن ها NCAMs ها هستند که اساساً برهمکنش‌های هموفیلیک را وساطت می‌کنند. از آنجایی که NCAMs ها ابتدا در طی ریخت زایی بیان می‌شوند، بنابراین یک نقش مهم در تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای، گلیال و سلول‌های عصبی بازی می‌کنند. نقش آن ها در چسبندگی سلولی مستقیماً توسط مهار اتصالات توسط آنتی بادی‌های ضد NCAM مشخص گردیده است. ایزوفرم‌های بیشمار NCAM که توسط یک ژن واحد کد می‌شوند، توسط پردازش متناوب mRNA و گلیکوزیلاسیون‌های متنوع ایجاد می‌شوند. در انسان‌ها، بروز جهش‌هایی در نقاط مختلف ژن L1-CAM سبب بیماری‌های عصبی مختلف (مثل کندذهنی، هیدروسفالی مادرزادی) می‌شود.

یک NCAM حاوی یک ناحیه خارج سلولی با پنج تکرار Ig و دو تکرار فیبرونکتینی نوع III و یک قطعه پل زننده روی غشا و یک قطعه سیتوزولی که با اسکلت سلولی برهمکنش می‌کند است (شکل ۱۹-۲). به طور عکس، ناحیه خارج سلولی L1-CAM دارای شش تکرار Ig و چهار تکرار فیبرونکتین تیپ III است. همانند کادهرین‌ها، برهمکنش‌های سیس (داخل سلولی) و برهمکنش‌های ترانسی (بین سلولی) به احتمال زیاد، نقش‌های مهمی را در اتصالات باواسطه IgCAM بازی می‌کنند (شکل ۱۹-۳). به این ترتیب اتصالاتی که توسط IgCAMs ها وساطت می‌شود، وابسته به Ca^{2+} می‌باشد.

اتصال کوالان زنجیره‌های چندگانه سیالیک اسید، یک مشتق قندی دارای بار منفی به VCAMs، خصوصیات اتصالی آن ها را تغییر می‌دهد. در بافت‌های جنینی از قبیل مغز، پلی‌سیالیک اسید بیش از ۲۵ درصد توده NCAMs ها را تشکیل می‌دهد. احتمالاً به دلیل نیروی دافعه میان قندهای باردار منفی در این NCAMs ها، تماس‌های سلول - سلول به میزان زیادی گذرا بوده و به راحتی تشکیل و شکسته می‌شوند که این امر یک ویژگی ضروری برای توسعه سیستم عصبی می‌باشد. برعکس، NCAMs ها بافت‌های بالغ را که حاوی فقط یک سوم اسید سیالیک است توسط ایجاد اتصالات با پایداری بیشتر تشکیل می‌دهند.

انتقال لکوسیت به داخل بافت‌ها، توسط یک توالی زمانی دقیق از برهمکنش‌های چسبندگی، هماهنگ می‌شود

در موجودات زنده بالغ، چندین نوع سلول خونی سفید (لکوسیت‌ها) در واکنش دفاعی علیه عفونت‌های ناشی از مهاجمین خارجی (مثل باکتری ها و ویروس‌ها) و آسیب بافتی منجر به تروما به

1- Lassa fever

التهاب شرکت می‌کنند. به منظور مقابله با عفونت و ترمیم بافت آسیب دیده، این سلول ها باید سریعاً در خون منتقل شوند، جایی که آن ها به صورت سلول‌های نسبتاً بی حرکت و غیرمتصل به داخل بافت‌های موردنظر در نقاط عفونت، التهاب یا آسیب در گردش هستند. اطلاعات بسیاری در مورد حرکت به داخل بافت که خروج از رگ[1] نام دارد در مورد چهار نوع از لکوسیت ها در دست است که این چهار نوع شامل نوتروفیل ها که چند پروتئین آنتی باکتریال را از خود رها می‌کنند، منوسیت‌ها، پیش ساز ماکروفاژ ها که می‌توانند ذرات خارجی را احاطه و آن ها را نابود کنند و لنفوسیت‌های B و T، سلول‌های شناسایی‌کننده آنتی ژن در سیستم ایمنی می‌باشند (فصل ۲۴).

خروج از رگ نیازمند تشکیل و شکست موفقیت‌آمیز اتصالات سلول - سلول میان لکوسیت ها در خون و سلول‌های اپی‌تلیال مفروش‌کننده عروق می‌باشد. برخی از این اتصالات توسط سلکتین‌ها[2] وساطت می‌شود که یک خانواده از CAMsهایی هستند که برهمکنش‌های سلول عروقی با لکوسیت را وساطت می‌کنند. یک جز کلیدی در این برهمکنش‌ها، P سلکتین است که در سطح مواجه با خون سلول‌های اندوتلیال قرار گرفته است. تمامی سلکتین ها حاوی یک دُمین لکتین وابسته به Ca^{2+} هستند که در انتهای دیستال ناحیه خارج سلولی مولکول قرار گرفته است و الیگوساکاریدها را در گلیکوپروتئین ها یا گلیکولیپیدها شناسایی می‌کنند (شکل ۱۹-۲). به عنوان مثال، لیگاند اصلی P- و E- سلکتین اولیگوساکاریدی است که آنتی ژن سیالیل لویس -X[3] نام دارد که بخشی از الیگوساکاریدهای طویل‌تر موجود در تعداد بیشماری از گلیکوپروتئین ها و گلیکولیپیدهای لکوسیت است.

شکل ۱۹-۳۶ نشان دهنده توالی پایه‌ای برهمکنش‌های سلول - سلول است که منجر به خروج از رگ لکوسیت ها می‌شود. پیام‌های التهابی متنوعی در نواحی عفونت یا التهاب آزاد می‌شوند که در ابتدا سبب فعال‌سازی اندوتلیوم می‌گردند. P- سلکتین روی سطح سلول‌های اندوتلیال فعال شده در دسترس قرار می‌گیرد و سبب وساطت اتصال ضعیف لکوسیت‌های در حال گذر می‌شوند. به دلیل نیروی حاصل از جریان خون و سرعت‌های «روشن» و «خاموش» شدن اتصال P-سلکتین به لیگاندش، این لکوسیت‌های «به دام انداخته شده» به آهستگی حرکت می‌کنند اما متوقف نمی‌شوند و اصطلاحاً در امتداد سطح اندوتلیوم می‌غلتند. در میان پیام‌هایی که فعال‌سازی اندوتلیوم را شروع می‌کنند، **کموکاین ها**[4] را می‌توان نام برد که گروهی از پروتئین‌های ترشحی کوچک هستند (۸-۱۲kDa) و توسط طیف وسیعی از سلول ها شامل سلول‌های اندوتلیال و لکوسیت ها تولید می‌شوند.

برای برقراری اتصال محکم میان سلول‌های اندوتلیال فعال شده و لکوسیت‌ها، اینتگرین‌های حاوی $\beta 2$- روی سطوح لکوسیت ها نیز باید توسط کموکاین ها یا سایر پیام‌های فعال‌سازی موضعی از قبیل فاکتورهای فعال‌کننده پلاکتی (PAF) فعال شود. فاکتور فعال‌کننده پلاکتی از این نظیر غیرمعمول است که یک فسفولیپید است و نه یک پروتئین و این جزء روی سطح سلول‌های اندوتلیال فعال شده در همان زمانی که P-سلکتین در دسترس قرار گرفته است، در معرض واقع می‌شود. اتصال PAF یا سایر فعال‌کننده ها به گیرنده هایشان روی لکوسیت ها منجر به فعال‌سازی اینتگرین‌های لکوسیت به شکل فرم با تمایل بالایشان می‌شود (شکل ۱۹-۳۴) (اکثر گیرنده‌های کموکاین ها و PAF، اعضای سوپرفامیلی گیرنده‌های جفت شونده با G پروتئین هستند که در فصل ۱۵ شرح داده شده‌اند). سپس اینتگرین‌های فعال شده روی لکوسیت‌ها، به IgCAMsهای مجزا روی سطح سلول‌های اندوتلیال اتصال می‌یابد. این ها شامل ICAM-2 که به طور پیوسته بیان می‌شوند و ICAM-1 هستند. ICAM-1 که در ضمن القاء شدن P-سلکتین و E-سلکتین سنتز می‌شود نمی‌تواند همیشه فوراً بعد از فعال شدن در اتصال سلول اندوتلیال به لوکوسیت شرکت کند ولی می‌تواند در زمانهای مشخص از التهاب مزمن شرکت کند. برقراری اتصالات محکم توسط برهمکنش‌های اینتگرین - ICAM غیروابسته به Ca^{2+}، منجر به توقف غلتیدن و گسترده شدن لکوسیت ها روی سطح اندوتلیوم می‌شود. به زودی، سلول‌های متصل شده از میان سلول‌های اندوتلیال مجاور هم انتقال یافته و به درون بافت زیرین آن ها می‌روند.

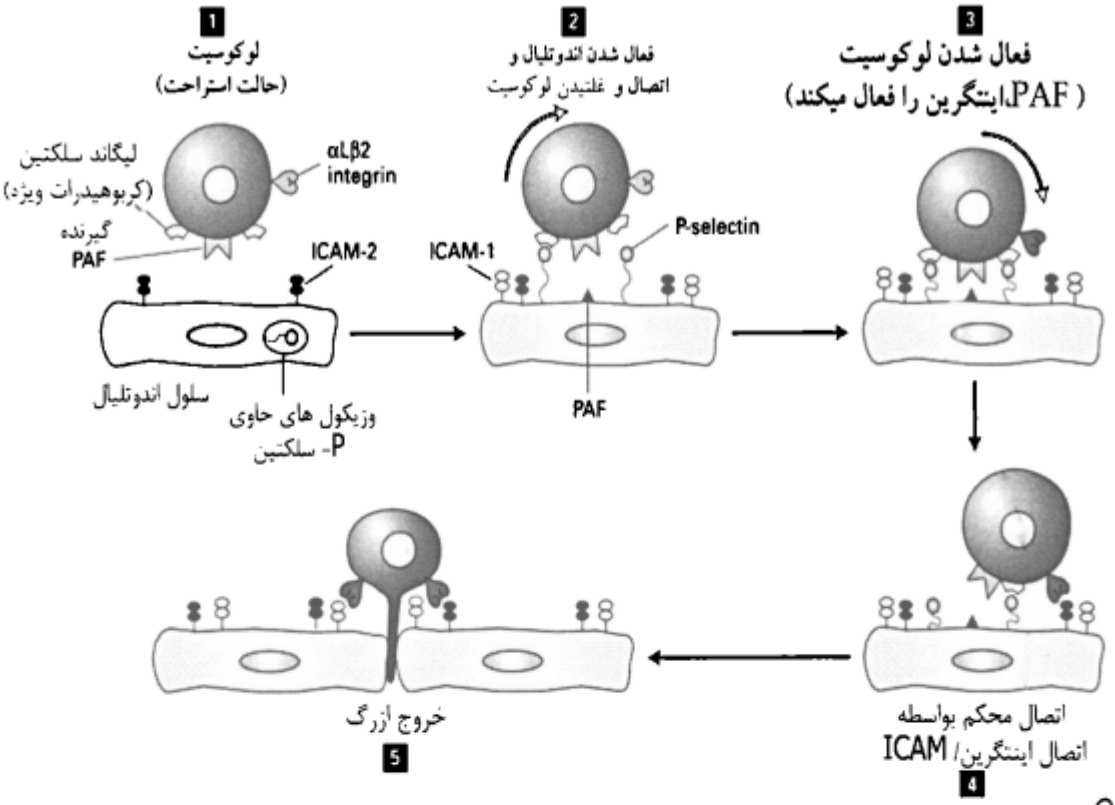
اتصال انتخابی لکوسیت ها به اندوتلیوم مجاور به جایگاه‌های عفونت یا التهاب، به ظهور و فعال‌سازی متوالی چندین CAMs متفاوت روی سطوح سلول‌های برهمکنش‌کننده بستگی دارد. انواع مختلف لکوسیت‌ها، اینتگرین‌های ویژه حاوی زیرواحد $\beta 2$ را بیان می‌کنند که به عنوان مثال $\alpha L\beta$ که توسط لنفوسیت‌های T و $\alpha M\beta 2$ که توسط منوسیت ها تولید می‌شود را می‌توان نام برد. با این وجود، تمام لکوسیت‌ها، توسط مکانیسم مشترک یکسانی که در شکل

1- Extravasation

2- Selectins

3- Sialyl Lewis - X antigen

4- Chemokines



▲ **شکل ۳۶-۱۹ توالی برهمکنش‌های سلول - سلول که منجر به اتصال محکم لوکوسیت ها به سلول اندوتلیال فعال شده و نهایتاً خروج از رگ می‌شوند.** مرحله (❶): در غیاب عفونت یا التهاب، لوکوسیت ها و سلول‌های اندوتلیال مفروش‌کننده عروق خونی در یک وضعیت استراحت هستند. (❷): پیام‌های التهابی تنها در ناحیه التهاب، عفونت یا هر دو آزاد شده و سلول‌های اندوتلیال در حال استراحت را به منظور انتقال سلکتین‌های محصور در وزیکول به سطح سلول، فعال می‌کنند. سلکتین‌های در دسترس قرار گرفته سبب وساطت اتصال ضعیف لوکوسیت ها توسط برهمکنش با لیگاندهای کربوهیدراتی در روی لوکوسیت ها می‌شود. فعال‌سازی اندوتلیوم، همچنین سبب سنتز فاکتور فعال‌کننده پلاکتی (PAF) و ICAM-1 می‌شود که هر دو در سطح سلول بیان می‌شوند. PAF و سایر فعال‌کننده‌هایی که به طور معمول ترشح می‌شوند شامل‌کموکاین‌ها، تغییراتی را در شکل لوکوسیت ها القا کرده و سبب فعال‌سازی اینتگرین‌های لوکوسیتی از جمله $\alpha L\beta 2$ می‌شود که توسط لنفوسیت‌های T بیان می‌شود. (❸): اتصال محکم بعدی میان اینتگرین‌های فعال شده روی لوکوسیت ها و CAMs ها در روی اندوتلیوم (مثل ICAM-2 و ICAM-1) سبب اتصال محکم (❹) آنها می‌شود. و باعث انتقال خروج از رگ آن ها و ورود به درون بافت زیرین آن ها می‌شود (❺).

۳۶-۱۹ نشان داده شده است به داخل بافت ها منتقل می‌شوند.

اکثر CAMs ها که برای هدایت اتصال لوکوسیتی به کار گرفته می‌شوند، در میان انواع مختلف لوکوسیت ها و بافت‌های هدف توزیع شده‌اند. اغلب تنها یک نوع ویژه از لکوسیت‌ها برای یک بافت هدف، منظور می‌شود. این اختصاصیت چگونه به دست می‌آید؟ یک مدل سه مرحله‌ای برای بیان ویژگی نوع سلول در چنین برهمکنش‌های سلول اندوتلیال - لوکوسیتی پیشنهاد شده است. ابتدا، فعال‌سازی اندوتلیال، اتصال برگشت‌پذیر، گذرا و نسبتاً ضعیف و ابتدایی (مثل برهمکنش سلکتین ها و لیگاندهای کربوهیدراتی‌شان) را راه اندازی می‌کند. بدون پیام‌های فعال‌سازی اضافی، لوکوسیت سریعاً حرکت می‌کند. دوماً، سلول ها در مجاورت مستقیم جایگاه عفونت یا التهاب، پیامهای شیمیایی (مثل کموکاین‌ها، PAF) را آزاد یا بیان می‌کنند که تنها دستجات ویژه‌ای (بسته به گیرنده‌های کموکاینی مکمل آنها) از لوکوسیت های با اتصال گذرا را فعال می‌کنند. سوم، CAMsهای وابسته به فعال‌سازی بیشتر (مثل اینتگرین‌ها)، الگوهای اتصالی خود را به کار می‌گیرند که این امر منجر به چسبندگی قوی می‌شود. تنها اگر ترکیب صحیح CAMs، الگوهای اتصالی و پیام‌های فعال‌سازی با هم به کار گرفته شوند به همراه زمانبندی مناسب در یک جایگاه ویژه، سبب ایجاد یک چسبندگی لوکوسیتی بسیار قوی می‌شود. چنین تنوع ترکیبی و ارتباط متقابل به یک دسته کوچک از CAMs ها اجازه می‌دهد که اعمال متنوعی را در داخل بدن انجام دهند (یک مثال خوب از صرفه جویی زیستی).

نقص در چسبندگی لکوسیت، توسط یک نقص ژنتیکی در سنتز زیرواحد $\beta 2$ اینتگرین رخ می‌دهد. افرادی که دارای این بیماری هستند، مستعد عفونت‌های مکرر باکتریایی هستند زیرا لکوسیت‌های آن‌ها نمی‌توانند به طور صحیح از مجرای طبیعی بیرون بروند و بنابراین در داخل بافت با عفونت مقابله کنند.

برخی از ویروس‌های بیماریزای دارای مکانیسم‌های تکامل یافته برای رسیدن به اهدافشان، پروتئین‌های سطح سلولی را که در پاسخ نرمال به التهاب شرکت دارند، به کار می‌گیرند. به عنوان مثال، اکثر ویروس‌های RNAداری که موجب سرماخوردگی عمومی (رینوویروس‌ها) می‌شوند به ICAM-1 و گیرنده‌های کموکاین متصل شده و توسط آن‌ها وارد سلول می‌شوند و می‌توانند خصوصاً وارد جایگاه‌های مربوط به ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) شده و سبب بیماری AIDS شوند. به نظر می‌رسد که اینتگرین‌ها در اتصال و یا دخول دسته وسیعی از ویروس‌ها نقش دارند که این ویروس‌ها شامل رئوویروس‌ها (سبب تب و ورم معده و روده خصوصاً در نوزادان می‌شوند)، آدنوویروس‌ها (سبب بیماری حاد تنفسی و ورم ملتحمه می‌شوند) و ویروس بیماری پا و دهان (سبب تب در گله گاو و خوک‌ها می‌شود) می‌باشند.

نکات کلیدی بخش ۵-۱۹

برهمکنش‌های چسبندگی در سلول‌های متحرک و غیرمتحرک

- بسیاری از سلول‌ها تجمعات حاوی اینتگرین (مثل اتصالات موضعی، اتصالات 3-D، پودوزوم) هستند که سلول‌ها را به صورت فیزیکی و عملکردی به ماتریکس خارج سلولی متصل کرده و پیام‌رسانی بیرون و درون سلولی را تسهیل می‌کند.
- ساختار سه بعدی ECM احاطه‌کننده سلول بواسطهٔ برهمکنش با اینتگرین‌ها می‌توانند رفتار سلول را تحت تأثیر قرار دهند.
- اینتگرین‌ها در دو شکل فضایی وجود دارند که در تمایل به لیگاندها و برهمکنش با پروتئین‌های آداپتور سیتوزولی (شکل ۳۴-۱۹ را ملاحظه کنید) با هم تفاوت دارند. این دو شکل فضایی به تنظیم فعالیت اینتگرین‌ها کمک می‌کند که برای کنترل اتصالات و حرکات سلول مهم هستند.
- دیستروگلیکانها گیرنده‌های چسبندگی، کمپلکس‌های بزرگی با دیستروفین، سایر پروتئین‌های آداپتور و مولکول‌های پیام‌رسان (شکل ۳۵-۱۹ را ملاحظه کنید) تشکیل می‌دهند. این کمپلکس اکتین اسکلت سلولی را به ماتریکس احاطه کننده آن متصل کرده و باعث پایداری مکانیکی عضله می‌شود. جهش‌های متعدد در ترکیبات مختلف این کمپلکس علت انواع مختلف دیستروفی عضلانی است.
- مولکول‌های چسبندگی سلول عصبی که شامل خانواده ایمونوگلوبین (Ig) CAMها می‌باشد اتصالات سلول-سلول غیروابسته به Ca^{2+} را در بافت‌های عصبی و سایر بافت‌ها وساطت می‌کنند.
- برهمکنش‌های متوالی و ترکیبی چندین نوع از CAMها (مثل سلکتین‌ها، اینتگرین‌ها و ICAMs) برای اتصال اختصاصی و محکم انواع متعددی از لوکوسیت‌ها به سطح سلول‌های آندوتلیال در پاسخ به پیامهای موضعی تحریک شده توسط عفونت یا التهاب ضروری است.

۶-۱۹ بافت‌های گیاهی

در اینجا ما به شرح آرایش یابی سلول‌های گیاهی به شکل بافت می‌پردازیم. سازمان‌یابی ساختاری کلی گیاهان عموما ساده‌تر از جانوران است. به عنوان مثال، گیاهان تنها چهار نوع گسترده از سلول‌ها را دارند که در گیاهان بالغ چهار کلاس اساسی از بافت‌ها را تشکیل می‌دهند: بافت درم که با محیط در ارتباط است ؛ بافت آوندی که آب و مواد محلول (مثل قندها، یون‌ها) را انتقال می‌دهد؛ و بافت زمینه‌ای پرکننده فضا که تشکیل جایگاه‌های اصلی متابولیسم را می‌دهد؛ و بافت هاگ‌زا که اندام‌های تولیدمثلی را تشکیل می‌دهد. بافت‌های پیوندی به صورت چهار سیستم اندامی اصلی سازمان می‌یابد: سیستم‌ها دارای عملکردهای حفاظتی و انتقالی هستند، ریشه‌ها سبب لنگراندازی و جذب و ذخیره‌سازی مواد غذایی می‌شوند، برگ‌ها، جایگاه‌های فتوسنتز هستند و گل‌ها، ساختارهای تولیدمثلی را احاطه کرده‌اند. بنابراین در سطح سلول، بافت و اندام، گیاهان عموماً پیچیدگی کمتری از اکثر حیوانات دارند.

با این حال، برخلاف حیوانات، گیاهان نمی‌توانند عمل جایگزین کردن یا ترمیم سلول‌ها یا بافت‌های پیر یا آسیب دیده را انجام دهند و آن‌ها به طور بسیار ساده، اندام‌های جدید را پرورش می‌دهند. در حقیقت، سرنوشت تکاملی هر سلول گیاهی در ابتدا براساس موقعیت آن در ارگانیسم نسبت به دودمان آن‌ها (فصل ۲۱) تعیین می‌شود، در حالی که هر دو این موارد در جانوران

اهمیت دارند. بنابراین هم در جانوران و هم در گیاهان، یک ارتباط مستقیم سلولی با سلول‌های مجاور آن، اهمیت دارد. مهمترین نکته در این فصل برخلاف جانوران، این است که تعداد کمی از سلول ها در گیاهان به طور مستقیم و توسط مولکول‌هایی که در داخل غشا پلاسمایی‌شان قرار گرفته‌اند بهم اتصال دارند. به طور عکس، سلول‌های گیاهی به طور معمول توسط یک **دیواره سلولی** که دیواره‌های سلولی سلول‌های مجاور را به هم متصل می‌کند، احاطه شده‌اند (شکل ۱۹ـ۳۷a). همچنین، برخلاف سلول‌های جانوری، یک سلول گیاهی به طور نادری، موقعیتش نسبت به سلول‌های دیگر موجود زنده تغییر می‌کند. این ویژگی‌های گیاهان و سازمان‌یابی به آن ها مکانیسم‌های مولکولی مجزایی را مشخص نموده است که توسط آنها، سلول ها به صورت بافت ها آرایش می‌یابند و با همدیگر ارتباط می‌یابند.

دیواره سلول گیاهی یک صفحه از فیبریل‌های سلولز در یک ماتریکسی از گلیکوپروتئین‌هاست.

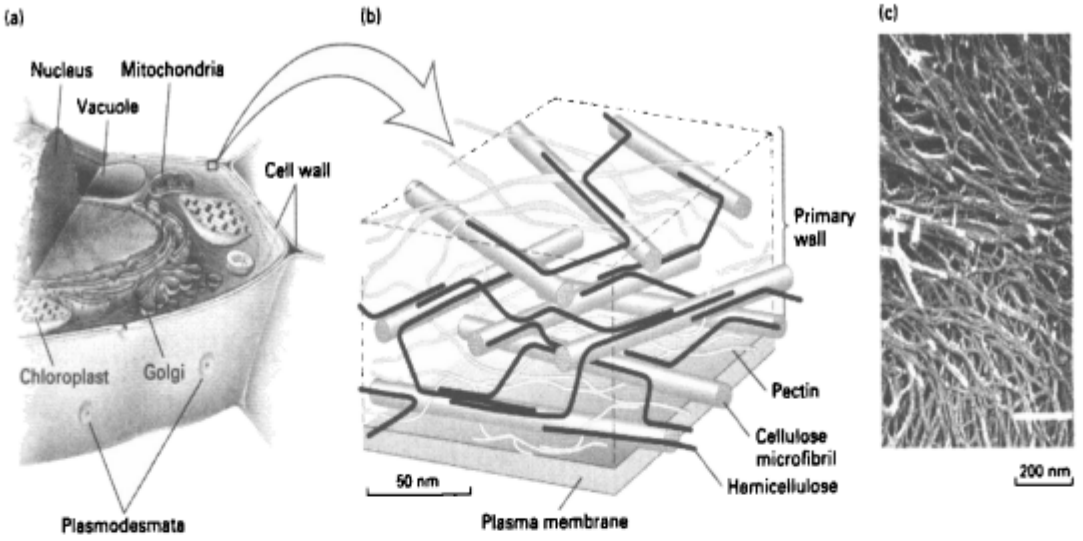
ماتریکس خارج سلولی گیاهان، یا دیواره سلولی که اساساً از پلی ساکارید ها تشکیل شده است و ضخامت آن $\approx ۰/۲\mu m$ است قسمت خارجی غشای پلاسمایی گیاهان را به طور کلی می‌پوشاند. این ساختار، تعدادی از اعمال مشابه با آنهایی که ECM تولید شده توسط سلول‌های جانوری انجام می‌دهد را ایفا می‌کند، حتی با وجود ساختارهایی که از لحاظ مولکولی کاملاً متفاوت از هم هستند و دارای یک سازمان‌یابی متفاوت می‌باشند. حدود ۱۰۰۰ ژن در گیاه آرابیدوپسیس برای سنتز و عملکرد دیواره سلولی آن به کار گرفته می‌شود که دارای تقریباً ۴۱۴ ژن گلیکوزیل ترانسفراز و بیش از ۳۱۶ ژن گلیکوزیل هیدروژناز می‌باشد. همانند ECM سلول جانوری، دیواره سلولی گیاه، سلول ها را به صورت بافت بهم پیوند داده و پیام ها را برای رشد و تقسیم شدن به سلول گیاهی می‌دهد و شکل اندام‌های گیاهی را کنترل می‌کند. این دیواره یک ساختار پویاست که نقش‌های مهمی را در کنترل تمایز سلول‌های گیاهی در طی جنین‌زایی و رشد انجام می‌دهد و سدی را برای محافظت در برابر عفونت‌های بیماریزا ایجاد می‌کند. همانطور که ماتریکس خارج سلولی به تعیین شکل سلول‌های گیاهی کمک می‌کند، دیواره سلولی نیز شکل سلول‌های گیاهی را تعیین می‌کند. زمانی که دیواره سلولی توسط آنزیم‌های هیدرولاز از روی سلول‌های گیاهی هضم می‌شود، سلول‌های کروی که توسط یک غشای پلاسمایی احاطه شده‌اند به همان صورت باقی می‌مانند.

به دلیل نقش مهم دیواره سلول گیاهی در برابر تحمل فشار اسموتیک تورگور سلول (بین ۱۴/۵ و ۴۳۵ پوند درهر اینچ مربع!)، دیواره سلولی برای برقراری استحکام جانبی ساخته شده است. این دیواره به صورت لایه‌ای از میکروفیبریل‌های سلولز دستجات حاوی ۳۶ـ۳۰ زنجیره از پلیمرهای طویل (بیش از $۷\mu m$ یا بزرگتر)، خطی و غنی از پیوندهای هیدروژن گلوکز در اتصالات βگلیکوزیدی می‌باشد. میکروفیبریل‌های سلولز در یک ماتریکسی متشکل از پکتین، پلیمری از D-گالاکتورونیک اسید و سایر مونوساکاریدها، و همی سلولز، (یک پلیمر کوتاه و پرشاخه و متشکل از چندین منوساکارید پنج و شش کربنه)، احاطه شده‌اند. قدرت مکانیکی دیواره سلولی به اتصالات عرضی میکروفیبریل ها به وسیله زنجیره‌های همی سلولز بستگی دارد (شکل c و ۱۹ـ۳۷b). لایه لایه‌ی میکروفیبریل ها مانع از استحکام جانبی دیواره سلولی می‌شود. میکروفیبریل‌های سلولزی که روی سطح اگزوپلاسمیک غشای پلاسمایی سنتز می‌شوند از UDP-گلوکز و ADP-گلوکز در سیتوزل تشکیل می‌شوند. آنزیم پلیمریزه کننده که سلولز سنتاز نام دارد، در عرض غشای پلاسمایی و در امتداد شیارهای ناشی از میکروتوبول‌های داخل سلولی به صورتی که سلولز تشکیل داده است، حرکت می‌کنند و یک مکانیسم مجزا برای ارتباطات داخل سلولی/ خارج سلولی ایجاد می‌نمایند.

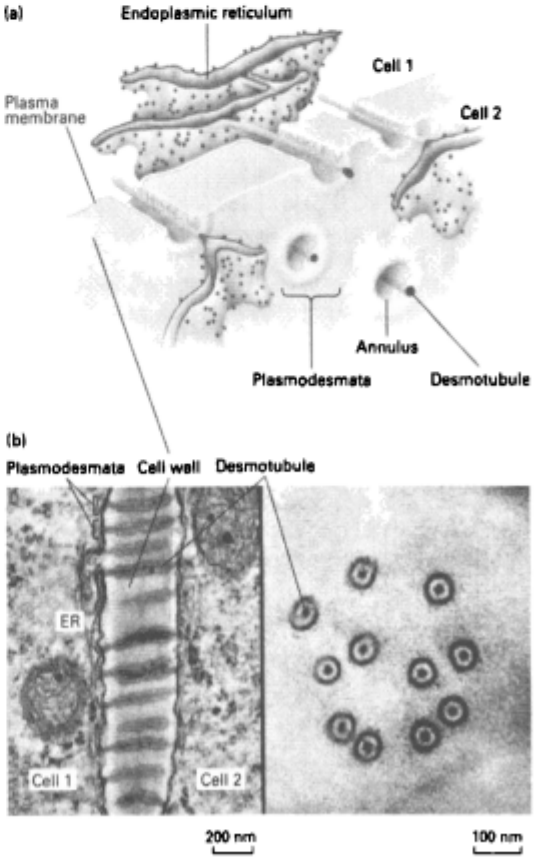
برخلاف سلولز، پکتین و همی‌سلولز در دستگاه گلژی سنتز شده و به سطح سلول انتقال می‌یابند و در آنجا یک شبکه به هم پیوسته تشکیل می‌دهند که به دیواره‌های سلول‌های مجاور کمک می‌کند که به هم متصل شوند و مانع از اصطکاک آن ها می‌شود. زمانی که آن ها را تخلیص می‌کنیم، پکتین به آب اتصال یافته و یک ژل در حضور Ca^{2+} و یون‌های بورات تشکیل می‌دهد.

بنابراین پکتین ها را در اکثر غذاهای پردازش‌شده استفاده می‌کنند. بیش از ۱۵ درصد دیواره سلولی ممکن است از اکستنسین[1] تشکیل شده باشد که یک گلیکوپروتئین حاوی مقادیر زیادی سرین و هیدروکسی پرولین است. اکثر ریشه‌های هیدروکسی پرولین به زنجیره‌های کوتاه آرابینوز (یک منوساکارید پنج کربنه) متصل شده‌اند و ریشه‌های سرین به گالاکتوز اتصال دارند. ۶۵ درصد از وزن اکستنسین را کربوهیدرات تشکیل می‌دهد و پایه پروتئینی آن یک مارپیچ میله مانند گسترده‌ای را تشکیل می‌دهد که کربوهیدارت‌های با اتصال O یا هیدروکسیل به سمت خارج آن جهت‌گیری کرده‌اند. لیگنین (یک پلیمر پیچیده و نامحلول از ریشه‌های فنولیک) با سلولز اتصال یافته و یک ماده استحکام بخش می‌باشد. همانند پروتئوگلیکان‌های غضروف، لیگنین در برابر نیروهای فشاری وارد شونده بر ماتریکس مقاومت می‌کند.

1- Extension



▲ **شکل ۳۷ـ۱۹ ساختمان دیواره سلول گیاهی.** (a) مروری بر سازمان‌یابی یک سلول گیاهی معمول که در آن سلول پر از اندامک به همراه غشای پلاسمایی‌اش توسط یک ماتریکس خارج سلولی که به خوبی شناخته شده است و دیواره سلولی نام دارد احاطه شده است. (b) تصویر شماتیک دیواره سلولی یک پیاز. سلولز و همی سلولز دست کم در سه لایه در یک ماتریکسی از پلیمرهای پکتین آرایش می‌یابند. اندازه پلیمر ها و فواصل آن ها به صورت یک شکل مجزا نمایش داده شده است. به منظور ساده‌تر شدن تصویر، بیشتر اتصالات عرضی همی سلولز و سایر محتویات ماتریکس (مثل کستنسین و لیگنین) نشان داده نشده‌اند. (c) میکروگراف الکترونی از برش عمیق و انجماد سریع دیواره سلولی نخود باغچه‌ای که تعدادی از پلی ساکاریدهای پکتین توسط تیمارشیمیایی حذف شده‌اند. رشته‌های بسیار ضخیم‌تر، میکروفیبریل‌های سلولز هستند و رشته‌های نازک‌تر اتصالات عرضی همی سلولز می‌باشند (پیکان‌ها).



◀ **شکل ۳۸ـ۱۹ پلاسمودسماتا.** (a) طرح شماتیک پلاسمودسماتا که دسموتوبول (یک ناحیه گسترده از شبکه اندوپلاسمیک (ER)) و آنولوس (یک کانال مفروش شده از غشا پلاسمایی را که پر از سیتوزولی است) که سیتوزل‌های سلول‌های مجاور را بهم مرتبط می‌کند را نشان می‌دهد. (b) میکروگراف‌های الکترونی از برش‌های باریک یک برگ شوکران (پراکت ها نشان‌دهنده پلاسمودسماتاهای مجزا هستند). (چپ) نگاه طولی نشان دهنده ER و دسموتوبول است که از هر آنولوس، بیرون زده است. (راست) نگاه عمودی به برش عرضی پلاسمودسماتا که در آن تعدادی از ساختارهای پره چرخ spoke متصل‌کننده غشای پلاسمایی به دسموتوبول را می‌توان مشاهده نمود.

دیواره سلولی یک فیلتر انتخابی است که نفوذپذیری آن به میزان زیادی توسط پکتین ها در ماتریکس دیواره کنترل می‌شود. در حالی که آب و یون ها به آسانی از میان دیواره‌های سلولی انتشار می‌یابند، انتشار مولکول‌های بزرگ از قبیل پروتئین‌های بزرگتر از ۲۰kDa، محدود شده است. این محدودیت ممکن است دلیلی بر این امر باشد که چرا اکثر هورمون‌های گیاهی مولکول‌هایی کوچک و

محلول در آبند که می‌توانند از عرض دیواره سلولی عبور کنند و با گیرنده‌های غشای پلاسمایی سلول‌های گیاهی برهمکنش کنند.

از دست رفتن دیواره سلولی، به سلول گیاهی اجازه رشد می‌دهد

به دلیل آنکه دیواره سلولی احاطه کننده یک سلول گیاهی مانع از گسترش آن می‌شود، ساختار دیواره باید زمانی که سلول رشد می‌کند از بین برود. مقدار، نوع و جهت رشد سلول گیاهی توسط مولکول‌های هورمونی کوچک (مثل ایندول استیک اسید) که اکسین ها نام دارند تنظیم می‌شود. تضعیف القا شده توسط اکسین دیواره سلولی اجازه انبساط واکوئل داخل سلولی را به واسطه برداشت آب فراهم کرده که منجر به طویل شدن سلول می‌شود.

می‌توان این پدیده را توسط بزرگنمایی آن بهتر درک نمود که با توجه به این امر که اگر تمام سلول ها در درخت red wood به اندازه یک سلول معمولی کبد کوچک شوند، درخت دارای یک ماکزیمم بزرگی به اندازه فقط یک متر خواهد شد.

دیواره سلولی در محل مریستم راس ریشه یا ساقه تحت بیشترین و بزرگترین تغییرات قرار می‌گیرد. این نقاط جایگاه‌هایی هستند که سلول ها در آنجا تقسیم شده و رشد می‌کنند. سلول‌های مریستمی جوان توسط دایره‌های سلولی اولیه نازک به هم متصل شده‌اند که می‌توانند در پاسخ به طویل‌سازی نهایی سلول، از بین بروند و کشیده شوند. پس از آنکه طویل‌سازی سلول خاتمه یافت، دیواره سلولی عموماً ضخیم می‌شود که این امر یا توسط ترشح ماکرومولکول‌های اضافی به داخل دیواره اولیه و یا معمولاً توسط تشکیل یک دیواره ثانویه که متشکل از چندین لایه است انجام می‌شود. اکثر سلول ها سرانجام از بین می‌روند و تنها دیواره سلولی در بافت‌های بالغ از جمله گزیلم (لوله‌هایی که نمک ها و آب را توسط ساقه ها از ریشه به برگ ها هدایت می‌کنند) باقی می‌ماند. خصوصیات منحصر به فرد چوب و فیبرهای گیاهی از جمله کتان در نتیجه ویژگی‌های مولکولی دیواره‌های سلولی در بافت‌های مبدأ حاصل می‌شود.

پلاسمودسماتا در گیاهان بزرگتر، سبب اتصال مستقیم سیتوزول‌های سلول‌های مجاور بهم می‌شود

وجود یک دیواره سلولی جداکننده سلول ها در گیاهان سدی را در برقراری ارتباط سلول - سلول ایجاد می‌کند و بنابراین تمایز نوع سلول مثل حیوانات انجام نمی‌شود. یک مکانیسم مجزا که توسط سلول ها در برقراری ارتباط مستقیم انجام می‌شود، توسط اتصالات سلول - سلول اختصاصی که **پلاسمودسماتا** نامیده می‌شوند رخ می‌دهد که از میان دیواره سلولی عبور می‌کند. پلاسمودسماتاها همانند اتصالات شکافدار، کانال‌هایی هستند که سیتوزول یک سلول را با سیتوزول یک سلول مجاور اتصال می‌دهند. قطر کانال چیزی در حدود ۳۰-۶۰nm است و طول آن متغیر بوده و بزرگتر از ۱μm می‌باشد. تراکم پلاسمودسماتا ها بسته به نوع گیاه و سلول متغیر بوده و حتی کوچکترین سلول‌های مریستمی دارای بیش از ۱۰۰۰ اتصال با سلول‌های مجاورشان هستند. اگرچه طیف وسیعی از پروتئین ها که از لحاظ فیزیکی یا عملکردی با پلاسمودسماتا مرتبط هستند شناسایی شده‌اند ولی اجزاء پروتئینی ساختمانی کلیدی پلاسمودسماتا هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند.

مولکول‌های کوچکتر از حدود ۱۰۰۰Da، شامل طیفی از ترکیبات متابولیک و پیام‌رسان (یون‌ها، قندها، اسیدهای آمینه)، عموماً می‌توانند توسط پلاسمودسماتا انتشار یابند. به این ترتیب، اندازه کانال توسط مولکول‌هایی که از آن عبور می‌کنند به میزان زیادی تنظیم می‌شود. در برخی از مواقع، کانال بسته است؛ و در سایر موارد کانال به اندازه کافی برای اجازه عبور به مولکول‌های بزرگتر از ۱۰۰۰۰Da نیز اتساع می‌یابد. از میان فاکتورهایی که روی نفوذپذیری پلاسمودسماتا اثر می‌گذارند، غلظت Ca^{2+} سیتوزولی می‌باشد که افزایش در Ca^{2+} سیتوزولی به طور برگشت‌پذیر انتقال مولکول ها را توسط این ساختار ها مهار می‌کند.

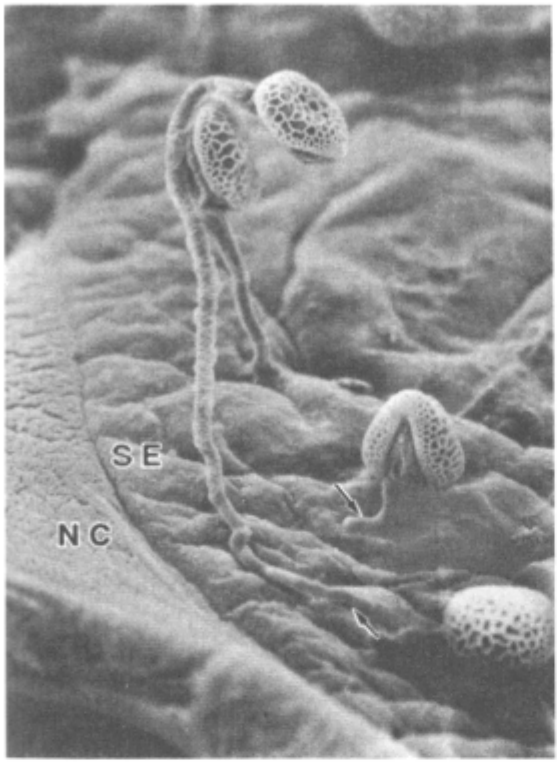
اگرچه پلاسمودسماتا و اتصالات شکافدار از لحاظ عملکردی با هم طوری آرایش می‌یابند که کانالی برای انتشار مولکول‌های کوچک ایجاد شود، ولی ساختارهایشان به طور برجسته‌ای در دو مورد مشخص با هم تفاوت دارند (شکل ۳۸-۱۹). غشاهای پلاسمایی سلول‌های گیاهی مجاور برای تشکیل یک کانال پیوسته (آنولوس) در هر پلاسمودسماتا، با هم یکی می‌شوند، در حالی که غشاهای سلول ها در یک اتصال شکافدار با هم به طور پیوسته اتصال نمی‌یابند. به علاوه، پلاسمودسماتا خصوصیات عملکردی و ساختمانی پیچیده‌تری را از خود نشان می‌دهند. به عنوان مثال، پلاسمودسماتا ها در داخل خود دارای یک پیشروندگی از شبکه اندوپلاسمی هستند که دسموتوبول نام دارد و از میان آنولوس عبور می‌کند و سبب اتصال سیتوزول‌های سلول‌های گیاهی مجاور هم می‌شود. پلاسمودسماتا همچنین دارای یک طیف وسیع از پروتئین‌های تخصص یافته در داخل کانال هستند که به خارج از طول کانال می‌آیند و شامل پروتئین‌های اسکلت سلول، پروتئین‌های

حرکتی و پروتئین‌های لنگری هستند که اندازه و نوع مولکول‌هایی که می‌توانند از میان کانال عبور کنند را تنظیم می‌کنند. اکثر انواع مولکول‌هایی که از یک سلول به سلول دیگر توسط پلاسمودسماتا توزیع می‌شوند شامل پروتئین‌هایی هستند که پروتئین‌های NCAPs[1]، شامل برخی از فاکتورهای رونویسی، کمپلکس‌های اسید نوکلئیک / پروتئین، فرآورده‌های متابولیک و ویروس‌های گیاهی می‌باشند. به نظر می‌رسد که برخی از این‌ها نیازمند چاپرون‌های ویژه‌ای هستند تا انتقال را تسهیل کنند. کینازهای اختصاصی هم ممکن است با فسفریله کردن محتویات پلاسمودسماتا، فعالیت‌های آن‌ها را (مثل باز شدن کانال‌ها) تنظیم کنند. مولکول‌های محلول توسط آنولوس سیتوزولی، (قطری حدود ۳ـ۴nm) که میان غشا پلاسمایی و دسموتوبول را مفروش کرده است عبور می‌کنند، در حالی که مولکول‌های محصور در غشا یا پروتئین‌های ویژه در داخل لومن ER می‌توانند توسط دسموتوبول از سلولی به سلول دیگر انتقال یابند. به نظر می‌رسد که پلاسمودسماتا یک نقش بسیار مهمی در تنظیم توسعه سلول‌ها و بافت‌های گیاهی ایفا می‌کند، طبق آنچه که توسط توانایی آن‌ها در وساطت انتقال داخل سلولی فاکتورهای رونویسی و کمپلکس‌های پروتئین ریبونوکلئاز پیشنهاد شده است.

تنها تعداد کمی از مولکول‌های اتصالی در گیاهان مشخص شده‌اند

تحلیل سیستماتیک ژنوم آرابیدوپسیس و تحلیل بیوشیمیایی سایر گونه‌های گیاهی هیچ مدرکی را دال بر وجود شباهت گیاهان با CAMsها (گیرنده‌های چسبندگی و محتویات ECM جانوران) نشان نمی‌دهد. این یافته‌ها تعجب آور نیستند و اشاره به طبیعت فوق العاده متفاوت برهمکنش‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس/ دیواره در حیوانات و گیاهان دارد.

در میان پروتئین‌های نوع چسبندگی که ظاهراً منحصر به گیاهان هستند، پنج کیناز متصل به غشا (WAKs) و پروتئین‌های شبه -WAK را می‌توان نام برد که در غشا پلاسمایی سلول‌های آرابیدوپسیس بیان می‌شوند. نواحی خارج سلولی در تمامی این پروتئین‌ها حاوی تکرارهای فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) چندگانه است که غالباً درگیرنده‌های سطح سلول جانوران که مستقیماً در اتصال به سایر مولکول‌ها مشارکت دارند می‌باشند. برخی از WADs به پروتئین‌های غنی از گلایسین در دیواره سلولی اتصال می‌یابند، بنابراین اتصالات غشا - دیواره را وساطت می‌کنند. این



▲**شکل تجربی ۳۹ـ۱۹ در یک بررسی *In Vitro* مولکول‌های مشابهی که برای چسبندگی لوله‌های گرده به ماتریکس Stylar موردنیاز بودند به کار گرفته شد.** در این بررسی، ماتریکس خارج سلولی Stylar از خامه‌های (SE)lily با یک ماتریکس مصنوعی که در غشاهای نیتروسلولز خیس شده بود (NC) استفاده شد. سپس لوله‌های گرده حاوی اسپرم به آنها اضافه شده و اتصال آن‌ها به ماتریکس خیس شده، بررسی گردید. در این میکروگراف الکترونی، نوک‌های لوله‌های گرده (پیکان‌ها) می‌توانند در اتصال با ماتریکس stylar خیس شده دیده شوند. این نوع بررسی نشان می‌دهد که چسبیدن گرده به پروتئین چسباننده غنی از سیستئین اسیتگیما/ Stylar (SCA) و یک پکتین متصل شونده به SCA بستگی دارد.

پروتئین‌های آرابیدوپسیس دارای یک دُمین غشا گذر منفرد و یک دُمین تیروزین کینازی سیتوزلی داخل سلولی هستند که اکثرا در مسیرهای پیام رسانی مشارکت دارند و گاهی مشابه گیرنده‌های تیروزین کینازی شرح داده شده در فصل ۱۶ هستند.

در نتیجهٔ ادغام نتایج حاصل از بررسی‌های in vitro با مطالعات *In Vivo* و تحلیل جهش‌های گیاهی، چندین ماکرومولکول در ECM که برای چسبندگی اهمیت دارد شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال، اتصال نرمال گرده که حاوی سلول‌های اسپرم

1- Non-cell-autonamous proteins

است به استیگما یا استیلار در اندام تولیدمثلی ماده Easterlily، نیازمند یک پروتئین غنی از سیستئین بنام چسباننده غنی از سیستئین استگیما/ Stylar[1] (SCA) و یک پکتین تخصص یافته متصل شونده به SCA است (شکل ۳۹-۱۹). یک پروتئین کوچک که احتمالاً توسط ECM احاطه شده است و حدودا ۱۰kDa بوده و کیموسیانین[2] نام دارد، در اتصال با SCA عمل می‌کند و به انتقال مستقیم لوله گرده حاوی اسپرم (کموتاکسی) به تخمدان کمک می‌کند.

تخریب ژن کدکننده گلوکورونیل ترانسفراز (آنزیم کلیدی در بیوسنتز پکتین) یک شرح کامل از اهمیت پکتین ها در چسبندگی بین سلولی در مریستم‌های گیاهی فراهم آورده است. به طور معمول، مولکول‌های تخصص یافته پکتین، به نگه داشتن سلول ها در هر سیستم به صورت بسیار محکم به هم، کمک می‌کنند. زمانی که این سلول ها به صورت یک توده از سلول‌های نسبتاً تمایز نیافته در محیط کشت رشد می‌کنند سلول‌های سالم مریستم به طور محکم بهم چسبیده و می‌توانند به صورت سلول‌های تولیدکننده کلروفیل تمایز یابند که یک کالوس با رنگ سبز را ایجاد می‌کنند. سرانجام کالوس برگ ها را تولید می‌کند. برعکس، سلول‌های جهش یافته که دارای یک ژن غیرفعال گلوکورونیل ترانسفراز هستند، به صورت دراز و با اتصال بسیار ضعیفی به هم در می‌آیند و به صورت سالم تمایز نمی‌یابند و یک کالوس زردرنگ را تشکیل می‌دهند. تزریق یک ژن گلوکورونیل ترانسفراز نرمال به درون یک سلول جهش یافته، توانایی چسبندگی و تمایز نرمال را به آن بر می‌گرداند.

کم بودن تعداد مولکول‌های چسبندگی گیاهی که امروزه مشخص شده است، برخلاف اکثر مولکول‌های چسبندگی جانوری که به خوبی شناسایی شده‌اند، ممکن است منجر به مشکلات تکنیکی در کار کردن با دیواره سلول ECM گیاهان گردد. برهمکنش‌های چسبندگی احتمالاً نقش‌های متفاوتی را در زیست‌شناسی گیاهان و جانوران حداقل در قسمتی از آن به دلیل تفاوت‌های آن ها در تکوین و فیزیولوژی بازی می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۶-۱۹

بافت‌های گیاهی

- تجمع سلول‌ها در بافت‌ها در گیاهان به طور اساسی با بافت‌های حیوانی متفاوت است زیرا که هر سلول گیاهی بوسیله یک دیواره سلول نسبتاً سخت احاطه شده است.
- دیوارهٔ سلول گیاهی حاوی لایه‌هایی از میوفیبریلهای سلولز است که در یک ماتریکسی از همی‌سلولز، پکتین، اکستنسین و سایر مولکول‌های فراوان با مقادیر اندک قرار گرفته است.
- سلولز، پلیمر بزرگ و خطی گلوکز، به طور خودبه‌خودی به صورت میکروفیبریل‌هایی که توسط پیوندهای هیدروژنی پایدار می‌شوند همایش می‌یابد.
- دیواره سلولی، شکل سلول را تعیین کرده و طویل‌شدن آنها را محدود می‌کند. از بین رفتن دیواره سلولی بواسطه اثر اُکسین، باعث طویل شدن سلول می‌شود.
- دوتا سلول گیاهی مجاور می‌توانند توسط پلاسمودسماتا با هم ارتباط برقرار کنند. پلاسمودسماتا باعث عبور مولکول‌ها از میان کانال‌های کمپلکسی ارتباط‌دهندهٔ سیتوزولها سلول‌های مجاور می‌شود (شکل ۳۵-۱۹ راملاحظه کنید).
- گیاهان نمی‌توانند مولکول‌های چسبندگی مشابه یافت شده در جانوری را تولید کنند. فقط تعداد کمی از مولکول‌های چسبندگی در گیاهان تا به امروز شناسایی شده است.

چشم‌اندازی به آینده

یک فهم عمیق‌تر از قرارگیری سلول ها به صورت بافت ها در موجودات زنده پیچیده، توسط تکنیک‌هایی که همگی زیرمجموعه‌ای از زیست‌شناسی سلولی مولکولی (بیوشیمی، بیوفیزیک، روش‌های میکروسکوپی، ژنتیک، ژنومیک، پروتئومیکس و زیست‌شناسی تکاملی) هستند به همراه مهندسی زیستی و علم کامپیوتر تکمیل می‌شود. این ناحیه از زیست‌شناسی سلولی، تحت نظر پدیده رشد قرار دارد.

یک دسته مهم از سؤالات آینده مرتبط با مکانیسم‌هایی هستند که توسط آن ها سلول ها مشخص شده و به نیروهای مکانیکی که روی آن ها و ماتریکس خارج سلولی اعمال می‌شود پاسخ می‌دهند، مثل اثر آرایش‌های سه بعدی آن ها و برهمکنش‌های میان آنها. یک سؤال مرتبط در این زمینه این است که این اطلاعات چگونه برای کنترل ساختمان عملکرد سلول و بافت به کار گرفته می‌شود. این موضوع دربرگیرنده زمینه‌هایی از بیومکانیک و هدایت مکانیکی می‌باشد. shear یا سایر استرس ها می‌تواند الگوهای بیان ژنی و رشد سلولی مجزایی را القا کرده و می‌تواند در ابعاد وسیع‌تر متابولیسم سلولی و پاسخ به محرک‌های خارج سلولی را تغییر دهد. کانال‌های کاتیونی غیرانتخابی حساس به نیروهای مکانیکی (NSC_{MS})،

1- Stigma/styler cystein rich adhesin

2- Chymocyanin

کمترین تعدادی که به نظر می‌رسد اعضای خانواده کانال‌های کاتیونی گیرنده انتقالی پتانسیل (TRP) هستند که توسط کشش غشای پلاسمایی فعال شده و اجزاء مهمی در هدایت مکانیکی، همانند انواعی که در حس کردن صدا در گوش نقش دارند می‌باشند که در حقیقت عملشان توسط کادهرین‌های ویژه وساطت می‌شود. اکثر کلاس‌های مولکولی که در این فصل شرح داده شد (ECM، گیرندگان چسبندگی، آداپتورهای داخل سلولی و اسکلت سلولی) به نظر می‌رسد که نقش‌های حیاتی را را در حس کردن نیروهای مکانیکی و هدایت مکانیکی ایفا می‌کنند. تحقیقات بیشتر باید اطلاعات بیشتری را در مورد نقش‌های سازمان‌یابی سه بعدی سلول ها و محتویات ECM و عملکرد نیرو ها روی وضعیت‌های سالم و پاتولوژیکی آن ها در کنترل ساختار ها و فعالیت‌های بافت‌ها، به دست دهد. به کار بردن چنین فهمی، روش‌های جدیدی را فراهم می‌کند تا بدان وسیله بتوان به شرح زیست‌شناسی پایه‌ای سلول / بافت پرداخت و تکنولوژی‌های پیشرفته‌ای برای تحقیق در مورد درمان‌های جدید بیماری‌ها، ایجاد می‌کند.

اگرچه اتصالات نقش کلیدی در تشکیل بافت‌های اپی‌تلیال پایدار و تعیین شکل و خصوصیات عملکردی اپی‌تلیا، بازی می‌کنند، اما آن ها ساکن نیستند. بازآرایی به معنای جایگزین شدن مولکول‌های فرسوده با مولکول‌هایی که اخیرا سنتز شده‌اند می‌باشد و خصوصیات پویای اتصالات سبب باز شدن دریچه در زمانی که نیاز است (انتقال اپی‌تلیال - مزانشینال در طی تکامل، ترمیم زخم ها و غیره) به واسطه تغییرات قابل توجهی صورت می‌گیرد. فهم مکانیسم‌های مولکولی که تحت اثر ارتباطات میان تغییرات پایداری و پویایی قرار دارند، بینش‌های جدیدی را ایجاد می‌کنند که به سمت ریخت زایی و نگهداری هویت بافتی و عملکرد آن و پاسخ (یا تحریک در برابر) بیماری ها جهت‌گیری می‌نماید.

سؤالات بیشماری در ارتباط با پیام رسانی داخل سلولی از CAMs ها و گیرنده‌های چسبندگی وجود دارد. چنین پیام رسانی باید با سایر مسیرهای پیام رسانی سلولی که توسط پیام‌های خارجی مختلف (مثل فاکتورهای رشد) تکمیل می‌شود. بنابراین سلول به صورت مناسب و در یک مدل هماهنگ به بسیاری از محرک‌های مختلف خارجی و داخلی که به طور همزمان به سلول عرضه می‌شوند، پاسخ می‌دهد. به نظر می‌رسد که پروتئین‌های GTPase کوچک دست کم در تعدادی از مسیرهای مکمل مرتبط با پیام رسانی میان اتصالات سلولی شرکت می‌کنند. این چرخه ها چگونه عمل می‌کنند که اجازه ارتباط متقابل میان مسیرهای پیام رسانی متفاوت را فراهم می‌کنند؟ چگونه ترکیب پیام رسانی خارج به داخل و داخل به خارج که توسط CAMs و گیرنده‌های چسبندگی وساطت می‌شود به صورت چنین چرخه‌هایی با هم یکی می‌شوند؟

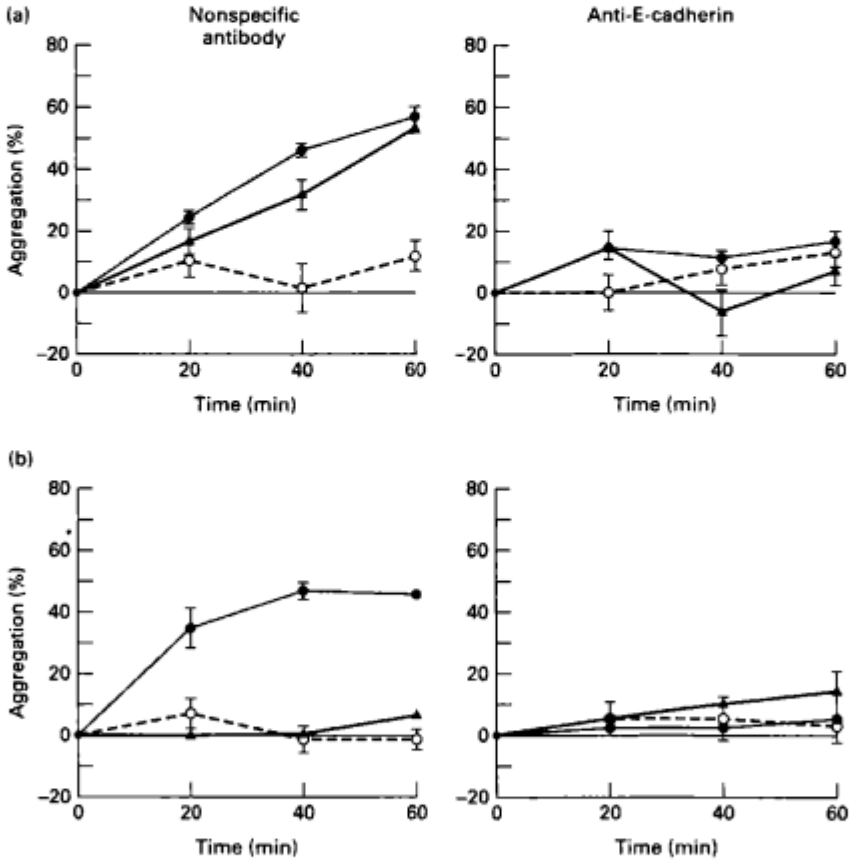
ما می‌توانیم انتظار پیشرفت روزافزون در شرح اثر گلیکوبیولوژی (مطالعات زیست‌شناسی الیگو و پلی ساکاریدها) روی بیولوژی سلولی را داشته باشیم. اهمیت توالی‌های GAG تخصص یافته در کنترل فعالیت‌های سلولی خصوصاً برهمکنش‌های میان برخی از فاکتورهای رشد و گیرندگان آنها، هم اکنون به خوبی مشخص شده است. با شناسایی مکانیسم‌های بیوسنتتیک که توسط آن ها چنین ساختارهای پیچیده‌ای ساخته می‌شود و توسعه ابزارهایی برای ساخت مصنوعی ساختارهای GAG و امتحان کردن عملکرد آن ها در سیستم‌های محیط کشت و حیوانات کامل، می‌توانیم انتظار یک افزایش برجسته در اطلاعاتمان روی زیست‌شناسی سلولی GAGs ها در چندین سال آینده را داشته باشیم. هنوز هم نکات زیادی برای فهمیدن در مورد بیوسنتز، ساختار ها و عملکردهای بسیاری از گلیکوکنژوگه‌های دیگر از جمله قندهای با اتصال -O روی دیستروگلیکان‌هایی که برای اتصال آن ها به لیگاندهای ECMشان ضروری است (لامینین و غیره) باقی مانده است.

یک نشانه ساختاری از CAMs و گیرنده‌های چسبندگی و پروتئین‌های ECM، وجود چند دُمین است که اعمال متفاوتی را به عنوان یک زنجیره پلی پپتیدی مجزا انجام می‌دهد. این امر عموماً پذیرفته شده است که چنین پروتئین‌های چند دُمین‌ی از لحاظ تکاملی توسط آرایش توالیهای DNAمجزای کدکننده دُمین‌های مجزاء منشاء گرفته است. ژن‌های کدکننده دُمین‌های چندتایی، فرصت‌هایی را برای ساخت توالی‌های بیشمار و تنوعات عملکردی، توسط پردازش‌های متناوب و استفاده از پروموترهای کارآمد در داخل یک ژن ایجاد نموده است. بنابراین حتی در میان تعدادی از ژن‌های غیروابسته در ژنوم انسان که به نظر می‌رسد به طور شگفت‌انگیزی در مقایسه با سایر موجودات کوچک‌تر است، مولکول‌های پروتئینی بیشتری را بتوان نسبت به تعداد ژن‌هایی که حدس زده‌ایم، تولید نمود. به نظر می‌رسد که چنین تنوعی برای تولید پروتئین‌هایی که در اختصاصی کردن اتصالات چسبندگی در سیستم عصبی و خصوصاً مغز به کار گرفته می‌شوند بسیار مناسب و سودمند است. در حقیقت، گروه‌های چندگانه از پروتئین ها که توسط اعصاب بیان می‌شوند، به نظر می‌رسد که فقط چنین ساختارهای متنوع ترکیبی را دارند. آن ها شامل پروتوکادهرین‌ها، خانواده‌ای از کادهرین ها به همراه بسیاری از پروتئین‌هایی که در هر ژن کد می‌شود (۱۹-۱۴ برای سه ژن در

پستانداران) و نوروکسین ها که از بیش از ۱۰۰۰ پروتئین تشکیل شده‌اند و توسط سه ژن کد می‌شوند و Dscams، عضوی از سوپرفامیلی IgCAM که توسط یک ژن در دروزوفیلا که توانایی بیان ۳۸۰۱۶ پروتئین مجزا را به وسیله پردازش متناوب داراست بیان می‌گردد. یک هدف ادامه‌دار برای کارهای آینده، شرح و درک اساس مولکولی اتصالات کارآمد سلول - سلول و سلول - ماتریکس («سیم کشی») در سیستم عصبی خواهد بود و اینکه چگونه این سیم کشی سرانجام سبب کنترل پیچیده عصبی می‌شود که در حقیقت کلید فهم بیولوژی سلولی مولکولی می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده ها

محققان دو ایزوفرم جهش یافته E-کادهرین را جداسازی نموده‌اند که به نظر می‌رسد به صورتی متفاوت از ایزوفرم تیپ وحشی E-کادهرین عمل می‌کنند. یک دودمان سلولی کارسینومای پستان که از نظر E-کادهرین منفی است با ژن‌های E-کادهرینه A (قسمت a در شکل، مثلث‌ها) B (قسمت b) (مثلث‌ها) یا ژن تیپ وحشی E-کادهرین (دایره‌های سیاه) مخلوط شده و با سلول‌های مخلوط نشده (دایره‌های باز) در یک بررسی با هم مقایسه شدند. در این بررسی، سلول ها در ابتدا توسط تیمار با تریسپین از هم جدا شده و سپس به آن ها اجازه داده شد که در یک دوره یک دقیقه‌ای در محلول با هم تجمع یابند. تجمع سلول ها از جهش یافته‌های A و B به ترتیب در نمودارهای a و b نشان داده شده‌اند. به منظور مشخص نمودن اتصالات مشاهده شده که توسط کادهرین وساطت شده بودند، سلول ها در ابتدا با یک آنتی بادی غیراختصاصی (نمودار چپ) یا



یک آنتی بادی منوکلونال مهارکننده عملکرد بر ضد E-کادهرین (نمودار راست) تیمار شدند.

a. چرا سلول‌های مخلوط شده با ژن E-کادهرین تیپ وحشی، تجمع بیشتری نسبت به سلول‌های کنترل مخلوط نشده دارند؟

b. از این داده‌ها، در مورد عملکرد جهش یافته‌های A و B چه استنتاجی می‌توان کرد؟

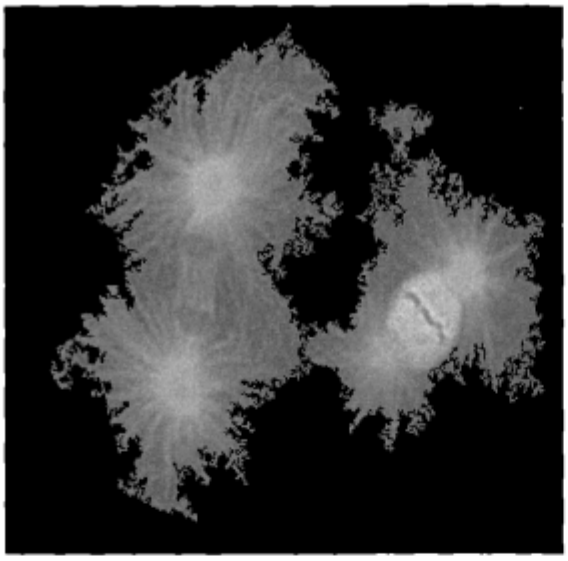
c. چرا اضافه کردن آنتی بادی مونوکلونال ضد E-کادهرین و نه آنتی بادی غیراختصاصی، این تجمع را مهار نمود؟

d. اگر این بررسی را در زمینه‌ای با Ca^{2+} پایین انجام می‌دادیم، چه اتفاقی برای توانایی تجمع سلول‌های مخلوط شده با ژن E-کادهرین تیپ وحشی می‌افتاد؟

فصل

۲۰

تنظیم چرخه سلول یوکاریوتی



(شکل رنگی) یک جنین دو سلولی کرم حلقوی الگانس رنگ‌آمیزی شده با آنتی بادی‌های توبولین (قرمز) و CeBuB-1 ی، یک پروتئین نقطه کنترل دوک (سبز). DNA با DAPI (آبی) رنگ‌آمیزی شده است. CeBuB-1 در طول متافاز در سلول کوچکتر عقبی بر روی کروموزم‌ها و میکروتوبول‌های دوکی متصل به کینه‌توکور قرار دارند (راست). این فرض برای نشان دادن اتصال و کشش کروموزوم صورت می‌گیرد. سلول بزرگتر جلویی (راست) تازه وارد آنافاز شده، و دیگر CeBuB-1 بر روی کروموزوم یا میکروتوبول‌های دوک قابل مشاهده نیست. بنابراین عدم همزمانی این چرخه سلولی دوم در جنین کرم حلقوی الگانس به ما اجازه می‌دهد که هم حضور پروتئین نقطه‌ی کنترل دوک عملکردی را در طول متافاز و هم غیاب آن بعد از آغاز آنافاز را ملاحظه کنیم.

رئوس مطالب

۲۰-۱ - مروری بر چرخه سلولی و کنترل آن

۲۰-۲ - کنترل میتوز توسط سیکلین‌ها و فعالیت MPF

۲۰-۳ - تنظیم کیناز وابسته به سیکلین طی میتوز

۲۰-۴ - مکانیسم‌های مولکولی تنظیم وقایع میتوزی

۲۰-۵ - سیکلین - CDK و یوبی کوئیتین - پروتئین لیگاز فاز S را کنترل می‌کنند

۲۰-۶ - کنترل چرخه سلولی در سلول‌های پستانداران

۲۰-۷ - نقاط کنترل در تنظیم چرخه سلولی

۲۰-۸ - میوز: نوع خاصی از تقسیم سلولی

کنترل مناسب **تقسیم سلولی** برای تمامی موجودات زنده حیاتی است. در موجودات تک سلولی، تقسیم سلولی باید با رشد سلول متناسب باشد، تا اندازه سلول به طور مناسب باقی بماند. اگر قبل از اینکه سلول‌های والدی به اندازه مناسب برسند، چندین تقسیم صورت گیرد، سلول‌های دختری آنقدر کوچک می‌شوند که دیگر نمی‌توانند زنده بمانند. اگر سلول‌ها قبل از تقسیم، خیلی بزرگ شوند، سلول‌ها به صورت نامناسبی عمل کرده و تعداد سلول‌ها به کندی افزایش می‌یابد. در ارگانیسم‌های چند سلولی در حال تکوین، رونویسی سلول باید به دقت کنترل شود تا به صورت مناسب برنامه نمو و تولید مثل را در هر کدام از سلول‌ها و افراد تکمیل کند. هر سلول در هر یک از بافت‌ها باید برای نمو اندام‌های پیچیده‌ای مثل مغز و کلیه باید همانندسازی خود را به دقت کنترل کند. در یک موجود بالغ طبیعی، سلول‌ها تنها زمانی و جایی تقسیم می‌شوند که مورد نیاز باشد. به هرحال، از دست دادن کنترل طبیعی همانندسازی سلول، نقص اساسی در سرطان، بیماری آشنایی که در جهان رو به توسعه از هر شش نفر یک نفر را می‌کشد، است. (فصل ۲۵).

مکانیسم مولکولی تنظیم‌کننده تقسیم سلولی که در این فصل مورد بحث قرار گرفته است، مسیر زیادی برای توضیح فقدان کنترل رونویسی در سلول‌های سرطانی پیموده است. بالاخص آزمایش‌های ابتدایی که تنظیم‌کننده‌های اصلی تقسیم سلول در تمام سلول‌های یوکاریوت را توضیح داده، برنده جایزه نوبل در سال ۲۰۰۱ شده است.

واژه **چرخه سلولی**[1] به سری‌های ترتیبی از وقایع ماکرومولکولی اطلاق می‌شود که موجب تقسیم سلولی و تولید دو سلول دختری می‌شود. سلول‌های دختری هر کدام شامل کروموزوم‌هایی مشابه کروموزوم‌های سلول‌های والدی هستند. دو فرآیند مولکولی اصلی در طول چرخه سلولی اتفاق می‌افتد که بقیه مراحل بین این دو قرار می‌گیرند. در طول فاز S از چرخه سلولی، کروموزم‌های والدی دو برابر می‌شوند؛ در میتوز (فاز M)، کروموزم‌های دختری حاصل به هر کدام از سلول‌های دختری وارد می‌شوند (شکل ۱-۲۰). دقت و صحت زیادی لازم است تا بتوان مطمئن شد، سلول‌های دختری تعداد صحیحی از کروموزوم‌ها را به ارث برده‌اند. به علاوه همانندسازی کروموزوم و تقسیم سلولی باید به ترتیب مناسبی در هر تقسیم سلولی

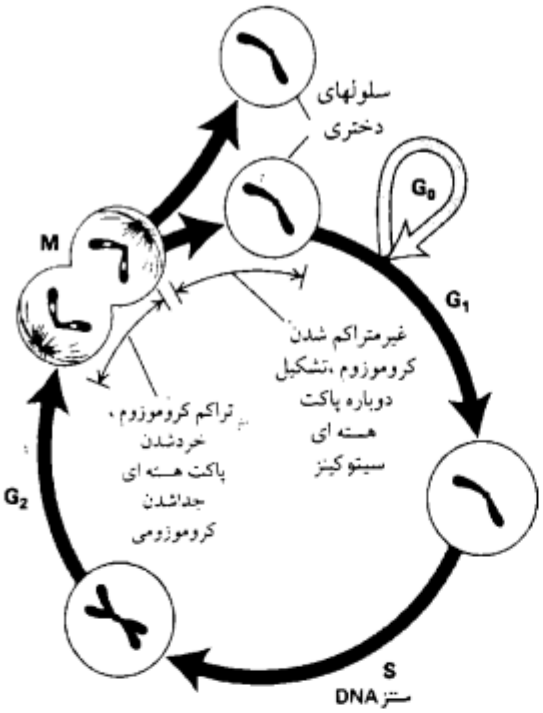
1- Cell cycle

صورت گیرد. اگر یک سلول قبل از تکمیل همانندسازی تمام کروموزوم‌ها تحت وقایع میتوز قرار گیرد، حداقل یکی از سلول‌های دختری اطلاعات ژنتیکی خود را از دست می‌دهد. اگر دور دوم همانندسازی در یک ناحیه از کروموزوم قبل از تقسیم سلولی صورت گیرد، ژن‌های رمزدهی شده در آن ناحیه از نظر تعداد نسبت به بقیه ژن‌ها افزایش می‌یابند، این پدیده اغلب موجب عدم تعادل بیان ژن می‌شود که با حیات موجود زنده تناقض دارد.

برای حصول به سطح مورد نیاز از دقت و صحت در همانندسازی کروموزوم و تفکیک کروموزوم به سلول‌های دختری در طول میتوز، و برای هماهنگ کردن اینها با رشد سلولی و برنامه‌های تکوین، تقسیم سلولی توسط مکانیسم‌های نظارتی نقطه کنترل، تحت کنترل قرار می‌گیرند. این مکانیسم قبل از اتمام یک مرحله از چرخه سلولی مانع از شروع مرحله بعد می‌شود. جهش‌هایی که عمل طبیعی این نقاط کنترل را غیرفعال کرده و یا تغییر می‌دهند، در تولید سلول‌های سرطانی شرکت می‌کنند زیرا آنها باعث ایجاد نوترکیبی کروموزومی و تعداد غیرطبیعی کروموزوم‌ها می‌شوند که این امر خود باعث جهش و تغییر در سطح بیان ژن و در نتیجه رشد کنترل نشده سلول می‌شود (فصل ۲۵). طبیعتاً، از بروز چنین ناهنجاری‌های کروموزمی توسط مکانیسم‌های کنترلی چند لایه که چرخه سلول یوکاریوتی را تنظیم می‌کند، جلوگیری می‌شود.

در اواخر دهه ۱۹۸۰، روشن شد که فرآیندهای مولکولی دو رخداد کلیدی در چرخه سلولی، یعنی همانندسازی سلولی و تفکیک آن را تنظیم نموده و در تمامی سلول‌های یوکاریوت مشابه هستند. در ابتدا، این برای خیلی از محققان جالب بود که سلول‌های مختلف مثلاً مخمر نان و عصب انسان، پروتئین‌های مشابهی برای تنظیم تقسیم خود دارند. با این حال، همچون رونویسی و سنتز پروتئین به نظر می‌رسد که کنترل تقسیم سلولی از فرآیندهای اساسی سلول بوده و در مراحل ابتدایی تکامل یوکاریوت‌ها به میزان زیادی تهیه شده و تکامل یافته است. به خاطر این شباهت، تحقیق در مورد موجودات مختلف (هر کدام با مزایای آزمایشگاهی خاص خود) موجب افزایش دانش ما در مورد چگونگی هماهنگی و کنترل این رخدادها شد. تکنیک‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی، تصویربرداری و ریزدستکاری‌ها، همگی برای مطالعه جنبه‌های مختلف چرخه سلول‌های یوکاریوت به کار برده شدند. این مطالعات بیان کردند که تقسیم سلولی در اصل با تنظیم زمان‌بندی همانندسازی DNA هسته‌ای و میتوز کنترل می‌شود.

کنترل‌کننده‌های اصلی این وقایع، تعداد کمی از **پروتئین کینازهای هترودیمری**[1] بوده و شامل زیرواحد تنظیمی



▲ **شکل ۲۰-۱ سرنوشت یک کروموزوم تک والدی در چرخه سلولی یوکاریوتی.** در میتوز (M) سلول‌های دختری شامل ۲n کروموزوم در موجودات دیپلوئید و ۱n کروموزوم در موجودات هاپلوئید هستند. در سلول‌های در حال تکثیر، G_1 بازه زمانی بین «تولد» یک سلول حاصل از میتوز و آغاز سنتز DNA است. آغاز سنتز DNA نشاندهنده شروع فاز S است. در پایان فاز S، سلول‌ها وارد G_2 شده‌اند که شامل مضاعف شدن کروموزوم‌ها در سلول‌های G_1 هستند (۴n در موجودات دیپلوئید و ۲n در موجودات هاپلوئید). پایان G_2 با شروع میتوز مشخص می‌شود که در طی آن اتفاق‌های زیادی منجر به تقسیم سلولی می‌شود. فازهای G_1، S و G_2 مجموعاً به نام اینترفاز شناخته شده و فاصله زمانی بین یک میتوز با میتوز بعدی است. اکثر سلول‌های غیرتکثیری در مهره‌داران چرخه سلولی را در G_1 ترک کرده و وارد مرحله G_0 می‌شوند. هرچند کروموزوم‌ها فقط در طول میتوز متراکم می‌شوند، اینجا آنها در فرم متراکم در چرخه نشان داده شدند تا بر تعداد کروموزوم‌ها در هر مرحله تأکید شود. برای سهولت، پاکت هسته‌ایی نشان داده نشده است.

(سیکلین[2]) و زیرواحد کاتالیزی (کیناز وابسته به سیکلین[3] یا CDK) است. این کینازها فعالیت پروتئین‌های متعددی را که در همانندسازی DNA و میتوز شرکت دارند با فسفریله نمودن آنها در جایگاه‌های تنظیمی خاص، تنظیم کرده و برای هماهنگ نمودن

1- Hetrodimeric protein kinases
2- Cyclin
3- Cyclin dependent kinase

فعالیت آنها، برخی از پروتئین‌ها را فعال و برخی دیگر را مهار می‌کند. تجزیه تنظیم شده پروتئین‌ها نیز نقش برجسته‌ای در مراحل مهم چرخه سلولی بازی می‌کنند از آنجایی که تجزیه پروتئین برگشت‌ناپذیر است، به ما اطمینان می‌دهد که فرآیندها فقط در یک جهت حرکت می‌کنند.

در این فصل در ابتدا چرخه سلولی را مرور کرده و با مسیرهای مختلف تنظیم چرخه سلول آشنا می‌شویم. سپس هر یک از مراحل را با جزئیات بیشتری بررسی می‌کنیم و همچنین سیستم‌های آزمایشی را بررسی می‌کنیم که منجر به شناخت کنونی ما از این مکانیسم‌های تنظیمی شده است. در مرحله بعد ما در مورد اجزا چرخه سلولی پستانداران و سیستم نقاط کنترلی که موجب تضمین پیشرفت مناسب در چرخه سلولی می‌شود، صحبت خواهیم کرد. در نهایت میوز (نوع خاصی از تقسیم سلولی است که در طی آن سلول‌های هاپلوئید (تخم و اسپرم) تولید می‌شوند) و مکانیسم‌های مولکولی که این فرآیند را از میتوز متمایز می‌کند، بررسی می‌کنیم.

۱ـ۲۰ مروری بر چرخه سلولی و کنترل آن

بحث خود را با مرور مراحل چرخه سلول یوکاریوت آغاز می‌کنیم که شامل خلاصه‌ای از مدل کنونی برای چگونگی تنظیم چرخه و شرح اجمالی سیستم‌های آزمایشگاهی کلیدی است که اطلاعاتی مفید در مورد تنظیم چرخه سلولی می‌دهد. همانطور که پیش از این نیز اشاره شده از آن‌جایی‌که مولکول‌های اساسی در کنترل چرخه سلولی به میزان زیادی در تمامی یوکاریوت‌ها مشابه هستند، پس تقریباً هر مطلبی در مورد کنترل چرخه سلولی ازمخمر یا توتیای دریایی[1] یا قورباغه‌ها یاد گرفته شود با کنترل چرخه سلولی در سلول‌های انسانی مرتبط است.

چرخه سلولی مجموعه منظم از وقایعی است که باعث همانندسازی سلول می‌شود

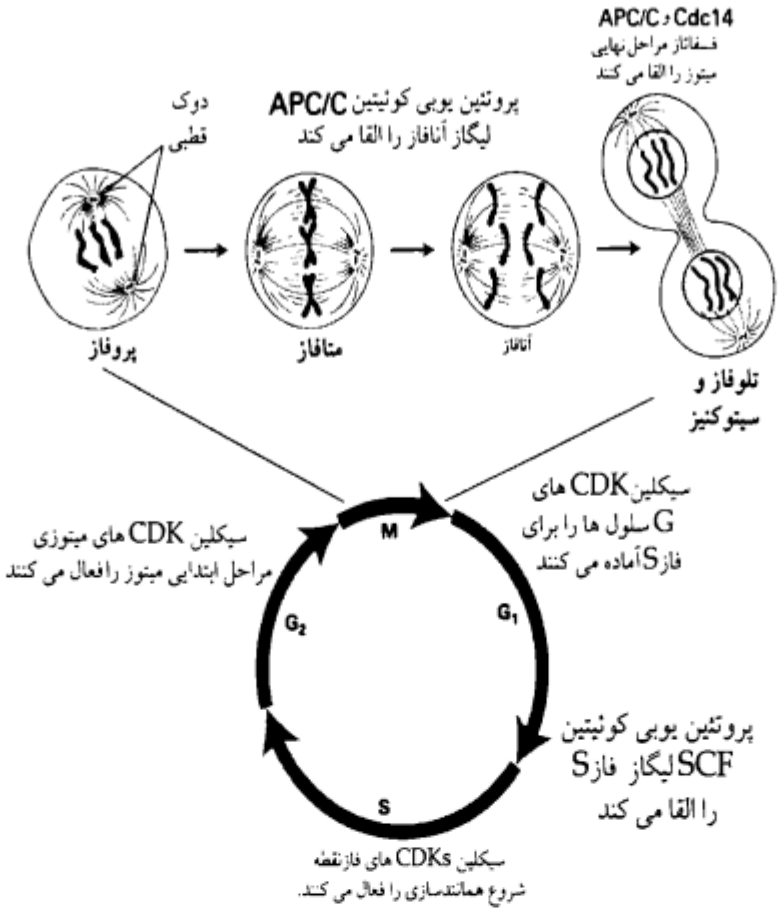
همانطور که در شکل ۱ـ۲۰ نشان داده شده است، چرخه سلولی به چهار فاز اصلی تقسیم می‌شود. سلول‌های سوماتیک چرخه‌ای (همانندسازی‌کننده) پستانداران از نظر اندازه رشد کرده، RNA ها و پروتئین‌های لازم برای سنتز DNA در **طول فاز** G_1 **(اولین وقفه)** را سنتز می‌کنند. وقتی که سلول‌ها به اندازه مناسب رسید و پروتئین‌های لازم را سنتز کردند، وارد **فاز S (سنتز)** می‌شوند. در فاز S سلول‌ها به صورت فعال کروموزوم‌های خود را همانندسازی می‌کنند. بعد از پشت سر گذاشتن فاز وقفه دوم (**فاز** G_2)، سلول‌ها شروع به انجام فرآیند پیچیده میتوز می‌کنند. این مرحله **فاز M (میتوز)** نیز نامیده می‌شود که خود به مراحل مختلفی تقسیم می‌شود (شکل ۲ـ۲۰، بالا را ملاحظه کنید).

در میتوز، عموماً **کروموزوم** به ساختارهای همانندسازی شده‌ای اطلاق می‌شود که در طول میتوز متراکم شده و در این فاصله می‌توان آن‌ها را با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. بنابراین هر کروموزوم از دو مولکول DNA دختری حاصل از همانندسازی DNA به علاوه هیستون‌ها و دیگر پروتئین‌های کروموزومی مرتبط با آن تشکیل یافته است (شکل ۴۰ـ۶ را ملاحظه فرمایید.) دو مولکول DNA دختری شاخص و پروتئین‌های کروموزومی مرتبط با آنها که یک کروموزوم را تشکیل می‌دهند **کروماتیدهای خواهری** نامیده می‌شوند. کروماتیدهای خواهری توسط پروتئین‌هایی به یکدیگر متصل می‌شوند. در مهره‌داران، به موازات متراکم شدن کروموزوم‌ها، اتصال بین دو کروماتید خواهری محدود به ناحیه‌ای به نام **سانترومر** می‌شود.

در طول **اینترفاز**، (قسمتی از چرخه سلولی بین انتهای فاز M و شروع فاز بعدی)، غشاء هسته‌ای خارجی به شبکه آندوپلاسمی امتداد می‌یابد (شکل ۱ـ۹ را ملاحظه فرمایید، ❹). با آغاز میتوز در پروفاز، پاکت هسته‌ای در اکثر سلول‌های یوکاریوت‌های عالی به سمت شبکه آندوپلاسمی جمع شده و غشاهای گلژی به صورت وزیکول‌ها شکسته می‌شوند. همانطور که در فصل ۱۸ شرح داده شد، میکروتوبول‌های سلولی **دستگاه میتوزی**[2] را شکل می‌دهند که شامل یک دسته میکروتوبول به شکل زمین فوتبال با دسته‌ای ستاره‌ای شکل از میکروتوبول‌های منشعب که از هر انتها یا قطب دوک خارج می‌شوند. در طول دوره **متافاز** میتوز، یک کمپلکس چند پروتئینی، (**کینه‌توکور**)، در هر سانترومر تجمع می‌یابد. سپس کینه‌توکورهای کروماتیدهای خواهری با میکروتوبول‌های حاصل از دوک‌ها در قطب‌های مخالف تجمع یافته (شکل ۳۶ـ۱۸ را ملاحظه کنید) و کروموزوم‌ها در یک صفحه در وسط سلول قرار می‌گیرند. در طول **آنافاز** میتوز، کروماتیدهای خواهری جدا می‌شوند. آنها در ابتدا به وسیله پروتئین‌های حرکتی در طول میکروتوبول‌های دوک به سمت قطب مخالف کشیده شده و سپس به موازات طویل شدن دوک میتوزی ، قطب‌های مخالف آنها بیشتر از همدیگر جدا می‌شوند (شکل ۴۱ـ۱۸ را ملاحظه کنید).

1- Sea urdin

2- Mitoric apparotus



▲ **شکل ۲۰-۲ تنظیم مراحل چرخه سلولی.** مراحل گذار چرخه سلولی توسط پروتئین کینازهای سیکلین -CDK، پروتئین فسفاتازها و لیگازهای پروتئین- یوبی کوئیتین تنظیم می‌شوند. چرخه سلولی ترسیم شده و به همراه مراحل اصلی میتوز در بالا نشان داده شده است. در اوایل G_1 هیچ سیکلین -CDKای فعال نیست. در اواسط G_1، سیکلین -CDK های G_1 رونویسی ژن‌های لازم برای همانندسازی DNA را فعال می‌کند. فاز S با لیگاز پروتئین- یوبی کوئینین SCF که مهارکننده‌های سیکلین -CDK های فاز S را پلی یوبی کوئینیته و آنها را برای تجزیه توسط پروتئوزوم‌ها نشانه‌گذاری می‌کند آغاز می‌شود. سپس سیکلین -CDK های فاز S، نواحی شروع همانندسازی DNA و شروع سنتز DNA را فعال می‌کنند. وقتی که همانندسازی DNA تکمیل شد، سلول وارد G_2 می‌شود. در اواخر G_2، سیکلین -CDK ها مراحل اولیه میتوز یعنی خردشدن پاکت هسته‌ای، بازآرایی میکروتوبول‌ها برای تشکیل دستگاه دوک میتوزی، تراکم کروموزمی در طول پروفاز و اتصال کینه‌توکورها به میکروتوبول‌های دستگاه دوکی در متافاز (همانطور که در فصل ۱۸ بحث شد) را فعال می‌کنند. میکروتوبول‌های حرکتی و کوتاه شدن میکروتوبول‌های دوکی، کروماتیدهای خواهری را به سمت قطب‌های دوکی مخالف می‌کشد، اما تا زمانی که کمپلکس پیش برنده آنافاز (APC/C) (یک لیگاز پروتئین- یوبی کوئیتین)، سکورین را پلی یوبی کوئیتینه کند و آن را برای تجزیه توسط پروتئوزوم نشاندار کند، کروماتیدهای خواهری نمی‌توانند جدا شوند. این موجب تجزیه کمپلکس‌های پروتئینی متصل به کروماتیدهای خواهری در سانترومر و شروع آنافاز با جدایی کروماتیدهای خواهری می‌شود. بعد از حرکت کروموزوم‌ها به قطب‌های دوکی، APC/C سیکلین‌های میتوزی را پلی یوبی کویینیته کرده و باعث تجزیه آنها توسط پروتئوزوم‌ها می‌شود. افت حاصل در فعالیت سیکلین -CDK میتوزی در طول عمل Cdc14 فسفاتاز، موجب متراکم شدن کروموزومی، بازسازی غشاء هسته‌ای در اطراف هسته سلول‌های دختری، بازآرایی میکروتوبول‌ها به سیتواسکلتون‌های سلول دختری و سیتوکینز می‌شود.

هنگام پایان یافتن جدا شدن کروموزوم‌ها، دوک میتوزی گسسته‌شده و کروموزوم‌ها تراکم خود را از دست می‌دهند. این اعمال در طول **تلوفاز** رخ می‌دهد. پاکت هسته‌ای در اطراف کروموزوم‌های جدا شده که در حال از دست دادن تراکم هستند دوباره تشکیل می‌شود. تقسیم فیزیکی سیتوپلاسم، **سیتوکینز** نامیده می‌شود و موجب ایجاد دو سلول دختری و تشکیل دوباره کمپلکس گلژی در هر سلول دختری می‌شود. به دنبال میتوز، سلول وارد فاز G_1 شده و دور دیگری از چرخه را آغاز می‌کند. در مخمرها و قارچ‌های دیگر، پاکت هسته‌ای در طول میتوز، خرد نمی‌شود. در این ارگانیسم‌ها، دوک میتوزی در پاکت هسته‌ای تشکیل شده در هنگام سیتوکینز، فشردگی

خود را از دست داده و هسته را شکل می‌دهد.

در مهره‌داران و مخمرهای دیپلوئید، سلول‌ها در G_1 تعداد **دیپلوئید** کروموزوم (2n) دارند، هر کدام از این کروموزوم‌ها از یکی از والدین به ارث می‌رسد. در مخمرهای **هاپلوئید** سلول‌ها در G_1 یکی از هر کروموزوم را دارند (1n). بنابراین **هاپلوئید** هستند. سلول‌های با همانندسازی سریع در انسان در مدت ۲۴ ساعت یک دور کامل چرخه سلولی را انجام می‌دهند: میتوز حدود ۳۰ دقیقه به طول می‌انجامد؛ G_1، ۹ ساعت؛ فاز S، ۱۰ ساعت و G_2، ۴/۵ ساعت. اما، چرخه کامل در سلول‌های مخمر با رشد سریع، فقط در حدود ۹۰ دقیقه انجام می‌شود.

در موجودات چندسلولی، سلول‌های تمایز یافته‌تر از چرخه سلولی خارج شده و برای چند روز، هفته و یا در برخی موارد (مثلاً سلول‌های عصبی و سلول‌های عدسی چشم) در طول عمر موجود بدون تقسیم باقی می‌مانند. چنین سلول‌های **پس میتوزی**[1] عموماً در G_1 از چرخه سلولی خارج و وارد مرحله‌ای به نام G_0 می‌شوند (شکل ۱ـ۲۰ را ملاحظه کنید). برخی سلول‌های G_0 می‌توانند به چرخه برگشته و همانندسازی را ادامه دهند؛ این ورود دوباره تنظیم شده بوده و موجب کنترل تکثیر سلول می‌شود.

فسفریلاسیون و تجزیه پروتئین تنظیم شده، عبور از چرخه سلولی را کنترل می‌کند

همانطور که در مقدمه فصل اشاره شد، چرخه سلولی توسط پروتئین کینازهای هترودایمری کنترل می‌شود. **تراکم سیکلین‌ها**، که زیرواحدهای تنظیمی هترودایمرها هستند، در طی چرخه سلولی افزایش و کاهش می‌یابند. تراکم زیرواحدهای کاتالیزی این کینازها، که **کینازهای وابسته به سیکلین**[2] (CDK_s) نامیده می‌شوند و به طریق مشخصی در سلول‌های مخمر نوسان نمی‌کنند اما تا زمانی که با سیکلین ارتباط برقرار نکند، فعالیت کینازی ندارند. هر CDK می‌تواند با تعداد کمی از سیکلین‌های متفاوت ارتباط برقرار کند که ویژگی سوبسترای کمپلکس (و یا به بیان دیگر پروتئین‌هایی را که بایست فسفریله شوند) را تعیین می‌کنند. کمپلکس‌های سیکلین -CDK پروتئین‌های درگیر در چرخه سلولی را با فسفریله کردن آنها در مناطق تنظیمی خاص، فعال یا مهار می‌کنند. بنابراین پیشرفت مناسب در چرخه سلولی توسط فعالیت کمپلکس سیکلین -CDK در زمان مناسب هدایت می‌شود. همانطور که خواهیم دید، سلول‌ها برای تنظیم فعالیت هر هترودیمر سیکلین -CDK از مکانیسم‌های مختلفی استفاده می‌کنند.

سیکلین -CDK‌ها به سه دسته تقسیم می‌شوند: سیکلین -CDK‌های G_1، سیکلین -CDK‌های فاز S و سیکلین -CDK‌های میتوزی (شکل ۲ـ۲۰). دو یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگاز، SCF و **کمپلکس پیشبرنده ـ آنافاز**[3]، نیز تنظیم‌کننده‌های کلیدی مراحل چرخه سلولی هستند. کمپلکس پیشبرنده آنافاز گاهی اوقات **سیکلوزوم**[4]، نیز نامیده شده و در این فصل به صورت APC/C خلاصه شده است. به یاد داشته باشید که یوبی کوئیتین - پروتئین لیگازها، پروتئین‌های سوبسترا را پلی‌یوبی کوئیتینه کرده و آن‌ها را برای تجزیه توسط پروتئوزوم‌ها نشانه‌گذاری می‌کنند (شکل ۲۹ـ۳ را ملاحظه کنید).

سیکلین -CDK G_1. سیکلین -CDK‌های G_1 از طریق فسفریله نمودن ورود به فاز S و در نتیجه تنظیم فاکتورهای رونویسی ژن‌های لازم برای همانندسازی کروموزوم‌ها را کنترل می‌کنند. این ژن‌ها شامل آنزیم‌هایی سنتزکننده دئوکسی نوکلئوزیدتری فسفات، DNA پلیمرازها و دیگر پروتئین‌های درگیر در همانندسازی و سیکلین -CDK‌های فاز S لازم برای شروع همانندسازی DNA هستند. در موجودات عالی، کنترل تقسیم سلولی اصولاً در اثر تنظیم سنتز و فعالیت کمپلکس‌های سیکلین -CDK‌های G_1 کنترل می‌شود.

سیکلین -CDK های فاز -S. سیکلین -CDK‌های فاز S در اواخر G_1 سنتز می‌شوند. با این حال، بلافاصله مهارکننده‌هایی که از عملکرد آنها جلوگیری می‌کنند به آنها متصل می‌شوند. هنگامی که سیکلین -CDK‌های G_1 به حداکثر فعالیت خود می‌رسند، آنها این مهارکننده‌های سیکلین -CDK‌های فاز S را فسفریله کرده و به این پروتئین‌های مهارکننده امکان می‌دهند که به پروتئین - یوبی کوئیتین لیگاز SCF متصل و توسط آن پلی یوبی‌کوئینیته شوند. این امر باعث افزایش ناگهانی فعالیت سیکلین -CDK‌های فاز S می‌شود. سیکلین -CDK فاز S فعال، موجب فسفریله شدن و فعال شدن اجزای پروتئینی کمپلکس‌های پیش همانندسازی می‌شود که در طول G_1 در نقاط آغازین همانندسازی DNA تجمع می‌یابند. آغاز همانندسازی DNA می‌گردد، که نشاندهنده شروع فاز S است.

سیکلین -CDK های میتوزی. کمپلکس‌های سیکلین -CDK

1- Postmiotic
2- Cyclin - dependent kinases
3- Anaphase - promoting complex
4- Cyclosome

میتوزی در طول فاز S و G_2 سنتز می‌شوند، اما فعالیت آنها تا زمانی که سنتز DNA کامل شود از طریق فسفریلاسیون در جایگاه‌های مهاری تحت کنترل قرار می‌گیرد. وقتی که این کمپلکس‌ها فعال شدند، سیکلین -CDK های میتوزی فسفریله شده و صدها پروتئین از جمله پروتئین‌های مرتبط با کروماتین که موجب متراکم شدن کروموزومی می‌شوند، پروتئین‌های پاکت هسته‌ای و کمپلکس منفذ هسته‌ای که موجب جمع شدن پاکت هسته‌ای در ER می‌شوند، پروتئین‌های مرتبط با میکروتوبول که اسکلت سلولی میکروتوبولی را به شکل دستگاه میتوزی درمی‌آورد، پروتئین‌های کینه‌توکور که موجب تجمع کینه‌توکورها و اتصال آنها به میکروتوبول‌ها می‌شود و همچنین پروتئین کینازهای دیگر را فعال می‌کنند. با این حال پروتئین کینازها وقتی که توسط سیکلین -CDK های میتوزی فعال می‌شوند، به تنظیم پروتئین‌های درگیر در وقایع میتوزی کمک می‌کنند. وقتی که همه کینه‌توکورها به طور مناسب به میکروتوبول‌های دوکی متصل شدند و کروموزوم‌ها در صفحه متافازی قرار گرفتند، APC/C یوبی کوئیتین - پروتئین لیگاز یک پروتئین تنظیمی کلیدی (سکورین) را پلی یوبی‌کوئیتینه کرده و باعث تجزیه شدن توسط پروتئوزوم‌ها می‌شود. سکورین به طور معمول از تجزیه پروتئین‌هایی جلوگیری می‌کند که کروماتیدهای خواهری را در سانترومرها به هم متصل می‌کند. تخریب سکورین به کروماتیدهای خواهری امکان می‌دهد تا از یکدیگر جدا شده و باعث شروع آنافاز گردند. APC/C همچنین موجب تجزیه سیلکین‌های میتوزی می‌شود. در اواخر آنافاز و وقتی که کروموزوم‌های خواهری جدا می‌شوند، افت حاصل در فعالیت سیکلین -CDK میتوزی امکان دفسفریلاسیون پروتئین‌های هدف آنها را می‌دهد. این خود باعث شروع تلوفاز و غیرمتراکم شدن کروموزوم‌ها شده و همچنین باعث تجمع دوباره پاکت هسته‌ای و کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای در اطراف کروموزوم‌های جدا شده، گشته و همچنین باعث تشکیل دو هسته سلول دختری و سیتوکینز می‌شود که در نتیجه تقسیم سلولی کامل می‌گردد.

یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگازها. یوبی کوئیتین - پروتئین لیگازهای SCF و APC/C با تنظیم فعالیت سیکلین -CDK و پیوستگی بین سانترومرهای کروماتیدهای خواهری، عبور از سه مرحله ضروری را در چرخه سلولی (فاز G_1 ← فاز S، متافاز ← آنافاز و آنافاز ← تلوفاز و سیتوکینز) کنترل می‌کنند. از آنجایی که این مراحل گذار توسط تجزیه تنظیم شده پروتئین‌ها آغاز می‌شود بنابراین یک فرآیند برگشت‌ناپذیر بوده و سلول‌ها مجبور هستند که چرخه سلولی را فقط به صورت یک طرفه طی کنند.

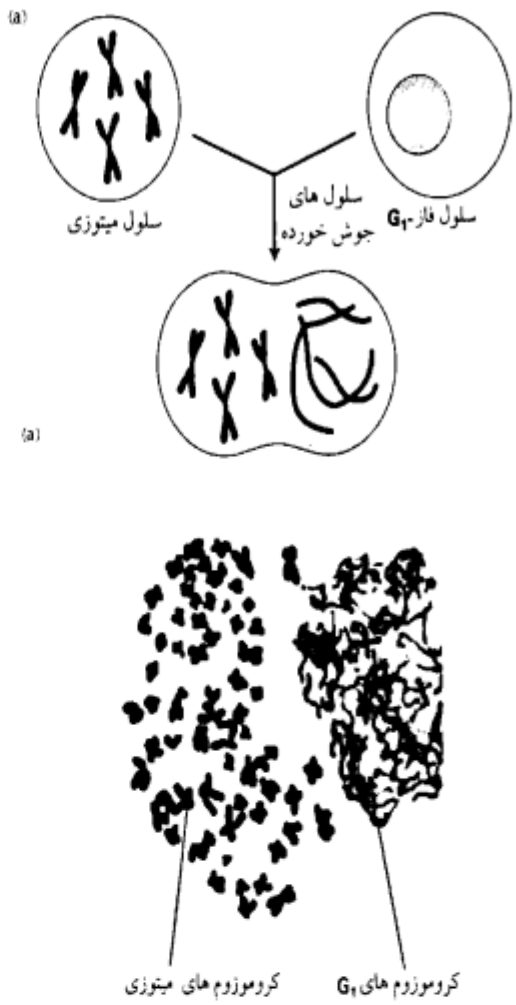
مکانیسم‌های نقاط کنترل. مکانیسم‌های نظارتی که به عنوان نقاط کنترل[1] شناخته می‌شوند، طوری عمل می‌نمایند که تا اتمام مرحله قبلی در چرخه سلولی، مرحله بعدی آغاز نشود. مراحل گذار چرخه سلولی توسط نقاط کنترل که شامل آغاز فاز S، آغاز میتوز، تفکیک کروموزوم‌های دختری در آنافاز و شروع تلوفاز و سیتوکینز است، بازرسی می‌شوند. مکانیسم‌های نظارتی نقاط کنترل، مسئول صحت بالای تقسیم سلولی بوده و باعث می‌شوند هر سلول دختری تعداد صحیحی از کروموزوم‌های همانندسازی شده را دریافت کنند. این مکانیسم‌های نظارتی نقاط کنترل، توسط کنترل فعالیت پروتئین کینازها در سیکلین -CDK ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی، همچون تنظیم سنتز و تجزیه سیکلین‌های مورد نیاز برای فعالیت CDK پروتئین کیناز، فسفریله کردن CDK ها در جایگاه‌های فعال‌کننده و مهاری، تنظیم سنتز و پایداری مهارکننده‌های CDK (CKI ها) که به CDK ها یا کمپلکس‌های سیکلین -CDK متصل شده و آنها را غیرفعال می‌کند و تنظیم APC/C یوبی کوئیتین - پروتئین لیگاز، عمل می‌کنند.

سیستم‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص و جداسازی پروتئین‌های کنترل‌کننده چرخه سلولی استفاده شده است

اولین شاهدی که نشان می‌دهد فاکتورهای قابل انتشار، چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند از آزمایشات ادغام سلولی با سلول‌های کشت داده شده در پستانداران بدست آمد. هنگامی که سلول‌های اینترفازی در فاز G_1، S یا G_2 از چرخه سلولی با سلول‌های در حال میتوز ادغام شدند، پاکت‌های هسته‌ای آنها جمع شده و کروموزوم‌های آن‌ها متراکم می‌گرند (شکل ۳-۲۰). این یافته‌ها نشان می‌دهد که برخی از ترکیب یا ترکیبات قابل انتشار در سیتوپلاسم سلول‌های میتوزی، هسته‌های اینترفازی را مجبور می‌کنند تا خیلی از فرآیندهای مرتبط با اوایل میتوز را انجام دهند. ما می‌دانیم که این فاکتورها کمپلکس‌های سیکلین -CDK میتوزی هستند.

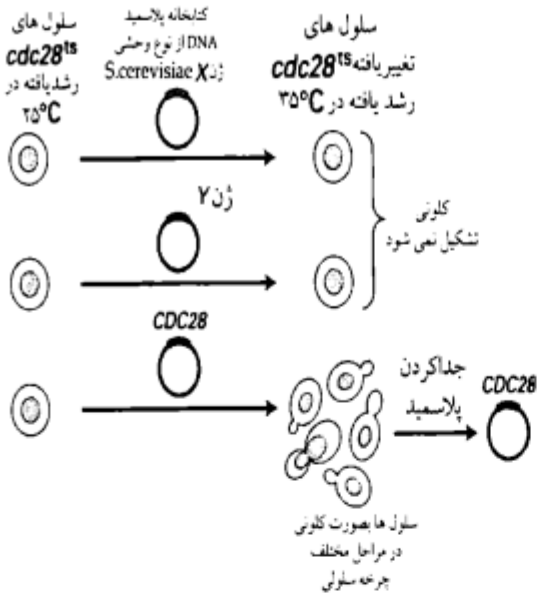
به همین صورت وقتی سلول‌ها در G_1 با سلول‌ها در فاز S ادغام شدند، و سلول‌های ادغام شده در معرض تیمیدین نشاندار شده قرار گرفتند، تیمیدین نشاندار در DNA ی هسته G_1 و هسته فاز S وارد شد. این نشان می‌دهد سنتز DNA در هسته G_1 در مدت کوتاهی

1- Checkpoints



▲ **شکل تجربی ۳ـ۲۰ یک فاکتور محلول در سلول‌های میتوزی، موجب القای میتوز در سلول‌های اینترفازی می‌شود.** (a) آزمایش ادغام سلولی. در سلول‌های اینترفازی ادغام نشده، پاکت هسته‌ای دست نخورده بوده و کروموزوم‌ها متراکم نشده‌اند. بنابراین کروموزوم‌ها را نمی‌توان تشخیص داد (شکل ۱ـ۲b و ۶ـ۳۳a را ملاحظه کنید). در سلول‌های میتوزی (چپ) پاکت هسته‌ای وجود ندارد و کروموزوم‌های همانندسازی شده به شدت متراکم شده‌اند. وقتی یک سلول در G_1 با یک سلول در میتوز ادغام می‌شود، پاکت هسته‌ای سلول G_1 به طرف ER جمع شده و کروموزوم‌ها متراکم می‌شوند، البته نه به اندازه‌ای که در سلول‌های میتوزی متراکم می‌شوند. (b) میکروگراف کروموزوم‌ها در سلول G_1 ادغام شده با یک سلول در میتوز (همانطور که در (a) نشان داده شده است).

بعد از ادغام سلولی شروع می‌شود. به هرحال وقتی که سلول‌ها در G_2 با سلول‌های فاز S ادغام می‌شوند، هیچ تیمیدین نشانداری در هسته G_2 شرکت نمی‌کند. بنابراین فاکتورهای معمول در سلول فاز S می‌توانند وارد هسته G_1 شده و سنتز DNA را تحریک کند. اما این فاکتورها نمی‌توانند سنتز DNA در هسته G_2 را القاء کنند. ما



▲ **شکل تجربی ۴ـ۲۰ ژن‌های نوع وحشی چرخه تقسیم سلولی (CDC) را می‌توان از کتابخانه ژنومی ساکارومایسیس سرویزیه با تکمیل عملکردی جهش‌های cdc جدا کرد.** سلول‌های جهش یافته با جهش حساس به حرارت در ژن CDC با یک کتابخانه ژنومی فراهم شده از سلول‌های نوع وحشی کشت داده شده در مواد مغذی (nutrient agar) در یک دمای غیرمتعادل (۳۵°C). هر سلول تغییر شکل یافته یک پلاسمید حاوی یک قطعه DNA ژنومی را جذب کرده است. اغلب چنین قطعاتی شامل ژن‌هایی هستند (مثلاً X و Y) که پروتئین CDC ناقص را رمزدهی نمی‌کنند؛ سلول‌های تغییرشکل یافته که چنین قطعاتی را جذب کرده‌اند در دمای غیرمتعادل تشکیل کلونی نمی‌دهند. معدود سلول‌هایی که پلاسمیدهای حاوی نوع وحشی ژن جهش یافته هستند (در این مورد CDC28 ، یک کیناز وابسته به سیکلین) تکمیل شده، و به سلول اجازه می‌دهد تا همانندسازی کرده و در دمای غیرمتعادل کلونی تشکیل دهد. DNA پلاسمیدی جدا شده از این کلونی حاوی ژن CDC نوع وحشی است که در سلول‌های جهش یافته ناقص است. روند مشابهی برای جداسازی ژن نوع وحشی cdc^+ در اسکیزوساکارومایسیس پمبه استفاده می‌شود. شکل‌های ۵ـ۱۷ و ۵ـ۱۸ جزئیات بیشتری را در ساخت وجداسازی کتابخانه ژنومی مخمر نشان می‌دهند.

می‌دانیم که این فاکتورها کمپلکس‌های سیکلین -CDK فاز S بوده‌و می‌توانند کمپلکس‌های پیش همانندسازی در نقاط شروع همانندسازی DNA در اوایل هسته G_1 را فعال کنند. سنتز DNA در هسته‌های G_2 رخ نمی‌دهد زیرا هیچ کمپلکس پیش همانندسازی تجمع یافته‌ای بر روی DNA وجود ندارد. گرچه این آزمایشات ادغام سلولی ثابت کرد که فاکتورهای قابل انتشار، ورود به فازهای S و M چرخه سلولی را کنترل می‌کند. اما آزمایشات ژنتیکی و بیوشیمیایی برای تشخیص این فاکتورها لازم بود.

جدول ۱-۲۰ سیکلین‌ها و کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) منتخب

موجود زنده / پروتئین	نام
S.POMBE	
CDK (فقط یکی)	Cdc2
سیکلین میتوزی (فقط یکی)	Cdc13
S.CEREVISIAE	
CDK (فقط یکی)	Cdc28
سیکلین اواسط G1	Cln3
سیکلین‌های اواخر G1	Cln1,cln2
سیکلین‌های اوایل فاز S	Cln5,clb6
سیکلین‌های اواخر فاز S و اواخر میتوز	Clb3,clb4
سیکلین‌های اواخر میتوز	Clb1,clb2
مهره‌داران	
CDKهای اواسط G1	CDK4,CDK6
CDK اوایل G1 و فاز S	CDK2
CDKهای میتوزی	CDK1,CDK2
سیکلین‌های اواسط G1	سیکلین‌های نوع D
سیکلین اواخر G1 و فاز S	سیکلین E
سیکلین فاز S و میتوزی	سیکلین A
سیکلین‌های میتوزی	سیکلین A، سیکلین B

توجه کنید: سیکلین‌ها و CDKهای توضیح داده شده در این فصل بر اساس فاصله زمانی در چرخه سلولی که آنها عمل می‌کنند. فهرست و طبقه‌بندی شده‌اند. به هترودیمر متشکل از سیکلین و CDK میتوزی معمولاً فاکتور پیشبرنده میتوز (MPF) اطلاق می‌شود.

مخمر جوانه‌زن ساکارومایسیس سرویزیه[1] و مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسیس[2] پمبه به طور ویژه‌ای برای جداسازی جهش یافته‌هایی مفید و که در یک مرحله خاص در چرخه سلولی متوقف شده و یا دارای تنظیم متفاوتی در چرخه بودند. در هر دوی این مخمرها، مخمرها با **جهش‌های حساس به حرارت** باعث نقصان در پروتئین‌های خاص لازم برای پیشرفت در چرخه سلولی شده که به سادگی از طریق میکروسکوپ قابل شناسایی بوده و در نتیجه می‌توان آنها را جدا کرد (شکل ۵-۶ را ملاحظه کنید). چنین سلول‌هایی، جهش یافته‌های cdc (**چرخه تقسیم سلولی**) نامیده می‌شوند. آلل‌های نوع وحشی از آلل‌های جهش یافته cdc حساس به حرارت مغلوب را می‌توان به سادگی با انتقال کتابخانه پلاسمیدهای تهیه شده از سلول‌های نوع وحشی به جهش یافته‌های هاپلوئید و کشت این سلول‌ها در دمای غیرمتعادل جدا کرد (شکل ۲۰-۴).

وقتی که آنها کشت داده شوند، جهش یافته‌های هاپلوئید نمی‌توانند در دمای غیرمتعادل کلونی تشکیل دهند. با این حال، سلول‌های جهش یافته‌ای که می‌توانند رشد کرده و کلونی تشکیل دهند، دارای پلاسمید حاوی آلل نوع وحشی می‌باشند که جهش مغلوب را کامل می‌کند. سپس پلاسمید دارای آلل نوع وحشی را می‌توان از آن سلول‌ها استحصال نمود. چون بسیاری از پروتئین‌هایی که چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند به شدت حفاظت شده‌اند، cDNAهای انسانی کلون شده در وکتورها اغلب می‌توانند جهش یافته‌های چرخه سلولی مخمر را تکمیل نموده و موجب جداسازی سریع ژن‌های انسانی رمزدهی‌کننده پروتئین‌های کنترلی چرخه سلولی شوند.

مطالعات بیوشیمیایی نیاز به فراهم آوری عصاره سلولی از سلول‌های بسیاری دارد. برای مطالعات بیوشیمیایی چرخه سلولی، تخم‌ها و جنین‌های جوان دوزیستان و بی‌مهرگان دریایی خیلی مناسب هستند. در این موجودات، به دنبال تلقیح یک تخم بزرگ چندین چرخه سلولی همزمان صورت می‌گیرد. با جدا کردن تعداد

1- Schiozosaccharomyces pombe

2- Sacoharomyces cerevisiae

زیادی از تخم‌ها از ماده‌ها و لقاح همزمان آن‌ها با اضافه نمودن اسپرم (یا تیمار آنها به طریقی که مشابه لقاح باشد)، محققان توانستند عصاره‌هایی از سلول‌ها در نقاط و مراحل مشخصی از چرخه سلولی بدست آورند که در بررسی پروتئین‌ها و فعالیت‌های آنزیمی به کار می‌رود.

در قسمت‌های بعدی، در مورد آزمایشات اصلی بحث خواهیم کرد که موجب پدید آمدن مدل کنونی تنظیم چرخه سلولی یوکاریوت شده و در شکل ۲ـ۲۰ به صورت خلاصه آورده شده است و همچنین جزئیات بیشتری از وقایع تنظیمی مختلف را ارائه خواهیم کرد. همانطور که خواهیم دید، نتایج بدست آمده از سیستم‌های آزمایشی متفاوت و دیدگاه‌های متفاوت، نظراتی را در مورد هر کدام از نقاط گذار در چرخه سلولی فراهم آورده است. به دلایل تاریخی، اسامی سیکلین‌های مختلف و کینازهای وابسته به سیکلین در مخمرها و مهره‌داران متفاوت است. جدول ۱ـ۲۰ اسامی آنهایی را که در این فصل موردبحث قرار گرفته‌اند آورده است و نشان می‌دهد که آنها چه زمانی در چرخه سلولی فعال می‌شوند. هر جا ممکن باشد، به جای استفاده از واژه‌های خاص علمی، ما از لغات رایج برای شرح تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی استفاده می‌کنیم.

نکات کلیدی بخش ۱-۲۰

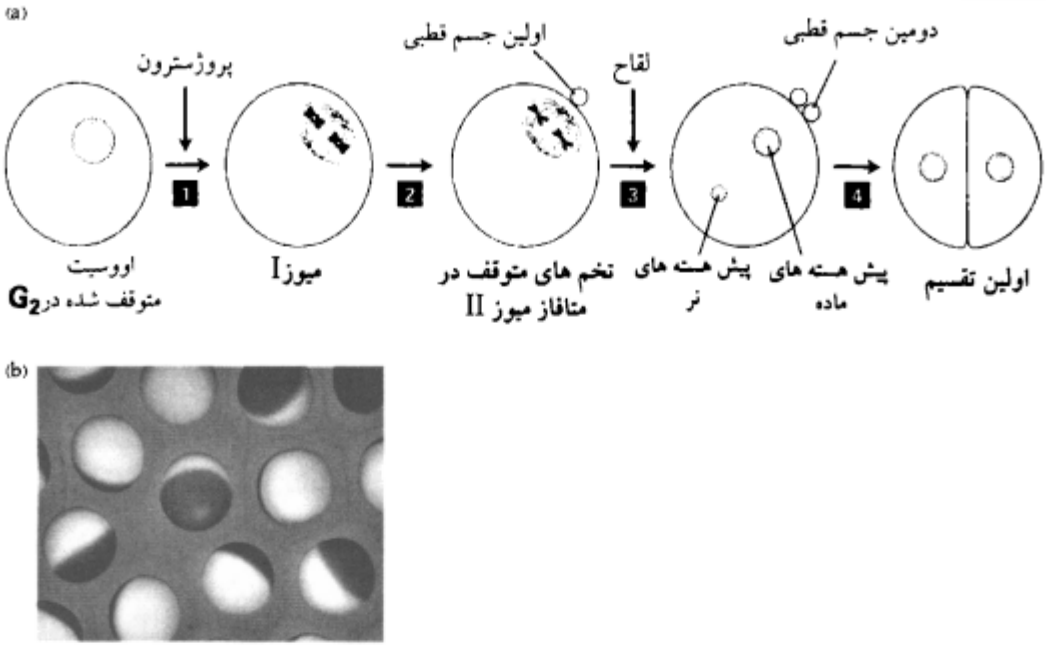
مروری بر چرخه سلولی و کنترل آن

- چرخه سلولی یوکاریوتی به چهار فاز تقسیم می‌شوند: M (میتوز)، G_1 (فاصله زمانی بین میتوز و شروع همانندسازی DNA هسته‌ای)، S (فاصله زمانی همانندسازی DNA) و G_2 (فاصله زمانی بین تکمیل همانندسازی DNA هسته‌ای و میتوز). (شکل ۱-۲۰ را ملاحظه کنید).
- کمپلکس‌های سیکلین - CDK از زیرواحد سیکلین تنظیمی و زیرواحد کیناز وابسته به سیکلین کاتالیزی تشکیل شده و پیشروی سلول را در چرخه سلول تنظیم می‌کند (شکل ۲-۲۰ را ملاحظه کنید). پروتئین - یوبی کوئیتین لیگازهای چند زیرواحدی بزرگ، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی را پلی یوبی‌کوئیتینه کرده و آنها را برای تخریب با پروتئوزوم نشانه‌گذاری می‌کنند.
- مراحل گذار چرخه سلولی توسط مکانیسم‌های نظارتی نقطه کنترل بازرسی می‌شوند تا هر فرآیند چرخه سلولی قبل از شروع مرحله بعد به دقت تکمیل گردد.
- آزمایشات ادغام سلولی با سلول کشت‌داده شده پستانداران برای اولین بار توضیح داد که فاکتورهای قابل انتشار، چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند. کمپلکس‌های سیکلین - CDK میتوز باعث تراکم کروموزوم و خردشدن پاکت هسته‌ای در سلول‌های G_1 و G_2 در هنگام ادغام آنها با سلول میتوزی می‌شود. بطور مشابه، کمپلکس‌های سیکلین - CDK فاز S، همانندسازی DNA را در هسته سلول‌های G_1 در هنگام ادغام آنها با سلول‌های فاز S تحریک می‌کنند.
- مطالعات ژنتیکی در مخمر امکان جداسازی جهش‌یافته‌های چرخه تقسیم سلولی (cdc) را می‌دهد. این امر منجر به شناسایی ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی شد (شکل ۴-۲۰ را ملاحظه کنید).
- تخم‌های دوزیستان و بی‌مهرگان و جنین‌های اولیه از تخم‌های لقاح‌یافته بصورت همزمان منابع خوبی را برای مطالعات بیوشیمیایی وقایع چرخه سلولی فراهم نمودند.

۲ـ۲۰ کنترل میتوز به وسیله‌ی سیکلین‌ها و فعالیت MPF

کشف ابتدایی پروتئینی که یک مرحله گذار بحرانی چرخه سلولی را کنترل می‌کند، از تحقیق بر روی میتوز به دست آمد. این مطالعات موجب دو کشف قابل توجه در مورد کنترل چرخه سلولی شد. اول، فرآیندهای مولکولی پیچیده در مراحل اولیه میتوز از قبیل متراکم شدن کروموزومی، خرد شدن پاکت هسته‌ای، تشکیل دوک میتوزی و اتصال کینه‌توکورهای کروموزومی به میکروتوبول‌های دوک، همگی می‌توانند به وسیله تعداد معدوی از پروتئین‌های تنظیمی چرخه سلولی اصلی تنظیم و کنترل شوند. دوم، این تنظیم‌کننده‌های اصلی و پروتئین‌هایی که آنها را کنترل می‌کنند به شدت حفاظت شده‌اند، به طوری که مطالعه چرخه سلولی در قارچ‌ها، توتیای دریایی، حشرات، قورباغه‌ها و دیگر گونه‌ها به طور مستقیم در مورد تمامی سلول‌های یوکاریوتی از جمله سلول‌های انسان قابل بسط است.

یک پیشرفت غیرمنتظره در تشخیص فاکتورهای القاکننده میتوز، از مطالعه بلوغ اووسیت در قورباغه **زنوپوس لوئیس** بدست آمد. برای درک این آزمایشات، ما در ابتدا باید وقایع بلوغ اووسیت را که در شرایط آزمایشگاهی نیز قابل تکثیر است، شرح دهیم. در هنگام نمو اووسیت‌ها در تخمدان قورباغه، اووسیت‌ها DNA خود را همانندسازی کرده و برای ۸ ماه در G_2 متوقف می‌شوند. در طول این زمان تا قطر ۱mm رشد کرده و تمام مواد مورد نیاز برای چندین بار تقسیم سلولی را انباشته می‌کنند که برای شنا و تغذیه در بچه قورباغه لازم است (برای بررسی اجمالی میوز شکل ۳ـ۵، راست را ملاحظه



▲ **شکل تجربی ۵ـ۲۰: (شکل رنگی) .پروژسترون بلوغ میوزی اووسیت‌های زنوپوس را تحریک می‌کند.** (a) مرحله ❶: تیمار اووسیت‌های متوقف در G_2 از زنوپوس با پروژسترون که از تخمدان ماده بالغ بیرون آمده، باعث می‌شود اووسیت‌ها وارد میوز شوند. دو جفت از کروموزوم‌های هومولوگ سیناپسی (آبی) متصل شده به میکروتوبول‌های دوک میتوزی (سبز) به صورت شماتیک نشان داده شدند تا سلول‌ها در متافاز میوز I را نشان دهند. مرحله ❷: جدا شدن کروموزوم‌های هومولوگ و تقسیم سلول شدیداً نامتقارن نیمی از کروموزوم را به یک سلول کوچک که اولین جسم قطبی خوانده می‌شود، می‌راند. اووسیت بلافاصله میوز II را شروع کرده و در متافاز متوقف می‌شود تا یک تخم تولید کند. دو کروموزوم متصل به میکروتوبول‌های دوک به صورت شماتیک نمایش داده شدند، تا سلول‌های تخم متوقف شده در متافاز میوز II را نشان دهند. مرحله ❸: لقاح با اسپرم، تخم‌ها را از توقف در متافاز آزاد کرده و به آنها اجازه می‌دهد آنافاز میوز II و دومین تقسیم سلولی غیرمتقارن را نیز انجام دهند که در این تقسیم یک کروماتید از هر کروموزوم به داخل یک جسم قطبی دوم رفته و حذف می‌شود. مرحله ❹: پیش هسته هاپلوئید حاصل در جنس ماده با پیش هسته هاپلوئید اسپرم، ادغام شده و یک زیگوت دیپلوئید تولید می‌کند که همانندسازی DNA و اولین میتوز از ۱۲ تسهیم جنینی اولیه همزمان را انجام می‌دهد. (b) تصویر الکترونی از اووسیت‌های زنوپوس.

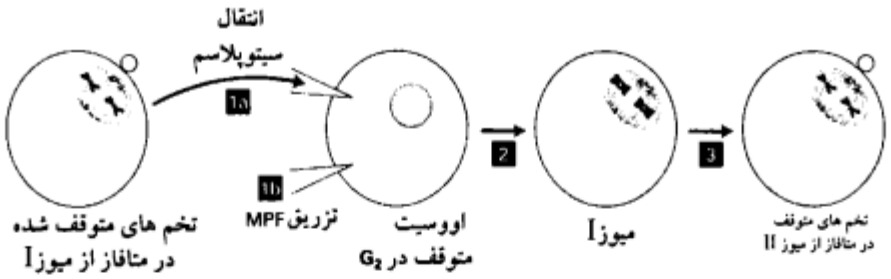
کنید). وقتی یک ماده بالغ توسط یک نر تحریک می‌شود، سلول‌های تخمدانی آن هورمون استروئیدی پروژسترون را ترشح کرده و باعث می‌شود اووسیت‌های متوقف شده در G_2 وارد میوز I شده و تا متافاز میوزی دوم پیشرفت کنند (شکل ۵ـ۲۰) در این مرحله سلول‌ها تخم نامیده می‌شود و وقتی که با اسپرم لقاح یابند، هسته تخم از مرحله متافاز II که در آن متوقف شده بود رها شده و میوز کامل می‌گردد. سپس پیش هسته تخم هاپلوئید حاصل، با پیش هسته[1] اسپرم هاپلوئید ادغام شده و هسته دیپلوئید **زیگوت** را تولید می‌کند. همانندسازی DNA نیز به دنبال آن اتفاق می‌افتد و اولین تقسیم میتوزی از اوایل جنین زایی شروع می‌شود. سپس سلول‌های جنینی حاصل ۱۱ چرخه سلولی سریع و همزمان را پشت سر می‌گذارند و یک کره توخالی به نام بلاستولا تولید می‌کنند. تقسیم سلولی آرام شده و تقسیم‌های بعدی غیرهمزمان می‌گردد و سلول‌های مناطق مختلف در بلاستولا به دفعات مختلفی تقسیم می‌گردند. فایده استفاده از چنین سیستمی در مطالعه فاکتورهای درگیر در میتوز این است که تعداد زیادی از اووسیت‌ها و تخم را فراهم می‌کند که همگی به طور همزمان پیش می‌روند و به دنبال آن تیمار پروژسترون و لقاح قرار دارد که این امر، امکان در دسترس قرار گرفتن مقادیر کافی عصاره سلولی برای مطالعات بیوشیمیایی را می‌دهد.

در این قسمت، ما بررسی می‌کنیم چگونه آزمایشات با زنوپوس منجر به کشف و تعیین خصوصیات فاکتورهایی شد که ورود و خروج از میتوز را کنترل می‌کنند. همچنین در مورد تشخیص و تعیین خصوصیات برخی از اجزای پروتئینی و چگونگی تنظیم وقایع میتوزی توسط آن‌ها بحث خواهیم کرد.

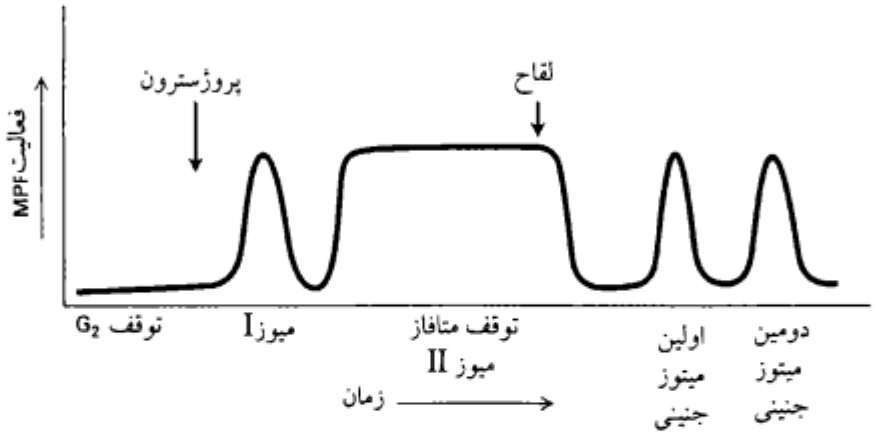
فاکتور پیش برنده بلوغ (MPF) بلوغ میوزی در اووسیت‌ها و میتوزی را در سلول‌های سوماتیک تحریک می‌کند

وقتی که اووسیت‌های متوقف شده در G_2 زنوپوس، از تخمدان قورباغه ماده بالغ بیرون آورده شده و در شرایط آزمایشگاهی با پروژسترون تیمار داده شوند، آنها **بلوغ میوزی** را تجربه می‌کنند. بلوغ

1- Pronucleus



▲ **شکل تجربی ۶ـ۲۰. یک فاکتور محلول در تخم‌های متوقف شده در زنوپوس، بلوغ میوزی را پیش می‌برد.** وقتی حدود ۵ درصد از سیتوپلاسم یک تخم لقاح نیافته زنوپوس متوقف شده در متافاز میوز II به اووسیت متوقف در G_2 تزریق گردد (مرحله 1a)، اووسیت وارد میوز I می‌شود (مرحله 2) و تا متافاز میوز II پیش رفته (مرحله 3) و یک تخم بالغ را در غیاب پروژسترون تولید می‌کند. این فرآیند می‌تواند بدون افزودن پروژسترون چندین بار تکرار گردد، که نشان می‌دهد سیتوپلاسم حاوی فاکتور پیش برنده بلوغ (MPF) است. تزریق اووسیت‌های متوقف در G_2 اولین سنجش برای فعالیت MPF (مرحله 1b) را در مراحل مختلف چرخه سلولی و از موجودات مختلف فراهم کرد.

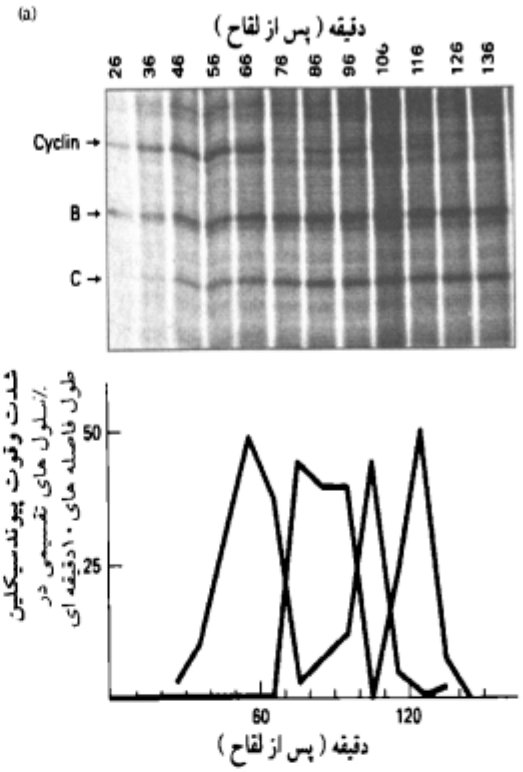


▲ **شکل تجربی ۷ـ۲۰. فعالیت MPF در اووسیت‌ها، تخم‌ها و جنین‌های زنوپوس وقتی سلول‌ها وارد میتوز و میوز می‌شوند، به اوج خود می‌رسد.** دیاگرام ساختارهای سلولی مسئول هر مرحله در شکل ۵ـ۲۰ نشان داده شده است. فعالیت MPF توسط سنجش ریز تزریقی نشان داده شده در شکل ۶-۲۰ سنجش شده و با ساختن رقت‌هایی از عصاره‌های سلولی تعیین مقدار شدند. برای بحث بیشتر به متن مراجعه کنید.

میوزی فرآیند بلوغ اووسیت از اووسیت متوقف در G_2 به تخم متوقف در متافاز میوز II است (شکل ۵ـ۲۰ را ملاحظه کنید). تزریق سیتوپلاسم از تخم‌های متوقف در متافاز میوز II به اووسیت‌های متوقف در G_2 اووسیت‌ها را تحریک می‌کند که در غیاب پروژسترون به تخم، بلوغ یابند (شکل ۶ـ۲۰). این سیستم نه تنها منجر به شناسایی ابتدایی فاکتوری در سیتوپلاسم تخم شد که موجب تحریک بلوغ در شرایط درون آزمایشگاهی می‌شد، بلکه همچنین روشی برای سنجش این فاکتور نیز فراهم کرد. این فاکتور، **فاکتور پیش برنده بلوغ**[1] (MPF) خوانده می‌شود. همانطور که به اختصار خواهیم دید، MPF مجتمع می‌شود تا یک هتروداینمر سیلکین-CDK (فاکتور کلیدی تنظیم‌کننده آغاز میتوز در تمامی سلول‌های یوکاریوت‌ها) گردد.

با استفاده از سیستم ریزتزریق برای سنجش فعالیت MPF در زمان‌های مختلف در طول بلوغ اووسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی، محققان دریافتند، اووسیت‌های تیمار نشده متوقف در G_2 فعالیت MPF کمی دارند، اما تیمار پروژسترون موجب القای فعالیت MPF در حین ورود سلول‌ها به میوز I می‌شود (شکل ۷ـ۲۰). فعالیت MPF در حین ورود سلول‌ها به اینترفاز بین میوز I و II افت می‌کند، اما دوباره در هنگام ورود به میوز II بالا می‌رود و در سلول‌های تخم متوقف در متافاز II بالا باقی می‌ماند. به دنبال لقاح، فعالیت MPF دوباره افت می‌کند تا زمانی که زیگوت (تخم لقاح یافته) وارد اولین میتوز از نمو جنینی شود. در طول ۱۱ چرخه همزمان میتوز در جنین اولیه، فعالیت MPF در فاصله‌های اینترفاز بین میتوزها پایین بوده و سپس در هنگام ورود سلول‌ها به میتوز بالا می‌رود.

1- Maturation - promoting factor



▲ **شکل تجربی ۸ـ۲۰ (شکل رنگی): اتورادیوگرافی تشخیص سنتز چرخه‌ای و تخریب سیکلین میتوزی را در جنین‌های توتیای دریایی ممکن می‌سازد.** یک سوسپانسیون از تخم‌های توتیای دریایی با افزون اسپرم توتیای دریایی به طور همزمان بارور شد، به این سوسپانسیون متیونین ^{35}S افزوده شد. در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه که ۲۶ دقیقه پس از بارورسازی آغاز شد، برای بررسی پروتئین‌ها بر روی ژل پلی اکریلامید SDS و تشخیص تقسیم سلول با میکروسکوپ، نمونه‌برداری انجام شد. (a) اتورادیوگرام ژل SDS نمونه‌ها را در هر نقطه زمانی برداشته شده نشان می‌دهد. اغلب پروتئین‌ها، همچون C و B، به طور پیوسته از نظر شدت افزایش یافتند. در مقابل، سیکلین ناگهان در دقیقه ۷۶ پس از لقاح کاهش یافت و دوباره در دقیقه ۸۶ شروع به افزایش کرد. باند سیکلین دوباره در دقیقه ۱۰۶ به اوج خود رسید و دوباره در دقیقه ۱۲۶ کاهش یافت. (b) نمودار شدت باند سیکلین (خط قرمز) و مقداری از سلول‌ها که در طول فاصله زمانی ۱۰ دقیقه پیشین تقسیم شده بودند (خط آبی). توجه داشته باشید که مقدار سیکلین درست پیش از تقسیم سلولی با شتاب کاهش می‌یابد.

علاوه بر کشفیات ابتدایی در قورباغه‌ها، فعالیت MPF در سلول‌های میتوزی از تمامی گونه‌ها سنجیده شد. برای مثال، سلول‌های کشت داده شده پستانداران را می‌توان با تیمار توسط ترکیباتی (مثلاً کلشی سین) که متوقف‌کننده تولید میکروتوبولین‌ها هستند، در متافاز میتوز متوقف کرد. این عمل مشابه توقف طبیعی تخم‌های زنوپوس در متافاز میوز II تا هنگام لقاح است (شکل ۵ـ۲۰). وقتی سیتوپلاسم چنین سلول‌های پستانداران متوقف شده در میتوز به اووسیت‌های زنوپوس متوقف در G_2 تزریق شد، اووسیت‌ها به صورت تخم بلوغ یافتند. این نشان می‌دهد که سلول‌های میوزی سوماتیک پستانداران حاوی فاکتور سیتوپلاسمی هستند که فعالیت MPF قورباغه را از خود نشان می‌دهد. این یافته‌ها بیان می‌کنند، MPF ورود سلول‌های سوماتیک پستانداران را به میتوز و همچنین ورود اووسیت‌های قورباغه را به میوز کنترل می‌کند.

هنگامی که سیتوپلاسم سلول‌های سوماتیک پستانداران متوقف شده در میتوز به درون سلول‌های اینترفازی تزریق شد، سلول‌های اینترفازی وارد میتوز شدند که در این حالت غشاءهای هسته‌ای‌شان به درون ER جمع شده و کروموزوم‌هایشان متراکم شدند. بنابراین MPF فاکتور محلول پیش برنده ورود سلول به میتوز است و اولین بار توسط آزمایشات ادغام سلولی نشان داده شد (شکل ۳ـ۲۰ را ملاحظه کنید). به راحتی می‌توان گفت واژه اختصاری MPF می‌تواند مخفف **فاکتور پیش برنده میتوز**[1] باشد، نامی که نشانه فعالیت عمومی‌تر این فاکتور است.

از آنجایی که سنجش تزریق اووسیت که در ابتدا برای اندازه‌گیری فعالیت MPF به کار برده می‌شد با سختی‌های بسیاری همراه بود، سالها گذشت تا MPF توسط کروماتوگرافی ستونی تخلیص شد و ویژگی‌های آن به صورت مستقیم بررسی شد. قبل از تکمیل این روند، اجزای فردی MPF از طریق آزمایشات مختلفی تشخیص داده شدند. ما در اینجا، ابتدا در مورد این بحث می‌کنیم که چگونه زیرواحد سیکلین تنظیمی شناسایی شد و سپس در بخش ۳ـ۲۰ توضیح خواهیم داد چگونه آزمایشات ژنتیکی بر روی مخمر منجر به کشف زیرواحد کاتالیزی CDK گردید. آنتی بادی‌های ویژه‌ای بر ضد سیکلین‌میتوزی و زیرواحدهای CDK شناسایی شده که بوسیله اینها و روش‌های دیگر، نشان داده شده که سیکلین‌و CDK خالص شده با آن فعالیت MPF دارند. وقتی که خالص‌سازی MPF با کروماتوگرافی ستونی تکمیل شد، به وضوح روشن شد که سیکلین و CDK اجزای اصلی آن بودند.

سیکلین میتوزی اولین بار در جنین‌های ابتدایی توتیای دریایی شناسایی شد

آزمایشات انجام شده با مهارکننده‌های سنتز پروتئین نشان داد

1- Mytosis promoting factor

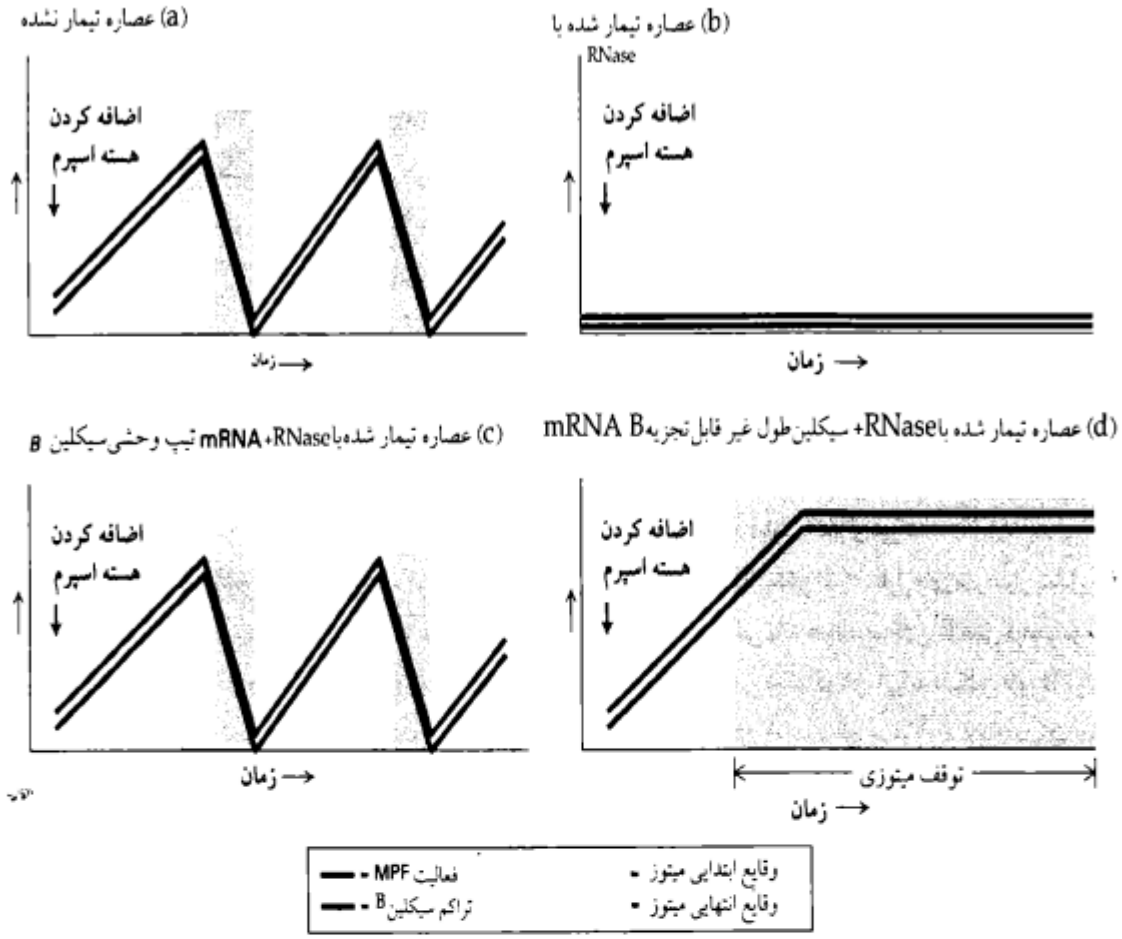
که برای افزایش فعالیت MPF در طول مرحله میتوزی هر چرخه سلولی در جنین‌های اولیه قورباغه، سنتز پروتئین جدید لازم است. همچون جنین اولیه قورباغه، چرخه‌های سلول اولیه در جنین اولیه توتیای دریایی به طور همزمان با ورود تمام سلول‌های جنینی به میتوز اتفاق می‌افتد. آزمایش بیوشیمی بعدی با تخم‌ها و جنین‌های توتیای دریایی موجب شناسایی جز سیکلینی MPF شد. مقادیر زیادی از تخم‌های توتیای دریایی جمع‌آوری و به طور همزمان بارور شده و در محیط کشت حاوی اسیدهای آمینه رادیواکتیو قرار گرفتند. پس از بارورسازی، نمونه‌های کوچکی از جنین‌هایی که به طور همزمان تقسیم می‌شوند، در فواصل زمانی متفاوت برداشته شده و پروتئین‌های نشاندار شده با الکتروفورز ژل SDS جدا شده و با اتورادیوگرافی ژل بررسی شدند (شکل ۸ـ۲۰). یک پروتئین که به مقدار زیاد بیان شده بود غلظت‌اش به سرعت افزایش پیدا کرده و ناگهان درست پیش از تقسیم سلول دچار افت شد و سپس دوباره در طول اینترفاز برای اینکه در میتوز بعدی به سرعت افزایش یابد، تجمع یافته و درست پیش از تقسیم دوم ناگهان افت پیدا کرد (شکل ۸ـ۲۰). بررسی دقیق نشان داد این پروتئین به نام **سیکلین B** به طور پیوسته در طول چرخه‌های سلولی جنین سنتز می‌شود اما پس از هر آنافاز ناگهان از بین می‌رود. از آنجایی که تجمع این پروتئین در میتوز افزایش می‌یابد، سیکلین B به عنوان **سیکلین میتوزی** عمل می‌کند. در آزمایشات بعدی، یک کلون cDNA که سیکلین B توتیای دریایی را رمزدهی می‌کند، به عنوان پروب در جداسازی یک cDNA سیکلین B از **زنوپوس لوئیس** استفاده شد. بیان این cDNA، پروتئین خالص سیکلین B زنوپوس را تولید کرد که برای تولید آنتی بادی ویژه برای سیکلین B استفاده شد. این آنتی بادی با لکه‌گذاری وسترن ، پلی پپتیدی را شناسایی می‌کند که با فعالیت MPF از تخم‌های زنوپوس خالص می‌شود و نشان می‌دهد که سیکلین B عملاً یکی از اجزای MPF است.

سطوح سیکلین B و فعالیت کیناز عامل پیش برنده میتوز (MPF) هر دو در عصاره‌های تخم زنوپوس در ماده چرخه سلولی تغییر می‌کنند

دو خصوصیت غیرمعمول همزمانی چرخه‌های سلولی در جنین‌های اولیه زنوپوس، راهی برای مطالعه نقش سیکلین میتوزی در مهار فعالیت MPF فراهم نمودند. ابتدا، پس از بارورسازی تخم‌های زنوپوس، دوره‌های G_2 و G_1 در طول ۱۲ چرخه سلول همزمان اولیه کاهش می‌یابند. به این معنی که وقتی میتوز کامل شد، سلول‌های جنینی اولیه به سرعت به مرحله S بعدی پیش می‌روند، و هنگامی که رونویسی DNA کامل شد، سلول‌ها تقریباً به سرعت به میتوز بعدی روی می‌آورند. دوم، نوسان در فعالیت MPF است که به محض ورود و خروج جنین‌های اولیه قورباغه به میتوز اتفاق می‌افتد و حتی هنگامی که هسته برداشته شده است و هیچ رونویسی نمی‌تواند انجام گیرد، در سیتوپلاسم تخم لقاح یافته قورباغه مشاهده می‌شود. این پدیده‌ها با برداشت هستک تخم **زنوپوس** و سپس با برداشت سیتوپلاسم پس از فاصله‌های زمانی متفاوت و آزمایش فعالیت MPF با سنجش بلوغ (رسیدگی) اووسیت کشف گردید (شکل ۶ـ۲۰ را مشاهده کنید). این مستقل بودن ساعت چرخه سلول تنها در تقسیم‌های اولیه جنین‌های حیوان یعنی در آنجا که بسیاری از نقاط کنترل چرخه سلول (بعداً بحث خواهیم کرد) عمل نمی‌کنند، یافت می‌شود. این مشاهدات نشان می‌دهند که تمام اجزای سلولی لازم برای پیشرفت در طول چرخه‌های تقسیم سلولی در جنین‌های زنوپوس اولیه، در تخم لقاح یافته ذخیره می‌شوند. در سلول‌های سوماتیک که بعداً در تکوین و در مخمر (در قسمت‌های بعد بررسی خواهد شد) تولید می‌شوند، mRNA خاصی می‌بایست در نقاط خاصی در چرخه سلول تولید شود؛ با وجود این، در جنین‌های زنوپوس اولیه تمام mRNA های لازم برای تقسیم‌های سلول اولیه در تخم لقاح نیافته وجود دارند.

عصاره‌های تهیه شده از تخم‌های زنوپوس لقاح نیافته حاوی تمامی مواد لازم برای چندین چرخه سلول می‌باشد، از این مواد می‌توان به آنزیم‌ها و پیش‌سازهای مورد نیاز برای همانندسازی DNA، هیستون‌ها و دیگر پروتئین‌های کروماتین دخیل در تجمع DNA همانندسازی شده به کروموزوم‌ها، پروتئین‌ها و فسفولیپیدهای لازم در تشکیل پوشش هسته‌ای اشاره کرد. این عصاره‌های تخم همچنین پروتئین‌هایی را سنتز می‌کنند که توسط mRNA های موجود در عصاره رمزدهی می‌شوند از این پروتئین‌ها می توان به سیکلین B اشاره کرد.

وقتی هسته‌های حاصل از اسپرم زنوپوس به عصاره تخم زنوپوس افزوده شوند، هسته و DNA درون آن وادار می‌شوند طوری رفتار کنند که گویی در حال انجام چرخه سلول هستند. به این دلیل هسته‌های اسپرم در این آزمایش استفاده می‌شوند چون به آسانی به مقدار زیاد جدا شده و حاوی کروماتین با غلظت بالا می‌باشند. تغییر شگرفی که در مورفولوژی به هنگام از دست دادن تراکم کروماتین اسپرم رخ می‌دهد، آشکار است. وقتی هسته‌های متراکم اسپرم به عصاره تخم اضافه می‌شوند، کروماتین اسپرم تراکم خود را از دست



▲ شکل تجربی ۹ـ۲۰ (شکل رنگی): فعالیت MPF در چرخه سلولی و رویدادهای میتوزی در عصاره‌های تخم زنوپوس وابسته به سنتز و تحت سیکلین B است. همانطور که در هر قسمت نشان داده شد، در تمام موارد، فعالیت کینازی MPF و تجمع سیکلین B در زمان‌های مختلف پس از افزودن هسته‌های اسپرم به عصاره تخم زنوپوس تعیین شد. مشاهدات میکروسکوپی وقوع رویدادهای زودرس میتوزی (سایه روشن آبی) شامل متراکم شدن کروموزوم‌ها و تخریب پوشش هسته‌ای، و رویدادهای دیررس (سایه روشن نارنجی) شامل از دست دادن کروموزوم و بازسازی پوشش هسته‌ای را نشان داد. برای بحث به متن مراجعه کنید.

داده و DNA یک بار همانندسازی می‌کند. سپس کروموزوم‌های اسپرم متراکم شده و درست همان طور که هنگام ورود سلول‌های سالم به میتوز رخ می‌دهد، پوشش هسته‌ای خرد می‌گردد. حدود ۱۰ دقیقه پس از خرد شدن پوشش هسته‌ای، همانند سلول‌های سالم و در پی آنافاز، تمام سیکلین B موجود در عصاره ناگهان کاهش می‌یابد. به دنبال کاهش سیکلین B، کروموزوم‌های اسپرم تراکم خود را از دست داده و همانند سلول سالم در طی تلوفاز، پوشش هسته‌ای اطراف آنها بازسازی می‌شود. پس از حدود ۲۰ دقیقه، چرخه دوباره آغاز می‌گردد. این عصاره‌های تخم زنوپوس جالب، می‌توانند تعدادی از این چرخه‌ها را انجام دهند که از چرخه‌های هماهنگ سریع یک جنین اولیه قورباغه تقلید می‌کنند.

بررسی‌ها با این سیستم آزمایشی عصاره تخم با گسترش یک سنجش جدید برای فعالیت MPF انجام شد. محققان با استفاده از MPF خالص شده با کمک آزمایش تزریق اووسیت (شکل ۶ـ۲۰ را مشاهده کنید)، دریافتند که MPF هیستون H_1 را فسفریله می‌کند. این فعالیت کیناز H_1 از نظر کمی، سنجشی بسیار آسان‌تر و ساده‌تر برای فعالیت MPF را نسبت به آزمایش تزریق اووسیت فراهم می‌کند. با مجهز شدن به یک روش سنجش آسان، محققان کیناز MPF و غلظت سیکلین B را در عصاره‌های تخم زنوپوس در حال چرخه سلولی دنبال کردند. این بررسی‌ها نشان داد که فعالیت MPF هماهنگ با تجمع سیکلین B کم و زیاد می‌شود (شکل ۹a ـ۲۰). وقایع اوایل میتوز - متراکم‌شدن کروموزوم و

پاره‌شدگی پوشش هسته‌ای - زمانی اتفاق می‌افتند که فعالیت MPF به موازات افزایش در تجمع سیکلین B به بالاترین سطوح خود می‌رسد. وقایع اواخر میتوز (با از دست رفتن تراکم کروموزوم و تشکیل مجدد پوشش هسته‌ای) زمانی اتفاق می‌افتد که فعالیت MPF به موازات کاهش غلظت سیکلین B افت می‌کند.

برای آزمودن عملکردهای سیکلین B در این وقایع چرخه سلولی، تمام mRNA در عصاره تخم با غلظت پائینی از RNase هضم شده و سپس این آنزیم با افزودن یک مهارکننده مخصوص غیرفعال شد. این شیوه بدون آسیب زدن به tRNAها و rRNAهای لازم برای سنتز پروتئین، mRNAها را تخریب می‌کند. وقتی هسته‌های اسپرم به عصاره‌های تیمار شده با RNase افزوده شدند، هسته‌های DNA خود را همانندسازی کردند، اما افزایش فعالیت MPF و وقایع میتوزی اولیه (که در عصاره تیمار نشده انجام می‌شد)، رخ نداد (شکل ۹ـ۲۰ b). با افزودن mRNA سیکلین B (که در آزمایشگاه از cDNA کلون شده سیکلین B تولید شده) به عصاره تخم تیمار شده با RNase و هسته اسپرم همانند عصاره تخم تیمار نشده مشاهده می‌شود، نوسان مشابهی در غلظت سیکلین B و فعالیت MPF و خصوصیات اوایل و اواخر وقایع میتوزی ایجاد می‌گردد (شکل ۹ـ۲۰). از آن جایی که سیکلین B تنها پروتئین سنتز شده در این شرایط است، این نتایج نشان می‌دهند این پروتئین حیاتی بوده و سنتز آن برای تنظیم فعالیت MPF و چرخه‌های متراکم شدن کروموزوم و تخریب پوشش هسته‌ای که با عصاره‌های تخم زنوپوس انجام می‌شود، لازم می‌باشد.

در این آزمایشات، وقایع اواخر میتوز یعنی از دست رفتن تراکم کروموزوم‌ها و تخریب پوشش هسته‌ای باکاهش در سطح سیکلین B و فعالیت MPF همراه است. محققان برای تعیین اینکه آیا کاهش سیکلین B برای خروج از میتوز لازم است، mRNA جهش یافته‌ای را که یک سیکلین B غیرقابل تجزیه رمزدهی می‌کند به مخلوطی از عصاره تخم زنوپوس تیمار شده با RNase و هسته‌های اسپرم اضافه کردند. همان طور که در شکل ۹ـ۲۰ d نشان داده شده، فعالیت MPF به موازات افزایش سطح سیکلین B جهش یافته افزایش یافته و موجب متراکم شدن کروماتین اسپرم و تخریب پوشش هسته‌ای می‌شود (وقایع اوایل میتوز). با وجود این، سیکلین B جهش یافته در این واکنش هیچگاه تجزیه نمی‌شود. در نتیجه، فعالیت MPF در حد بالایی باقی مانده و وقایع اواخر میتوز یعنی از دست رفتن تراکم کروموزوم و تشکیل پوشش هسته‌ای هر دو متوقف می‌شوند. این آزمایش نشان می‌دهد که افت در فعالیت MPF و خروج از میتوز به تجزیه سیکلین B وابسته است.

نتایج دو آزمایش با عصاره‌های تیمار شده با RNase نشان داد، ورود به میتوز نیازمند تجمع پروتئین سیکلین B (سیکلین میتوزی زنوپوس)، به مقدار زیاد بوده و خروج از میتوز نیازمند کاهش این سیکلین میتوزی است. از آنجایی که فعالیت MPF کیناز به موازات غلظت سیکلین میتوزی تغییر می‌کند، نتایج نشان می‌دهد که سیکلین B یکی از اجزای MPF است. علاوه بر این، فعالیت شدید MPF کیناز موجب ورود به میتوز شده و افت در فعالیت MPF کیناز برای خروج از میتوز لازم است.

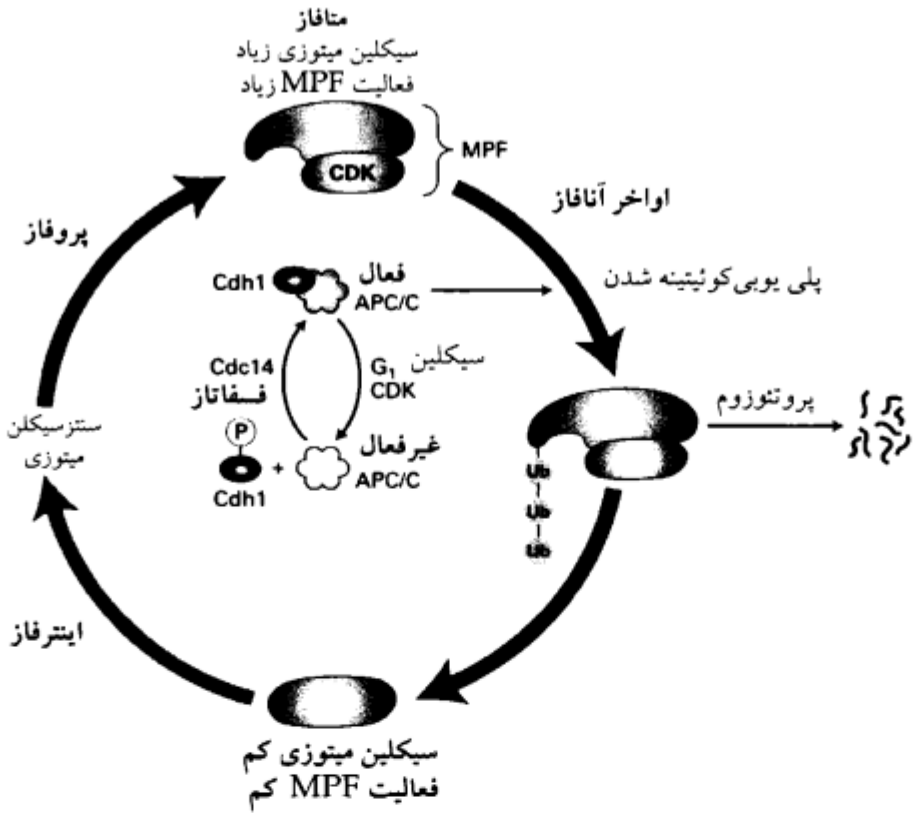
کمپلکس پیش برنده آنافاز (APC/C) تجزیه سیکلین‌های میتوزی و خروج از میتوز را کنترل می‌کند

بررسی‌های بیشتر نشان داد که سلول‌های مهره‌داران شامل سه پروتئین هستند که می‌تواند همانند سیکلین B عمل کرده و موجب بلوغ اووسیت زنوپوس شوند: دو تای آنها به سیکلین‌های B مرتبط بوده و سومی سیکلین A است. آنها مشترکاً، به عنوان سیکلین‌های **نوع B**[1] مشهورند. و به این دلیل گروه‌بندی شدند که هر کدامشان به سرعت در اواخر میتوز تجزیه می‌شوند. در سلول‌های سالم، تجزیه تمام سیکلین‌های نوع B پس از آغاز آنافاز، یعنی فاصله زمانی از میتوز که کروماتیدهای خواهر از هم جدا و به طرف دوک‌های قطبی مخالف کشیده می‌شوند، شروع می‌گردد.

بررسی‌های بیوشیمی بر روی عصاره‌های تخم زنوپوس نشان داد که در زمان تجزیه آنها، سیکلین‌های نوع B نوع وحشی با افزوده شدن کووالانی چندین مولکول یوبی‌کوئیتین تغییر می‌یابند. همان طور که قبلاً اشاره شد، این فرآیند، با پلی یوبی‌کوئیتینه کردن، پروتئین‌ها را برای تجزیه سریع در سلول‌های یوکاریوتی توسط پروتئوزوم‌ها، (ساختارهای استوانه‌ای چند پروتئینی با پروتئازهای فراوان)، نشانه‌دار می‌کند. لیگازهای یوبی‌کوئیتین - پروتئین، افزودن زنجیره‌های یوبی‌کوئیتین را به سیکلین‌های نوع B یا دیگر پروتئین‌های هدف میانجی‌گری می‌کنند (شکل ۲۹ـ۳ را ملاحظه کنید). بسیاری از یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگازها، کمپلکس‌های پروتئینی چندزیرواحدی هستند.

تعیین توالی cDNAهای رمزدهی کننده چندین سیکلین نوع B از یوکاریوت‌های مختلف نشان داد که همه آنها شامل توالی نُه اسیدآمینه‌ای هومولوگ نزدیک به انتهای N هستند که «جعبه

1- B - Type



▲ **شکل ۱۰-۲۰: تنظیم سطوح سیکلین میتوزی در سلول‌های جنینی اولیه زنوپوس در حال چرخه سلولی.** در اواخر آنافاز، کمپلکس پیش برنده آنافاز (APC/C) سیکلین‌های میتوزی را پلی یوبی‌کوئیتینه می‌کند. از آنجایی که پروتئوزوم‌ها سیکلین‌ها را تجزیه می‌کنند، فعالیت MPF کیناز با شتاب افت کرده و موجب آغاز تلوفاز می‌گردد. فعالیت APC/C توسط فاکتور اختصاصیت، به سمت سیکلین‌های میتوزی هدایت می‌شود. فاکتور اختصاصیت cdh1 نام داشته و فسفریله شده و سپس توسط کمپلکس‌های سیکلین -CDK از G_1 غیرفعال می‌شود. یک فسفاتاز ویژه به نام cdc14 فسفات تنظیمی را از فاکتور اختصاصیت در آنافاز برمی‌دارد. هنگامی که فاکتور اختصاصیت در G_1 مهار شود، غلظت سیکلین میتوزی افزایش یافته و به میزان کافی برای تحریک ورود به میتوز بعدی می‌رسد.

تخریب[1]» نامیده می‌شود. حذف این جعبه تخریب، همان طور که در مورد mRNA جهش یافته مورد استفاده در آزمایش شکل d ۹-۲۰ مشاهده می‌شود، از پلی یوبی‌کوئیتینه شدن سیکلین‌های نوع B جلوگیری کرده و به این ترتیب آنها را غیرقابل تجزیه می‌نماید. یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگازهای شناسایی‌کننده جعبه تخریب سیکلین میتوزی یک پروتئین چند زیر واحدی بوده و کمپلکس‌های پیش برنده آنافاز (APC/C) نامیده می‌شود که قبلاً در این فصل با آن آشنا شدیم (شکل ۲-۲۰ را ملاحظه کنید).

شکل ۱۰-۲۰ مدل کنونی را نشان می‌دهد که تغییرات مشاهده شده در سطوح سیکلین میتوزی را در چرخه سلول‌های جنینی اولیه **زنوپوس** به خوبی توضیح می‌دهد. در جنین‌های اولیه، سیکلین میتوزی طی چرخه سلول از یک mRNA ثابت سنتز می‌شود. اُفت مشاهده شده در تجمع سیکلین میتوزی در اواخر آنافاز در نتیجه تجزیه تحریک شده توسط APC/C در این نقطه در چرخه سلول است. همان طور که در قسمت ۵-۲۰ ذکر شده، بررسی‌های ژنتیکی با مخمر منجر به تشخیص یک **فاکتور اختصاصیت** APC/C[2] به نام cdhl شد که به APC/C متصل شده و آن را به سوی سیکلین‌های میتوزی پلی یوبی کوئیتینه شده هدایت می‌کند. این فاکتور اختصاصیت تنها در اواخر آنافاز و هنگامی که در تقسیم سلول کروموزوم‌های جدا شده به قدری از هم فاصله گرفتند تا تضمین نمایند هر دو سلول دختر یک محموله کامل از کروموزوم‌ها را خواهند داشت، فعال می‌شود.

فعالیت Cdh1 با وقایع فسفریلاسیون تنظیم می‌شود، فسفریلاسیون cdh1 توسط کمپلکس‌های سیکلین - G_1 CDK طی G_1، تجمع آن را با APC/C و بنابراین تجزیه سیکلین میتوزی

1- Destruction box

2- APC/C specificity factor

را مهار می‌کند. این مهار موجب بالا رفتن تدریجی در سطح سیکلین میتوزی می‌گردد که در طی اینترفاز چرخه سلول بعدی مشاهده می‌شود. وقتی کروموزوم‌های دختر در اواخر آنافاز به طور مناسب جدا شدند، فسفاتاز cdc۱۴ فعال شده و cdh1 را دفسفریله کرده و به آن امکان می‌دهد به APC/C متصل شود. این میانکنش به سرعت منجر به پلی یوبی‌کوئیتینه شدن به واسطه APC/C و تجزیه پروتئوزومی سیکلین‌های نوع B و بنابراین غیرفعال شدن MPF می‌شود (شکل ۱۰ـ۲۰ را ملاحظه کنید). در قسمت ۷-۲۰، خواهیم دید که چطور فعالیت Cdc14 خود تحت کنترل قرار می‌گیرد تا تضمین نماید که یک سلول تنها زمانی از میتوز خارج شود که کروموزم‌هایش به طور مناسب از هم جدا شده باشند.

نکات کلیدی بخش ۲-۲۰

کنترل میتوز توسط سیکلین‌ها و فعالیت MPF

■ MPF یک پروتئین کیناز بوده و نیازمند سیکلین میتوزی برای فعالیت می‌باشد. فعالیت پروتئین کیناز MPF آغاز میتوز را با فسفریله کردن چندین سوبسترای پروتئینی ویژه که اغلب آنها تاکنون شناسایی نشده‌اند، تحریک می‌کند.

■ در سلول‌های زنوپوس اولیه که به طور هم زمان تقسیم می‌شوند و در جنین‌های توتیای دریایی، تجمع سیکلین‌های میتوزی (مانند سیکلین B) و فعالیت MPF به محض ورود سلول‌ها به میتوز افزایش و سپس به محض خروج سلول‌ها از میتوز کاهش می‌یابد.

■ افزایش و کاهش در فعالیت MPF در طول چرخه سلول حاصل سنتز و تجزیه همزمان پروتئین سیکلین میتوزی است.

■ کمپلکس چند زیرواحدی پیش برنده آنافاز (APC/C) یک یوبی‌کوئیتین لیگاز بوده و توالی حفاظت شده جعبه تخریبی را در سیکلین‌های میتوزی تشخیص داده، باعث پلی یوبی‌کوئیتینه شدن آنها و در آخر نشانه‌دار کردن پروتئین‌ها برای تجزیه سریع توسط پروتئوزوم‌ها می‌شود. کاهش حاصل در فعالیت MPF منجر به تکمیل میتوز می‌گردد.

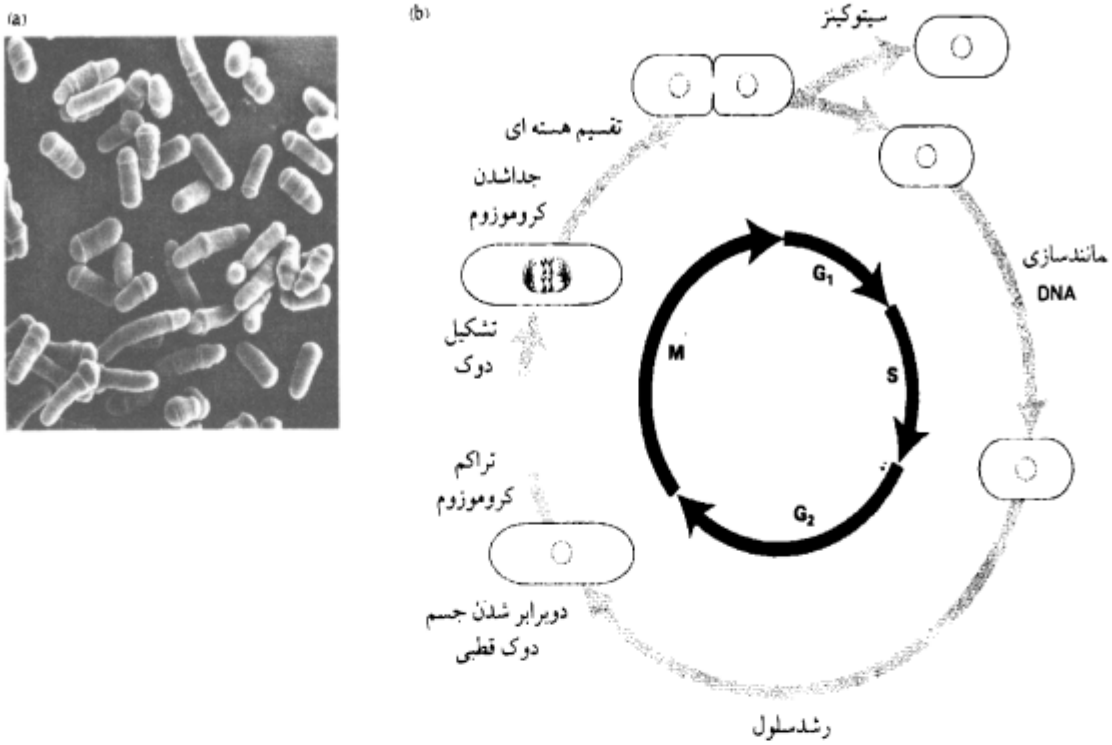
■ فعالیت یوبی کوئیتین لیگاز APC/C طوری کنترل می‌شود که سیکلین‌ها تنها در اواخر آنافاز پلی یوبی کوئیتینه گردند (شکل ۱۰ـ۲۰ را ملاحظه کنید). غیرفعال شدن APC/C در G_1 تجمع سیکلین‌های میتوزی را در طول چرخه سلولی بعدی ممکن می‌سازد. این فرآیند موجب افزایش و کاهش‌های چرخه‌ای در فعالیت MPF شده و منجر به ورود به میتوز و خروج از آن می‌شود.

۲۰-۳ تنظیم کیناز وابسته به سیکلین در طی میتوز

بررسی عصاره‌های تخم زنوپوس که در بخش قبلی شرح داده شد، نشان داد، سنتز مداوم سیکلین میتوزی و در پی آن تجزیه در اواخر آنافاز برای چرخه‌های سریع میتوز که در جنین‌های زنوپوس اولیه مشاهده می‌شود لازم است. تشخیص زیرواحد کاتالیزی پروتئین کیناز در MPF و نگرش به تنظیم آن، در آغاز از تحلیل ژنتیکی چرخه سلول در مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسیس پمبه حاصل گردید. یک مزیت بررسی‌های ژنتیکی این است که ژن‌های درگیر در یک فرآیند (و به راحتی کلون شده از مخمر) را می‌توان بدون داشتن اطلاعی درباره فعالیت‌های بیوشیمیایی از پروتئین‌هایی که آنها رمزدهی می‌کنند، شناسایی کرد.

اسکیزوساکارومایسیس پمبه به صورت یک سلول میله‌ای شکل رشد کرده و در طی رشد طولش افزایش می‌یابد و سپس در طول میتوز از وسط نصف شده و دو سلول دختر هم اندازه به وجود می‌آورد (شکل ۱۱ـ۲۰). برخلاف اغلب سلول‌های پستانداران که ابتدا در طول G_1 رشد می‌کنند، این مخمر بیشتر رشد خود را در طول مرحله G_2 چرخه سلول انجام می‌دهد. ورود به میتوز در پاسخ به اندازه سلول برای هماهنگ کردن مناسب تقسیم سلول با رشد سلول به دقت تنظیم می‌شود. در نتیجه، این ارگانیسم برای جداسازی جهش یافته‌ها در ژن‌هایی که ورود به میتوز را تنظیم می‌کنند، مطلوب است زیرا جهش‌هایی که مدّت میتوز را تغییر می‌دهند سلول‌هایی با اندازه غیرطبیعی و فنوتیپی که به سادگی مشاهده می‌شود، ایجاد می‌کنند.

جهش یافته‌های حساس به دما در اسکیزوساکارومایسیس پمبه با نقایص محیطی در توانایی پیشرفت در طول چرخه سلولی به اسانی قابل تشخیص هستند زیرا آنها موجب تغییرات مشخصی در طول سلول در دمای غیرمتعادل می‌شوند. بسیاری از این جهش یافته‌ها جدا شده، و در دو گروه قرار می‌گیرند. در گروه اول جهش یافته‌های cdc هستند که نسبت به پیشرفت در یکی از مراحل چرخه سلول در دمای غیرمتعادل ناتوان هستند؛ آنها به رشد طولی خود ادامه داده و سلول‌های فوق‌العاده بلندی تشکیل می‌دهند، اما در تقسیم شدن ناتوانند. در مقابل، جهش یافته‌های wee چون در پروتئینی ناقص هستند که به طور طبیعی مانع تقسیم سلول‌ها هنگامی که خیلی کوچک هستند، می‌شود، سلول‌های کوچکتر از حد معمول تشکیل می‌دهند.



▲ **شکل ۱۱-۲۰: مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسیس پمبه.** (a) بررسی میکروگراف الکترونی سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه در مراحل مختلف چرخه سلول. سلول‌های طویل در حال ورود به میتوز هستند و سلول‌های کوتاه از سیتوکینز عبور کرده‌اند. (b) وقایع اصلی در چرخه سلول. توجه اسکیزوساکارومایسیس پمبه داشته باشید که پوشش هسته‌ای در طول میتوز در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و دیگر مخمرها تخریب نمی‌شود.

ژن‌ها در نوع طبیعی اسکیزوساکارومایسیس پمبه به صورت ایتالیک با علامت مثبت در بالایش (مانند، $cdc2^+$) و ژن‌های دارای جهش نهفته به صورت ایتالیک همراه با علامت منفی در بالایش مشخص می‌شوند (مانند $Cdc2^-$). پروتئینی که با ژنی خاص رمزدهی می‌شود بوسیله سمبل ژن در نوع رومی با یک حرف آغازین بزرگ در نظر گرفته می‌شود (مثل Cdc2).

در این قسمت می‌بینیم چگونه بررسی‌های ژنتیکی و مطالعات ساختاری پروتئین‌های دخیل امکان می‌دهد که مکانیسم‌های پایه کنترل ورود به میتوز مشخص گردند. ابتدا در مورد چگونگی تشخیص ژن‌های تنظیم‌کننده میتوزی در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و اینکه چگونه نشان داده شده که آنها آنالوگ MPF زنوپوس هستند، بحث می‌کنیم. سپس مکانیسم‌های به کار رفته توسط اسکیزوساکارومایسیس پمبه، برای تنظیم فعالیت CDK - سیکلین میتوزی بررسی می‌کنیم. سلول‌های پستانداران CDK - سیکلین میتوزی را به طرز مشابهی تنظیم می‌کنند. در آخر این قسمت را با تحلیلی از ساختار یک CDK انسانی و چگونگی وابستگی فعالیت آن به تغییرات ساختاری القا شده توسط فسفریلاسیون خاتمه می‌دهیم.

اجزای MPF بین یوکاریوت‌های پست و عالی حفاظت شده هستند

جهش‌ها در $cdc2^-$ (یکی از چندین ژن متفاوت cdc در اسکیزوساکارومایسیس پمبه)، بر این اساس که آیا جهش غالب است یا مغلوب فنوتیپ‌های متضادی را تولید می‌کند (شکل ۱۲-۲۰). جهش‌های مغلوب ($cdc2^-$) سلول‌هایی تولید می‌کنند که به طور غیرمعمولی طویل هستند؛ در حالی که جهش‌های غالب ($cdc2^D$) موجب تولید فنوتیپ wee یعنی سلول‌هایی می‌شوند که به طور ناهنجاری کوچک هستند. همان طور که در فصل ۵ ذکر شد، جهش‌های مغلوب عموماً موجب از دست رفتن عملکرد پروتئین نوع طبیعی می‌شوند. در سلول‌های دیپلوئید، برای اینکه فنوتیپ جهش یافته مشاهده گردد، هر دو آلل باید جهش یابند. در مقابل، جهش‌های غالب چه به علت تولید بیش از حد یا نبود تنظیم در اثر کسب عملکرد پروتئین حاصل می‌شوند. در این مورد، حضور تنها یک آلل جهش یافته، فنوتیپ جهش یافته را به سلول‌های دیپلوئید منتقل می‌کند. کشف اینکه نبود فعالیت cdc2 (جهش یافته‌های $cdc2^-$) از ورود به میتوز جلوگیری کرده و کسب فعالیت cdc2 (جهش یافته‌های

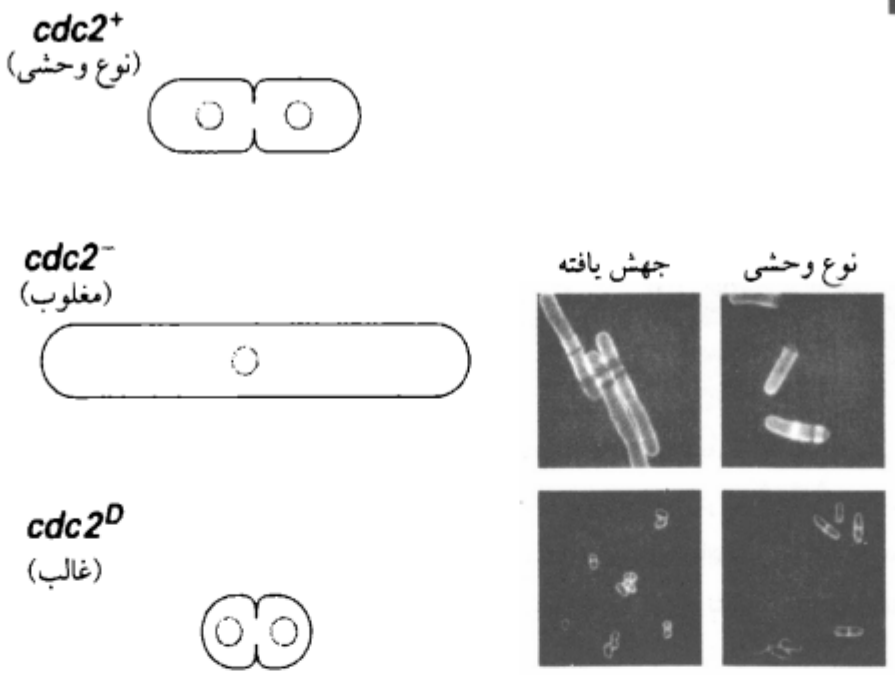
$cdc2^D$) موجب می‌شود تا میتوز زودتر از cdc2 حالت طبیعی انجام گیرد، cdc2 را به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی ورود به میتوز در اسکیزوساکارومایسیس پمبه شناسانده است.

ژن $cdc2^+$ موجود در کتابخانه پلاسمیدی در اسکیزوساکارومایسیس پمبه، شناسایی و توسط توانایی‌اش در تکمیل جهش یافته‌های $cdc2^-$ مکمل جدا شد (شکل ۴-۲۰ را ملاحظه کنید). تعیین توالی نشان داد که $cdc2^+$ یک پروتئین ۳۴ کیلودالتونی را با همولوژی نسبت به پروتئین کینازهای یوکاریوتی رمزدهی می‌کند. محققان در بررسی‌های بعدی کلون‌های cDNA را از دیگر ارگانیسم‌هایی که می‌توانستند مکمل جهش یافته‌های $cdc2^-$ اسکیزوساکارومایسیس پمبه باشند، شناسایی نمودند. آنها cDNA انسانی رمزدهی کننده پروتئین را جدا کردند که با ۶۳ درصد از اسیدهای آمینه cdc2 اسکیزوساکارومایسیس پمبه همسان بود. در زمان این آزمایش این مسئله که یک پروتئین انسانی که نسبت کمی با اسکیزوساکارومایسیس پمبه دارد و قادر به انجام اعمال حیاتی آن است، دانشمندان را به میزان زیادی متحیر ساخت. تکمیل جهش یافته‌های $cdc2^-$ دراسکیزوساکارومایسیس پمبه توسط cdc2 انسانی یک از اولین مدارکی بود که نشان می‌داد پروتئین‌های انجام‌دهنده فرآیندهای سلولی اساسی بین تمام موجودات یوکاریوتی به شدت حفاظت شده‌اند.

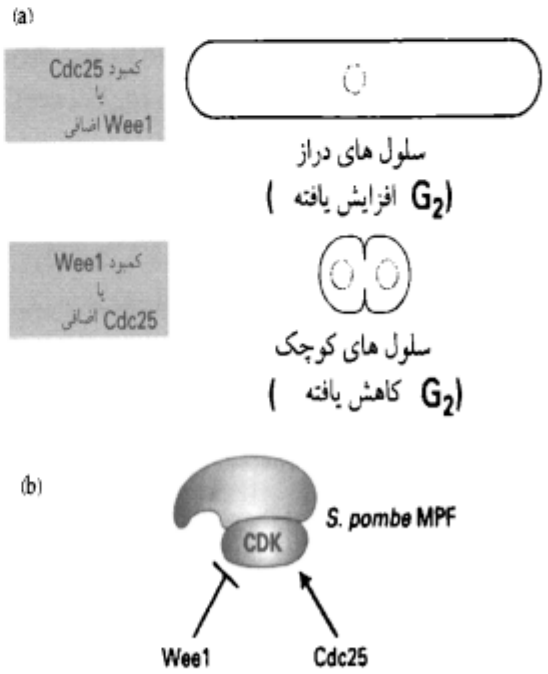
جداسازی و تعیین توالی ژن دیگر cdc در اسکیزوساکارومایسیس پمبه ($cdc13^+$) که آن نیز برای ورود به میتوز لازم است، نشان داد این ژن پروتئینی همولوگ با توتیای دریایی و سیکلین B زنوپوس رمزدهی می‌کند. بررسی‌های بیشتر نشان داد که هترودیمر cdc2 و cdc13، MPF اسکیزوساکارومایسیس پمبه را نشان می‌دهد. این هترودیمر همانند زنوپوس فعالیت پروتئین کینازی داشتند و هیستون H_1 را فسفریله می‌کند. علاوه بر این، فعالیت پروتئین کیناز H_1 به موازات افزایش و کاهش در سطح پروتئین cdc13 هنگامی که سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه وارد میتوز می‌شوند، زیاد و هنگامی که آنها از میتوز خارج می‌شوند کم می‌شود. این یافته‌ها کاملاً مشابه نتایج به دست آمده با عصاره‌های تخم زنوپوس است (شکل a ۹-۲۰ را ملاحظه کنید). cdc13 را به‌عنوان سیکلین میتوزی در اسکیزوساکارومایسیس پمبه شناخته‌اند. بررسی‌های بیشتر نشان‌داد پروتئین cdc2 جدا شده و همولوگ‌هایش در یوکاریوت‌های دیگر تا زمانی که به یک سیکلین متصل باشند، فعالیت پروتئین کینازی اندکی دارند. بنابراین، این خانواده پروتئین کینازها به عنوان کینازهای وابسته به سیکلین یا CDK ها مشهور شدند. محققان به زودی دریافتند که آنتی بادی‌های ایجاد شده علیه یک منطقه به شدت حفاظت شده در cdc2، پلی‌پپتیدی را شناسایی می‌کنند که به همراه MPF خالص شده از تخم‌های زنوپوس، خالص می‌شود. به این ترتیب، MPF زنوپوس نیز از یک CDK (به نام CDK1) به علاوه یک سیکلین میتوزی یعنی سیکلین B تشکیل شده است. این همگرایی یافته‌ها از بررسی‌های بیوشیمیایی در یک بی‌مهره (توتیای دریایی) و یک مهره‌دار (زنوپوس) و از بررسی‌های ژنتیکی در یک مخمر نشان می‌دهد که در تمام یوکاریوت‌ها، ورود به میتوز با کمپلکس‌های سیکلین -CDK میتوزی مشابهی کنترل می‌شود. (شکل ۲-۲۰).

فسفریله شدن زیرواحد CDK فعالیت MPF کیناز را تنظیم می‌کند

همان طور که از بررسی عصاره‌های تخم زنوپوس و مطالعات مقایسه‌ای بیوشیمیایی در اسکیزوساکارومایسیس پمبه دیدیم، یک راه تنظیم فعالیت MPF کنترل پایداری سیلکین‌های میتوزی است. سیکلین‌های میتوزی در اواخر آنافاز ناگهان افت پیدا می‌کنند چون توسط APC/C فعال شده پلی یوبی‌کوئیتینه می‌شوند. یک کمپلکس APC/C مشابهی در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و تمام یوکاریوت‌ها عمل می‌کند. چون یک سیکلین برای داشتن فعالیت کینازی چشمگیر باید به یک CDK متصل باشد، تجزیه سیکلین میتوزی موجب کاهش در فعالیت MPF می‌شود. با وجود این، در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و تمام یوکاریوت‌های دیگر از لایه‌های اضافی تنظیم توسط سلول برای تضمین فعال بودن کمپلکس‌های سیلکین -CDK تنها در زمان مناسب در چرخه سلول، استفاده می‌شود. ابتدا این لایه‌های اضافی کنترلی با مطالعه جهش یافته‌ها در ژن‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه به غیر از ژن‌های $cdc2^+$ (که CDK را در اسکیزوساکارومایسیس پمبه رمزدهی می‌کند) یا $cdc13^+$ (که سیکلین میتوزی اسکیزوساکارومایسیس پمبه را رمزدهی می‌کند) که در دمای غیرمتعادل اندازه سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهند، آشکار شدند. برای نمونه، جهش یافته $cdc25^-$ حساس به دما نمی‌تواند در دمای غیرمتعارف وارد میتوز شود، و سلول‌های طویل شده تولید کند. از سوی دیگر، بیان بیش از حد cdc25 از یک پلاسمید از بین چندین پلاسمید موجود در هر سلول، طول G_2 را کاهش داده و موجب ورود بیش از موقع به میتوز و تولید سلول‌های کوچک (wee) می‌شود (شکل a ۳-۲۰). در مقابل،

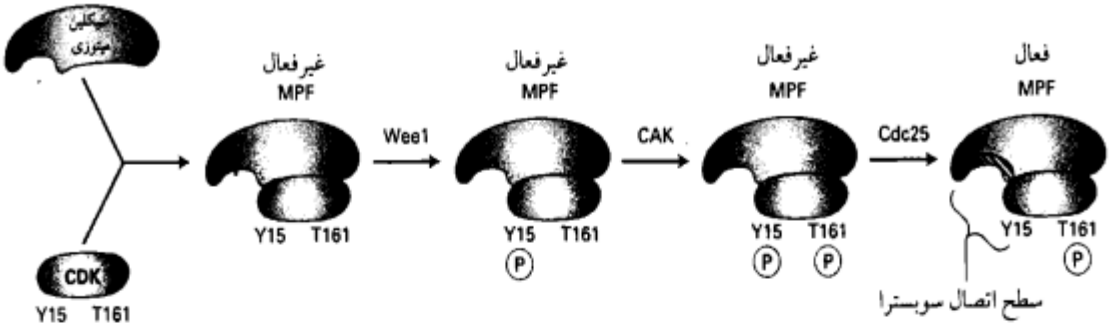


▲ **شکل تجربی ۱۲ـ۲۰: جهش یافته‌های مغلوب و غالب cdc2 در اسکیزوساکارومایسیس پمبه، فنوتیپ‌های متضادی دارند.** نوع وحشی سلول ($cdc2^+$) درست پیش از سیتوکینز با دو سلول دختر به اندازه معمول نشان داده شد. یک جهش یافته مغلوب $cdc2^-$ نمی‌تواند در دمای غیرمتعادل وارد میتوز شود و به صورت یک سلول طویل شده با یک هسته جداگانه که شامل کروموزوم‌های همانندسازی شده است، ظاهر شود. یک جهش یافته مغلوب $cdc2^D$ پیش از رسیدن به اندازه معمول در G_2 وارد میتوز می‌شود؛ بنابراین دو سلول دختر حاصل از سیتوکینز از اندازه معمول کوچکتر هستند (دارای فنوتیپ wee می‌باشند). میکروگراف‌های بالایی در سمت راست، یک جهش یافته cdc2-ts را با سلول‌های wt، ۵ ساعت پس از تغییر به دمای غیرمتعادل مقایسه می‌کند. میکروگراف‌های پایینی با استفاده از یک روش تثبیت سلول جایگزین، یک جهش یافته $cdc2^D$ را نسبت به wt مقایسه می‌کند.



▶ **شکل تجربی ۱۳ـ۲۰: cdc25 و wee1 اثرات متضادی بر فعالیت MPF در اسکیزوساکارومایسیس پمبه دارند.** (a) سلول‌هایی که فعالیت cdc25 و wee1 را دارا نیستند، در اثر جهش‌های حساس به دمای مغلوب در ژن‌های هومولوگ ایجاد شده و فنوتیپ متضاد هم دارند. همچنین، سلول‌هایی که چندین نسخه از پلاسمیدهای حاوی ژن نوع وحشی cdc25 و $wee1^+$ دارند و بنابراین مقدار زیادی پروتئین‌های رمزدهی شده تولید می‌کنند، فنوتیپ‌های متضادی دارند. (b) این فنوتیپ‌ها بر این دلالت دارند که کمپلکس سیکلین -CDK میتوزی توسط cdc25 فعال شده است (←) و توسط wee1 مهار شده است (⊢). برای توضیح بیشتر به متن مراجعه کنید.

جهش‌های از بین‌برنده‌ی عملکرد در ژن $wee1^+$ موجب ورود پیش از موقع به میتوز شده و سلول‌های کوچک تولید می‌کند. در حالی که، تولید بیش از حد پروتئین wee1 طول G_2 را افزایش داده و سلول‌های طویل شده را ایجاد می‌کند. تعبیری منطقی از این یافته‌ها این است که پروتئین cdc25 موجب تحریک فعالیت کینازی MPF در اسکیزوساکارومایسیس پمبه شده، در حالی که پروتئین wee1



▲ **شکل ۱۴-۲۰ تنظیم فعالیت کینازی فاکتور پیش برنده میتوز (MPF) اسکیزوساکارومایسیس پمبه.** میانکنش سیکلین میتوزی (cdc13) با کیناز وابسته به سیکلین (cdc21)، MPF را تشکیل می‌دهند. زیرواحد CDK می‌تواند در دو جایگاه تنظیمی در تیروزین ۱۵ (T15) توسط wee1 و در ترئونین ۱۶۱ (T161) توسط کیناز فعال‌کننده CDK (CAK) فسفریله شود. برداشت فسفات توسط فسفاتاز cdc25 از روی Y_{15}، MPF فعال تولید می‌کند که زیرواحد CDK در آن روی T216 فسفریله و در T15 دفسفریله شده است. شاید زیرواحد سیکلین میتوزی با تشکیل قسمتی از سطح اتصال به سوبسترا (هاشور زده) که شامل اسیدآمینه مهاری Y_{15} نیز هست در ویژگی اتصال به سوبسترا توسط MPF مشارکت می‌کند.

مانع فعالیت MPF می‌گردد (شکل ۱۳b-۲۰). در بررسی‌های بعدی، نوع وحشی ژن‌های $cdc25^+$ و، $wee1^+$ جدا، تعیین توالی و برای تولید پروتئین‌های رمزدهی شده با وکتورهای بیانی مناسب استفاده شدند. توالی‌های حاصله از cdc25 و wee1 و مطالعات بیوشیمی پروتئین‌ها، نشان داد که آنها فعالیت کینازی MPF در اسکیزوساکارومایسیس پمبه را با فسفریله کردن و دفسفریله کردن جایگاه‌های تنظیمی ویژه در زیرواحد CDK از MPF تنظیم می‌کنند.

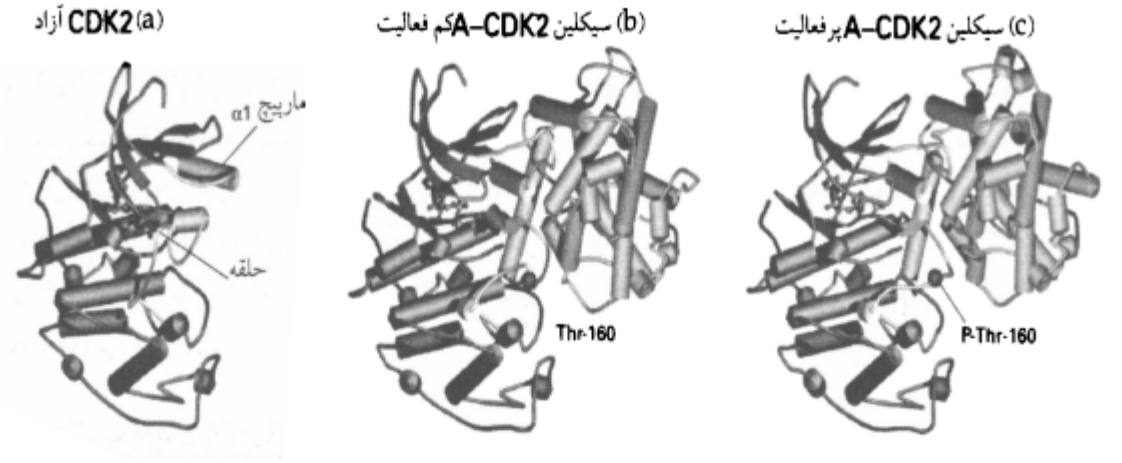
شکل ۱۴-۲۰ اعمال چهار پروتئینی را که فعالیت پروتئین کینازی MPF در اسکیزوساکارومایسیس پمبه را تنظیم می‌کنند، نشان می‌دهد. از این چهار پروتئین اولین پروتئین، سیکلین میتوزی اسکیزوساکارومایسیس پمبه بوده و با CDK تجمع یافته و MPF با فعالیت بسیار پایین را تشکیل می‌دهد. پروتئین دوم پروتئین - تیروزین کیناز wee1 است که در زیرواحد CDK یک اسیدآمینه تیروزین مهاری (Y15) را فسفریله می‌کند. پروتئین سوم یک کیناز دیگری به نام کیناز فعال‌کننده CDK است که (CAK)[1]، یک اسیدآمینه ترئونین فعال‌کننده (T161) را فسفریله می‌کند. وقتی هر دو اسیدآمینه فسفریله شدند، MPF غیرفعال می‌شود. سرانجام، **فسفاتاز** cdc25، فسفات را از Y15 برداشته و MPF به شدت فعال را تولید می‌کند. جهش زایی در جایگاه خاص که Y15 را در CDK از اسکیزوساکارومایسیس پمبه تبدیل به یک فنیل آلانین نمود (که نمی‌تواند فسفریله شود)، جهش یافته‌هایی با فنوتیپ wee تولید کرد که مشابه جهش یافته‌های $wee1^-$ بودند. هر دو جهش یافته‌ها، از فسفریله شدن مهاری در Y15 جلوگیری کرده و درنتیجه نسبت به تنظیم مناسب فعالیت MPF ناتوان بوده و این امر منجر به ورود پیش از موقع به میتوز می‌گردد.

همان طور که در قسمت ۷-۲۰ توضیح داده خواهد شد، سیستم‌های بازرسی نقطه کنترل با تنظیم فعالیت کینازی wee1 مهاری و فسفاتاز cdc25 فعال‌کننده تضمین می‌کنند همانندسازی کامل کروموزوم و اینکه هیچ آسیب تعمیر نشده‌ای در کروموزوم یا DNA پیش از آغاز عمل میتوز وجود نداشته باشد. همولوگ‌های wee1 و cdc25 در یوکاریوت‌های عالی وجود دارد، و سیستم‌های نظارتی نقطه کنترل بسیار مشابهی در سلول‌های انسانی عمل می‌کنند.

تغییرات ساختمان فضایی القاء شده با اتصال سیکلین و فسفریلاسیون فعالیت MPF را افزایش می‌دهد

برخلاف مخمر شکافدار و جوانه‌زن که هر کدام تنها یک CDK تولید می‌کنند، مهره‌داران چندین CDK تولید می‌کنند. (جدول ۱-۲۰ را ملاحظه کنید). ساختار سه بعدی یک کیناز وابسته به سیکلین انسانی (CDK2) شناسایی شده و نگرشی نسبت به اینکه اتصال سیکلین و فسفریله شدن CDK ها چگونه فعالیت پروتئین کینازی آنها را تنظیم می‌کند، فراهم نموده است. با وجود اینکه ساختارهای سه بعدی CDK در اسکیزوساکارومایسیس پمبه و

1- CDK - activating Kinase



▲ **شکل ۱۵ـ۲۰(شکل رنگی): مدل‌های ساختاری CDK2 انسانی که با کیناز وابسته به سیکلین (CDK) در** اسکیزوساکارومایسیس پمبه **همولوگ است.** ـ a) CDK2 آزاد غیرفعال متصل شده به سیکلین A . در CDK2 آزاد، حلقه T مانع دسترسی سوبستراهای پروتئین به فسفات ATP اتصال یافته می‌شود، که به صورت مدل گلوله و میله نشان داده شد ساختارهای مکان‌هایی که با رنگ زرد شده‌اند به هنگام اتصال CDK به سیکلین A تغییر می‌کند. (b) کمپلکس سیکلین A- CDK2 با فعالیت پایین و فسفریله نشده. تغییرات ساختمان فضایی ایجاد شده توسط اتصال دُمینی از سیکلین A (سبز رنگ) موجب می‌شود حلقه T از جایگاه فعال CDK2 کنار رفته، در نتیجه سوبستراهای پروتئینی می‌توانند اتصال یابند. مارپیچ a1 در CDK2 که با سیکلین A بطور وسیعی میانکنش می‌دهد. چندین انگسترم به طرف شکاف کالیزی منتقل شده و زنجیره‌های جانبی کالیزی کلیدی مورد نیاز برای واکنش انتقال فسفر را در موقعیت جدیدی قرار می‌دهد. گوی قرمز رنگ موقعیت معادل با ترئونین ۱۶۱ را در اسکیزوساکارومایسیس پمبه نشان می‌دهد. (c) کمپلکس سیکلین CDK2-A فسفریله شده با فعالیت بالا، تغییرات ساختمان فضایی القاء شده در اثر فسفریله شدن ترئونین فعال‌کننده (گوی قرمزرنگ)، شکل سطح اتصال سوبسترا را تغییرداده و تمایل به سوبستراهای پروتئینی را به شدت افزایش می‌دهد.

اغلب CDK های دیگر مشخص نشده، همولوژی زیاد توالی آن‌ها با CDK های انسانی حاکی از این است که تمام CDK ها ساختاری مشابه داشته و با یک مکانیسم مشابه تنظیم می‌شوند.

CDK های غیرفعال و فسفریله نشده حاوی ناحیه‌ای انعطاف‌پذیر به نام **حلقه T**[1] هستند که از دسترسی سوبستراهای پروتئینی به جایگاه فعالی که در آنجا ATP متصل است، جلوگیری می‌کند (شکل a ۱۵ـ۲۰). ممانعت فضایی توسط حلقه T به خوبی توضیح می‌دهد که چرا CDK2 آزاد، متصل نشده به سیکلین، واکنش پروتئین کینازی اندکی دارد. CDK2 فسفریله نشده متصل به یکی از جفت‌های سیکلین‌اش فعالیت پروتئین کینازی اندک اما قابل تشخیصی در آزمایشگاه دارد، با وجود اینکه ممکن است در داخل بدن غیرفعال باشد. میانکنش‌های فراوان بین سیکلین و حلقه T تغییر شگرفی در موقعیت حلقه T ایجاد کرده، بنابراین CDK2 در معرض جایگاه فعال قرار می‌گیرد (شکل b۱۵ـ۲۰). اتصال سیکلین موقعیت مارپیچ α_1 را نیز در CDK تغییر داده و سطح اتصال به سوبسترای آن را تغییر می‌دهد. فعالیت بالای کمپلکس سیکلین -CDK نیازمند فسفریله شدن ترئونین فعال‌کننده جای گرفته در حلقه T بوده و موجب تغییرات ساختاری دیگری در کمپلکس سیکلین -CKD شده و تمایل آن را به سوبستراهای پروتئینی به شدت افزایش می‌دهد (شکل c ۱۵ـ۲۰). در نتیجه، فعالیت کیناز کمپلکس فسفریله شده صد برابر بیشتر از کمپلکس فسفریله نشده است.

اسیدآمینه تیروزین مهاری (Y۱۵) در CDK **اسکیزوساکارومایسیس پمبه** در ناحیه‌ای از پروتئین است که به فسفات‌های ATP متصل می‌شود. پروتئین‌های CDK مهره‌داران شامل یک اسیدآمینه مهاری دیگر (ترئونین ۱۴ - T۱۴) که در همان ناحیه در پروتئین قرار دارد، می‌باشد. فسفریله شدن Y15 و T14 در این پروتئین‌ها به علت دفع الکتروستاتیک بین فسفات‌های متصل به پر وتئین و فسفات‌های ATP از اتصال ATP ممانعت می‌کند. بنابراین، این فسفریله شدن‌ها حتی هنگامی که پروتئین CDK به یک سیکلین متصل شده و اسیدآمینه فعال‌کنندهٔ فسفریله شده باشد، از فعالیت پروتئین کینازی جلوگیری می‌کند. تا اینجا دو مکانیسم

1- T - loop

برای کنترل فعالیت سیکلین -CDK ذکر شده است: (۱)، تنظیم تجمع سیکلین‌های میتوزی همان طورکه در شکل ۱۰ـ۲۰ مطرح شد و (۲) تنظیم فعالیت کینازی MPF همانطور که در شکل ۱۴ـ۲۰ دیده می‌شود. در قسمت ۵-۲۰ خواهیم دید که فعالیت‌های پروتئین کینازی کمپلکس‌های سیکلین -CDK نیز می‌توانند توسط پروتئین‌های مهاری CDK تنظیم شود. کمپلکس‌های این پروتئین مهاری CDK به CDK یا کمپلکس‌های سیکلین - CDK متصل شده و توانایی آنها را برای میانکنش با سوبستراها بلوکه می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۳-۲۰

تنظیم کیناز وابسته به سیکلین طی میتوز

■ در مخمر شکافدار اسکیزوساکارومایسیس پمبه ژن $cdc2^+$ یک پروتئین کیناز وابسته به سیکلین را رمزدهی می‌کند (CDK) که با یک سیکلین میتوزی رمزدهی شده با ژن $cdc13^+$ مجتمع می‌شود. هترودیمر سیکلین - CDK میتوزی حاصل معادل MPF در زنوپوس است. جهش یافته‌هایی که فاقد سیکلین میتوزی یا CDK هستند از ورود به میتوز و در نتیجه تشکیل سلول‌های طویل ناتوانند.

■ فعالیت پروتئین کینازی کمپلکس سیکلین - CDK میتوزی (MPF) به حالت فسفریلاسیون دو اسیدآمینه در زیرواحد کاتالیزی CDK وابسته است (شکل ۱۴ـ۲۰ را ملاحظه کنید). فعالیت هنگامی بیشترین است که ترئونین ۱۶۱ فسفریله می‌شود و با فسفریله شدن کاتالیز شده با wee1 تیروزیون ۱۵ که در اتصال صحیح ATP مداخله می‌کند، مهار می‌گردد. این فسفات بازدارنده توسط پروتئین فسفاتاز cdc25 برداشته می‌شود.

■ کمپلکس سیلکین - CDK2 انسانی شبیه به MPF حاصل از زنوپوس و اسکیزوساکارومایسیس پمبه است. مطالعات ساختاری با پروتئین‌های انسانی نشان می‌دهند که اتصال سیکلین به CDK2 و فسفریله شدن ترئونین فعال‌کننده (معادل ترئونین ۱۶۱ در CDK از اسکیزوساکارومایسیس پمبه) موجب تغییرات ساختمان فضایی می‌شود که جایگاه فعال را در معرض قرار داده و سطح اتصال به سوبسترا را طوری تغییر می‌دهد که فعالیت بالا و تمایل بالایی برای سوبستراهای پروتئینی داشته باشد. (شکل ۱۵ـ۲۰ را ملاحظه کنید).

۴-۲۰ مکانیسم‌های مولکولی برای تنظیم وقایع میتوزی

در قسمت‌های قبلی دیدیم که افزایشی تنظیم شده در فعالیت MPF موجب ورود به میتوز می‌گردد. احتمالاً ورود به میتوز نتیجه فسفریله شدن پروتئین‌های ویژه توسط فعالیت پروتئین کینازی MPF است. با وجود این، تا به حال اغلب پروتئین‌های فسفریله شده توسط MPF مشخص نشده‌اند، بنابراین MPF دقیقاً چگونه موجب ورود به میتوز می‌شود به خوبی مشخص نشده است. با وجود این بسیاری از ترکیبات MPF که اخیراً شناسایی شدند، در دست مطالعه هستند. بررسی تعداد اندکی از ترکیبات، نمونه‌هایی را فراهم نموده که نشان می‌دهد چگونه فسفریله شدن توسط MPF بسیاری از وقایع اوایل میتوز همچون تجمع کروموزوم، تشکیل دوک میتوزی و تخریب پوشش هسته‌ای را میانجی‌گری می‌کند (شکل ۳۴ـ۱۸ را ملاحظه کنید).

به یاد داشته باشید که کاهش در سیکلین‌های میتوزی و غیرفعال‌سازی MPF همراه با آن، با مراحل بعدی میتوز در یک زمان اتفاق می‌افتد (شکل a ۹ـ۲۰ را مشاهده کنید). درست قبل از این مرحله، یعنی در اوایل آنافاز، کروماتیدهای خواهری جدا شده و به سوی قطب‌های مخالف دوک حرکت می‌کنند. در طی تلوفاز، دینامیک میکروتوبول به شرایط اینترفاز برگشته، کروموزوم‌ها تراکم خود را از دست داده، پوشش هسته‌ای دوباره شکل می‌گیرد، کمپلکس گلژی بازآرایی شده و سیتوکینز انجام می‌شود. برخی از این فرآیندها با دفسفریلاسیون و بقیه با تجزیه پروتئین شروع می‌شوند.

در این قسمت، مکانیسم‌های مولکولی و پروتئین‌های ویژه مرتبط با برخی از وقایعی که اوایل و اواخر میتوز را متمایز می‌کند، ذکر می‌کنیم. این مکانیسم‌ها نشان می‌دهند چگونه ترکیبات سیکلین -CDK به همراه یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگازها عبور از فاز میتوز را در چرخه سلول کنترل می‌کنند.

فسفریلاسیون لامین‌های هسته‌ای و دیگر پروتئین‌ها وقایع اوایل میتوز را پیش می‌برد

پوشش هسته‌ای، گستره‌ای دو غشایی از شبکه آندوپلاسمی بوده و مقدار زیادی کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای دارد. (شکل ۱ـ۹ و شکل ۳۲ـ۱۳ را ملاحظه کنید). دو لایه لیپید غشای داخلی هسته‌ای توسط لامین‌های هسته‌ای پشتیبانی می‌شود، لامین‌های هسته‌ای شبکه‌ای از رشته‌های لامین بوده و در کنار سطح داخلی پوشش هسته‌ای قرار دارد (شکل a ۱۶ـ۲۰). سه لامین هسته‌ای (A، B و C) در سلول‌های مهره‌داران وجود داشته و به دسته‌ای از

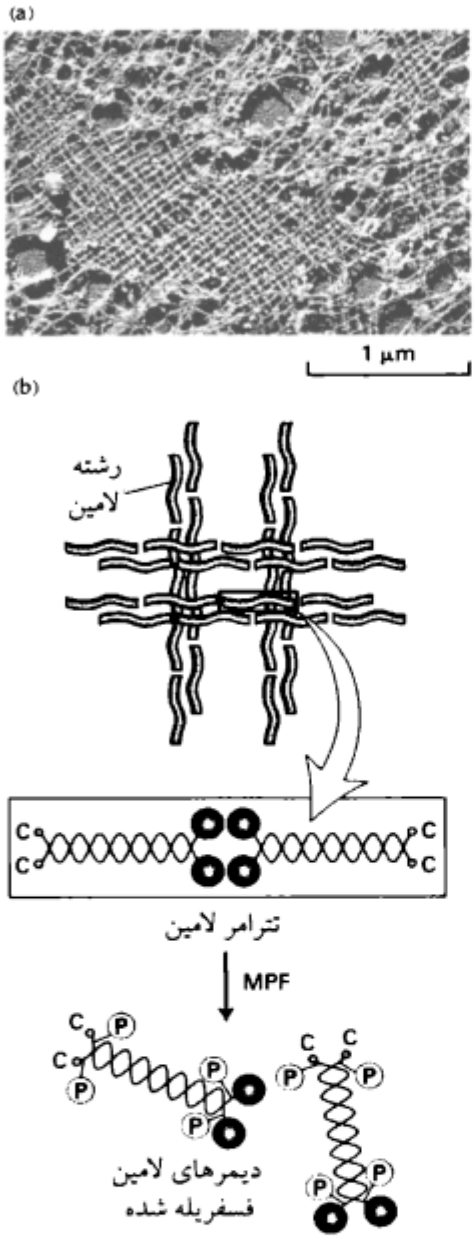
پروتئین‌های اسکلت سلولی (رشته‌های بینابینی یا حد واسط) متعلق هستند که برای حفاظت غشاءهای سلولی لازم‌اند. (فصل ۱۸).

لامین‌های C و A که به وسیله یک واحد رونویسی رمزدهی شده و با پیرایش متناوب یک mRNA اولیه تولید می‌شوند. (هر دو لامین A و C با هم یکسان هستند به جز اینکه لامین A ۱۳۳ اسیدآمینه در انتهای C دارد که لامین C ندارد). لامین B توسط یک واحد رونویسی متفاوت رمزدهی شده و با افزودن یک گروه ایزوپرنیل آبگریز نزدیک به انتهای کربوکسیل‌اش به طور پس‌ترجمه‌ای تغییر می‌یابد. این اسید چرب در درون غشای هسته‌ای داخلی قرار گرفته و بنابراین باعث اتصال لامین هسته‌ای به غشاء می‌شود (شکل ۱۹ـ۱۰ را ملاحظه کنید).

هر سه لامین هسته‌ای دیمرهای حاوی قسمت مرکزی با مارپیچ آلفای کویل کویل میله مانند و سر گلبولار و دمین‌های دم می‌باشد. پلیمریزاسیون این دیمرها به صورت تجمعات سر به سر و دم به دم، رشته‌های بینابینی را می‌سازد که لامین‌های هسته‌ای را می‌سازد (شکل ۴۵-۱۸ را ملاحظه کنید).

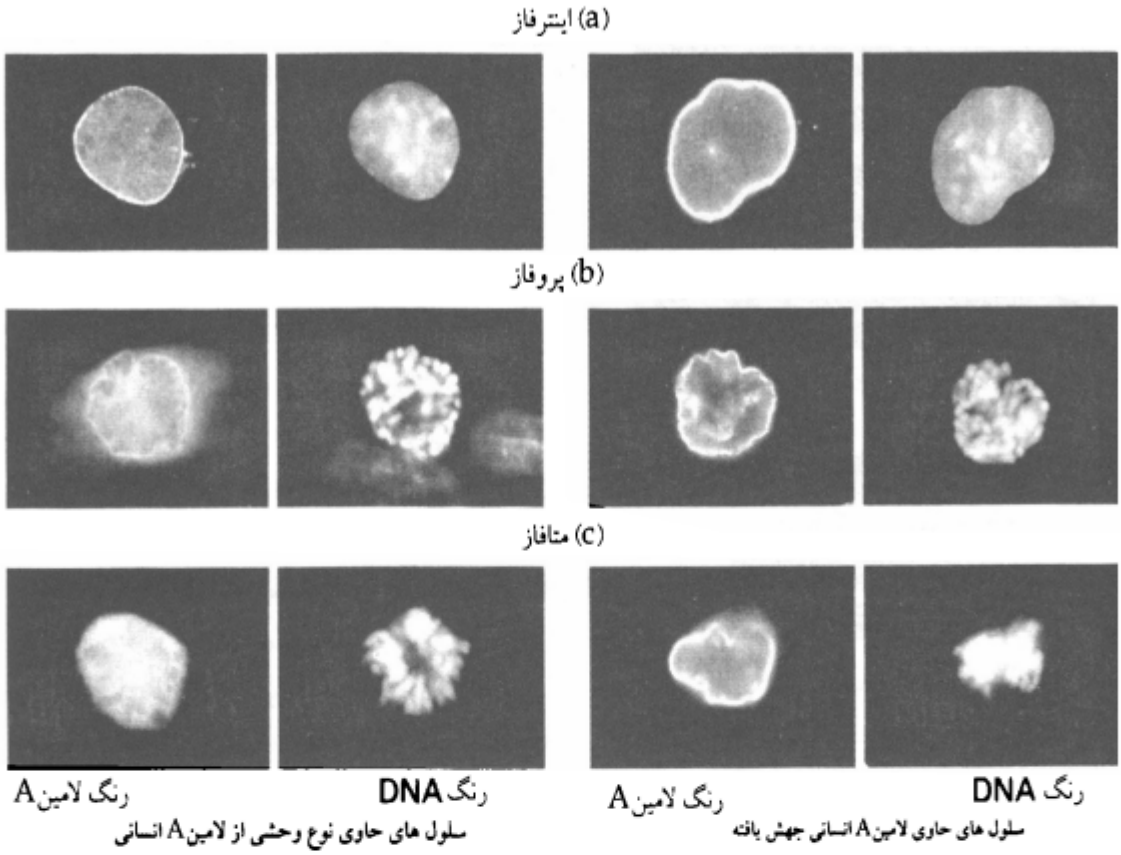
وقتی MPF در انتهای G_2 طی وقایعی که در قسمت آخر شرح داده شده فعال می‌گردد، MPF، اسیدآمینه سرین ویژه‌ای را در هر سه لامین هسته‌ای فسفریله می‌کند. این امر منجر به دپلیمریزاسیون رشته‌های بینابینی لامین می‌شود (شکل ۱۶b-۲۰). دیمرهای لامین A و C فسفریله به محیط آزاد می‌شود اما دیمر لامین B به دلیل اتصال از طریق ایزوپرنیل به همراه غشاء هسته‌ای باقی می‌ماند. دپلیمریزاسیون لامین‌های هسته‌ای منجر به از هم پاشیدگی شبکه لامین هسته‌ای شده و این خود باعث خرد شدن پوشش هسته‌ای می‌شود. ازمایش خلاصه شده در شکل ۱۷-۲۰ نشان می‌دهد، خرد شدن پوشش هسته‌ای که به طور معمول در مراحل اولیه میتوز رخ می‌دهد، به فسفریلاسیون لامین A بستگی دارد.

جهش‌های غالب خودبخودی در ژن لامین (LMNA)A/C به طور غیرعادی موجب ایجاد سندرم کمیاب هاچینسون - گایلفورد پروجریا[1] می‌گردد. بیمارانی که یکی از این لامین‌های C و A جهش یافته را بیان می‌کند، با سرعت زیادی پیر می‌شوند. جهش‌های دیگر در LMNA موجب بیماری‌های ماهیچه‌ای، عملکرد ناهنجار سلول چربی و بیماری‌های سلول عصبی محیطی می‌شود. در حالی که مکانیسم‌های مولکولی عامل این علائم هنوز شناخته نشده‌اند، مشاهده اینکه



▲ **شکل ۱۶ـ۲۰ (شکل رنگی) لامینای هسته‌ای و دپلیمریزاسیون آن.** (a) میکروگراف الکترونی لامین هسته‌ای از اووسیت زنوپوس. به شبکه منظم توری مانند رشته‌های بینابینی لامین توجه کنید. این ساختار کنار غشاء داخلی هسته قرار می‌گیرد (شکل ۴۴ـ۱۸ را ملاحظه کنید). (b) نمای شماتیک از ساختار لامین‌های هسته‌ای. دو سری عمودی از رشته‌هایی با قطر ۱۰ نانومتر ساخته شده از لامین‌های A و B و C، لامینای هسته‌ای را تشکیل می‌دهند (بالا). رشته‌های لامین به وسیله پلیمریزاسیون انتها به انتهای تترامرهای لامین ساخته می‌شوند (تترامرهای لامین، از دو دیمر کویل کویل لامین تشکیل شده‌اند) (وسط). حلقه‌های قرمز و سبز به ترتیب دُمین‌های انتهای N و انتهای C گلبولار را نشان می‌دهند. فسفریله شدن سرین ویژه در انتهاهای قسمت مرکزی میله مانند دیمرهای لامین، باعث دپلیمریزاسیون تترامترها می‌شود (پایین). در نتیجه لامین هسته‌ای فرو می‌پاشد.

1- Hutchinson - Guilford progeria



▲ **شکل تجربی ۱۷ـ۲۰ فسفریلاسیون لامین A انسانی موجب دپلیمریزه شدن لامین می‌گردد.** جهش هدفدار در یک جایگاه برای تهیه یک ژن جهش یافته لامین A انسانی استفاده شد تا پروتئینی رمزدهی کند که در آن آلانین‌ها جایگزین سرین‌هایی می‌شوند که به طور معمول در نوع وحشی لامین A فسفریله می‌شوند (شکل b ۱۶ـ۲۰ را ملاحظه کنید). در نتیجه لامین A جهش یافته نمی‌تواند فسفریله شود. وکتورهای حاوی ژن نوع وحشی یا جهش یافته به طور جداگانه به سلول‌های کشت داده شده هامستر منتقل شدند. از آنجا که ژن‌های لامین منتقل شده بسیار زیادتر از ژن لامین هامستر بیان می‌شوند بیشتر لامین A تولید شده در این سلول‌ها، لامین A انسانی است. از این سلول‌های حاوی وکتور در مراحل مختلف در چرخه سلول نمونه برداری شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه لامین A انسانی و نشاندار با مواد فلورسانت و با یک رنگ فلورسنت که به DNA متصل می‌شود، رنگ‌آمیزی شدند. باند رنگی روشن فلورسانس در اطراف محیط هسته در سلول‌های اینترفاز رنگ‌آمیزی شده برای لامین A انسانی، لامین A پلیمریزه شده (فسفریله نشده) را نشان می‌دهد. (a) در سلول‌های بیان‌کننده لامین A انسانی نوع وحشی، لامین پراکنده در کل سیتوپلاسم در پروفاز و متافاز رنگ‌آمیزی می‌شود. (b) و (c) و نبود باند محیطی روشن در متافاز (c) دپلیمریزه شدن لامین A را نشان می‌دهد. در مقابل، دپلیمریزه شدن لامین به مقدار کم در سلول‌های بیان‌کننده ژن جهش یافته لامین A رخ می‌دهد. رنگ‌آمیزی DNA نشان داد که کروموزم‌ها در مرحله متافاز در سلول‌های بیان‌کننده لامین نوع وحشی یا جهش یافته کاملاً متراکم می‌شوند.

جهش‌های متفاوت در ژن LMNA سندرم‌های جداگانه‌ای را تولید می‌کند، بیان می‌دارد که لامین C و A عملکردهای متفاوت بسیاری در سلول‌های طبیعی دارند. اگر این گفته صحت داشته باشد، جهش‌هایی که بر یکی از این عملکردها تأثیر دارند، گروه متمایزی از علایمی که سندرم‌های متفاوت مرتبط با جهش‌های لامین A/C را ایجاد می‌کنند، تشکیل می‌دهند.

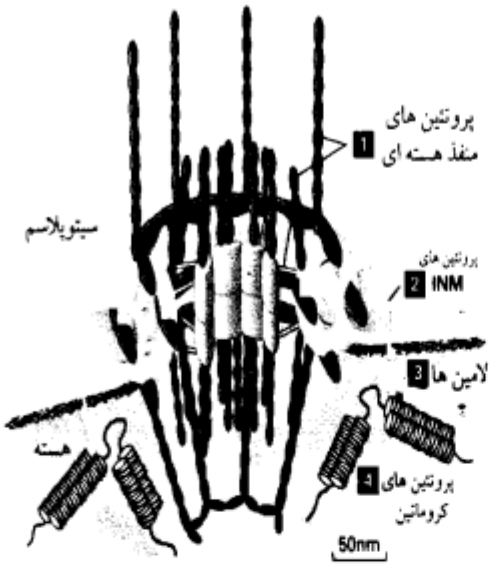
فسفریلاسیون کاتالیز شده با MPF، نوکلئوپورین‌های ویژه شکل (۱)-۱۸ـ۲۰، ❶) باعث شکسته شدن کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای در طی پروفاز به زیر کمپلکس‌های می‌شود. عقیده بر این است که فسفریلاسیون پروتئین‌های اینتگرال غشاء در غشای داخلی هسته (شکل ۱۸ـ۲۰، ❷) تمایل آنها را به کروماتین کاهش می‌دهد و بیشتر موجب تخریب پوشش هسته‌ای می‌گردد. تضعیف روابط بین پروتئین‌های غشای هسته‌ای داخلی و لامینای هسته‌ای (شکل ۱۸ـ۲۰، ❸) و کروماتین (شکل ۱۸ـ۲۰، ❹) امکان می‌دهد صفحه‌های غشای داخلی هسته به داخل شبکه آندوپلاسمی که در امتداد غشای خارجی هسته است، جمع گردند.

شواهد زیادی نشان می‌دهند که فسفریلاسیون کاتالیز شده با MPF در متراکم شدن کروموزوم و تشکیل دستگاه دوک میتوزی نیز نقش دارند. به عنوان مثال، آزمایشات ژنتیکی در مخمر جوانه‌زن اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه خانواده‌ای از پروتئین‌های

کروموزومی حفاظت ساختاری[1] یا **پروتئین‌های** SMC را شناسایی کردند که برای تفکیک طبیعی کروموزوم لازم است. این پروتئین‌های طویل (۱۲۰۰ = اسید آمینه) حاوی دُمین‌های ATP آزی در انتهاهای N و C خود و نواحی طویلی که در ساختارهای کویل کویل مشارکت می‌کنند، هستند. (شکل a ۶ـ۳۸ را ملاحظه کنید). مطالعات رسوب‌دهی با ایمونوگلوبولین‌ها مؤید آنتی‌بادی‌های ویژه برای پروتئین‌های زنوپوس SMC نشان داد در عصاره‌های تخم برخی پروتئین‌های SMC، جزئی از کمپلکس چند پروتئینی به نام **کاندنسین**[2] هستند که به هنگام ورود سلول‌ها به میتوز فسفریله می‌شوند. وقتی آنتی بادی‌های ضد SMC برای حذف کاندنسین از عصاره تخم به کار گرفته شدند، عصاره توانایی‌اش را برای متراکم نمودن کروماتین اسپرم اضافه شده در بعد از فاز اول از بین رفتن تراکم شدن کروموزوم‌ها، از دست داد.

آزمایشات دیگر در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که کاندنسین فسفریله شده خالص شده به DNA متصل می‌شود و آن را به صورت ابر مارپیچ می‌پیچاند (شکل ۸ـ۴ را ملاحظه کنید). در حالی که کاندنسین فسفریله نشده این طور عمل نمی‌کند. این نتایج و مشاهده اینکه یک زیرواحد کاندنسین توسط MPF در شرایط آزمایشگاهی فسفریله می‌شود، منجر به ارایه مدلی شده که در آن کمپلکس‌های کاندنسین توسط فسفریلاسیون کاتالیز شده با MPF فعال می‌شوند. وقتی کمپلکس کاندنسین فعال شد، احتمالاً در فواصلی در طول کروموزوم به DNA متصل و لوپ‌های کوچکتر پشت سر همی را تشکیل می‌دهد که منجر به متراکم شدن کروموزوم می‌گردد (شکل c ۶ـ۳۸ را ملاحظه کنید).

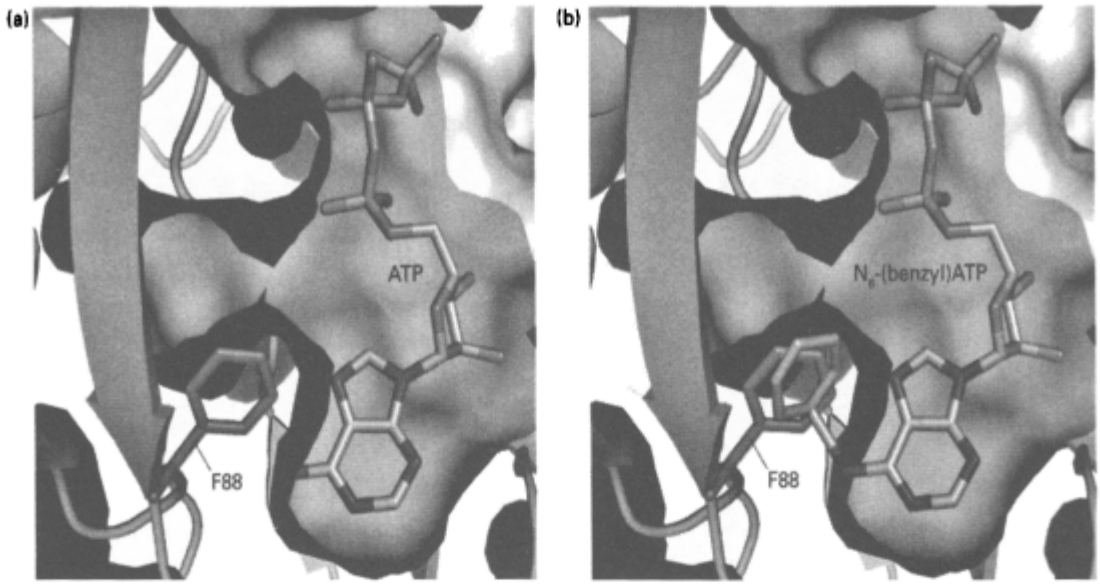
احتمالاً فسفریلاسیون پروتئین‌های مجتمع با میکروتوبول‌ها توسط MPF برای تغیرات عظیم در دینامیک میکروتوبول که منجر به تشکیل دوک میتوزی و آستر[3] می‌گردد، لازم است (فصل ۱۸). علاوه بر این، فسفریلاسیون پروتئین‌های مجتمع با شبکه آندوپلاسمی (ER) و کمپلکس گلژی، توسط MPF یا پروتئین کینازهای دیگر فعال شده بوسیله فسفریلاسیون کاتالیز شده با MPF ، آمد و شد وزیکول‌ها را بین ER و کمپلکس گلژی در طی پروفاز به سمت ER مساعد می‌سازد. در نتیجه غشاهای کمپلکس گلژی به ER منتقل شده و آمد و شد وزیکولی از ER و از طریق گلژی به سطح سلول (فصل ۱۴) که در سلول‌های اینترفازی دیده می‌شود، طی میتوز رخ نمی‌دهد. بسیاری از سوبستراهای MPF با مهندسی CDK جهش یافته‌ای که قادر به استفاده از آنالوگ ATP است (که به کینازهای دیگر متصل نمی‌شود)، در اسکیزوساکارومایسس سرویزیه



▲ **شکل ۱۸ـ۲۰ پروتئین‌های پوشش هسته‌ای توسط MPF فسفریله می‌شوند.** ❶ اجزای کمپلکس منفذ هسته‌ای (NPC) توسط MPF در پروفاز فسفریله شده و موجب خرد شدن NPC ها به زیر کمپلکس‌های محلول و همراه با غشاء می‌شوند. ❷ فسفریلاسیون MPF پروتئین‌های غشای داخلی هسته (INM) از میانکنش آنها با لامینای هسته‌ای و کروماتین جلوگیری می‌کند. ❸ فسفریلاسیون MPF لامین‌های هسته‌ای موجب دپلیمریزه شدن آنها و فروپاشی لامینای هسته‌ای می‌گردد. ❹ فسفریلاسیون MPF پروتئین‌های کروماتین، متراکم شدن کروماتین را القاء کرده و میانکنش بین کروماتین و پوشش هسته‌ای را مهار می‌کند.

شناسایی شده‌اند (شکل ۱۹ـ۲۰). این آنالوگ ATP یک گروه بنزیل حجیم متصل به N_6 آدنین دارد. این گروه بنزیل آنالوگ ATP را به قدری بزرگ می‌کند که نمی‌تواند در پاکت اتصال ATP در پروتئین کینازهای نوع وحشی قرار گیرد. با وجود این، محفظه اتصال ATP CDK جهش یافته، برای اسکان این آنالوگ ATP بزرگ تغییر داده شد. بنابراین، فقط CDK جهش یافته قادر است از این آنالوگ ATP به عنوان سوبسترا در انتقال فسفات γ آن به یک زنجیر جانبی پروتئین استفاده کند. وقتی آنالوگ $ATP-N_6$ بنزیل با یک فسفات γ نشاندار در عصاره‌های سلول مخمر و MPF مخمری نوترکیب حاوی CDK جهش یافته قرار گرفت، چندین پروتئین نشاندار

1- Structural maintenance of chromosome proteins
2- Condensin 3- Aster



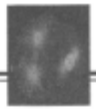
▲ **شکل ۱۹ـ۲۰ (شکل رنگی): جهش یافته ATP CDK وابسته به آنالوگ ATP.** (a) تصویر جایگاه اتصال ATP و کاتالیز در CDK نوع وحشی از اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه (cdc28). ATP متصل شده و زنجیر جانبی فنیل آلانین (صورتی رنگ) در مجاورت پاکت اتصال نشان داده شده است. (b) آنالوگ‌های حجیم ATP همچون آنهایی که حاوی یک دسته بنزیل متصل به N_6 نیتروژن‌آمینو هستند برای قرار گرفتن در محفظه اتصال ATP پروتئین کینازهای نوع طبیعی بسیار بزرگ بوده و به این ترتیب نمی‌توانند توسط آنها استفاده شود. در جهش یافته CDK از اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه فنیل آلانین در موقعیت ۸۸ تبدیل به گلیسین می‌شود که زنجیر جانبی بزرگ ندارد. جهش یافته با استفاده از ATP (بنزیل) N_6 فعالیت پروتئین کینازی بالایی از خود نشان می‌دهد. این مدل‌های CDK از اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه براساس ساختارهای کریستالی از دمین کیناز PKA بوده و همولوژی قرابت زیادی با دُمین کیناز CDK از اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه دارند.

شدند. سوبستراهای حقیقی MPF مخمر در درون موجود زنده می‌تواند میان این سوبستراهای بالقوه با تیمار سلول‌های بیان‌کننده CDK جهش یافته به جای پروتئین نوع وحشی با مشتق دیگری از آنالوگ ATP که پروتئین کینازها را مهار می‌کند، شناسایی شوند. این مشتق مهارکننده کیناز نیز حاوی یک گروه حجیم در موقعیت N_6 آدنین است به طوری که می‌تواند فقط به CDK جهش یافته متصل شده و آن را مهار کند. این ترکیب از لحاظ فضایی نمی‌تواند به کینازهای دیگر متصل شود پس در نتیجه فقط CDK جهش یافته مهندسی شده را در این سلول‌ها مهار می‌کند. تیمار سلول‌ها با این مهارکننده CDK جهش یافته اختصاصی باعث دفسفریلاسیون اغلب هدف‌های MPF فرضی شد که در ابتدا شناسایی شده بودند. این امر نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها هم در بدن موجود زنده و هم در آزمایشگاه بوسیله CDK فسفریله می‌شوند. این روش اغلب سوبستراهای شناخته شده CDK به علاوه بیش از ۱۵۰ پروتئین مخمری دیگری را شناسایی کرد. این پروتئین‌ها از لحاظ عملکرد در چرخه سلولی بررسی شده‌اند.

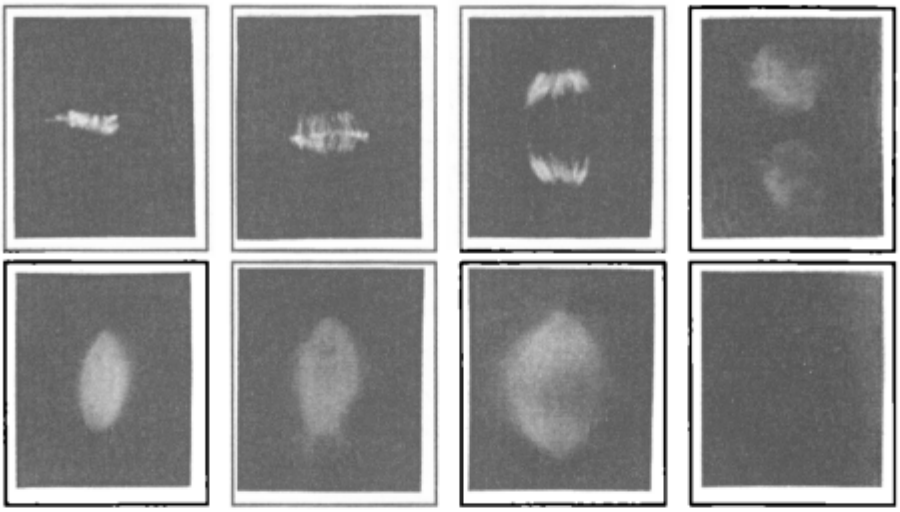
عدم اتصال کروماتیدهای خواهر منجر به شروع آنافاز می‌گردد

پیش از این دیدیم که در اواخر آنافاز، پلی یوبی‌کوئیتینه شدن سیکلین‌های میتوزی توسط کمپلکس پیش برنده آنافاز (APC/C) منجر به تخریب پروتئوزومی این سیکلین می‌گردد (شکل ۱۰ـ۲۰ را ملاحظه کنید.) آزمایشات دیگر با عصاره‌های تخم زنوپوس شاهدی بر این شد که تجزیه سیکلین B (سیکلین میتوزی زنوپوس) و در نتیجه کاهش در فعالیت MPF، برای از دست رفتن تراکم کروموزوم‌ها لازم است اما برای جدا شدن آنها، ضروری نیست. (شکل ۲۰ـ۲۰ a,b)

محققان برای تشخیص اینکه آیا تجزیه وابسته به یوبی کوئیتین، پروتئین دیگری برای جدا شدن کروموزوم لازم است یا خیر، یک پپتید حاوی توالی جعبه تخریب سیکلین و جایگاه پلی یوبی‌کوئیتینه شدن تهیه نمودند. وقتی این پپتید به مخلوطی حاوی عصاره تخم تیمار نشده و هسته‌های اسپرم افزوده شد، کروموزوم‌ها تراکم خود را از دست دادند و جالب اینکه حرکت کروموزوم‌ها به سمت قطب‌های دوک در غلظت پپتیدی ۲۰ـ۴۰ $\mu g/ml$ به شدت به تاخیر



(a) عصاره تیمارشده باRNase + نوع وحشی mRNA رمز دهی کننده سیکلین B



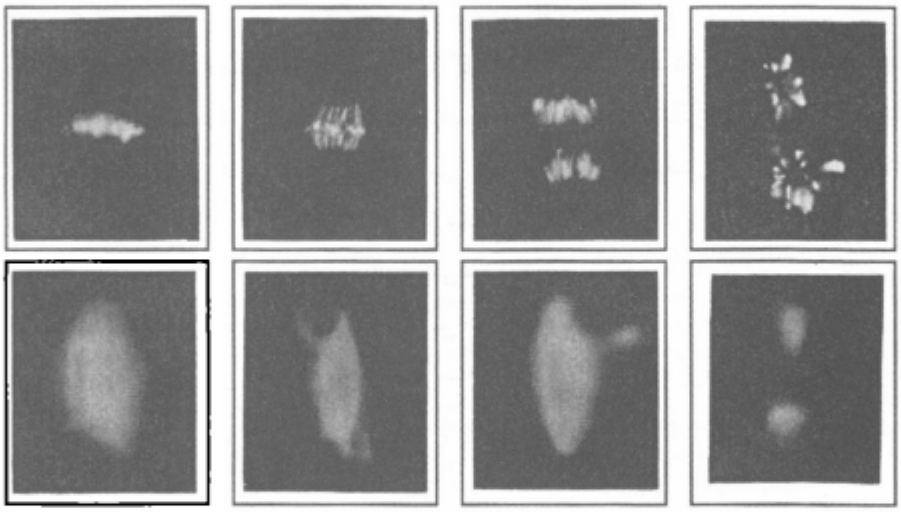
DNA

توبولین

0 10 15 40

زمان (دقیقه)

(b) عصاره تیمارشده با RNase + mRNA جهش یافته رمز دهی کننده سیکلین B غیرقابل تجزیه



DNA

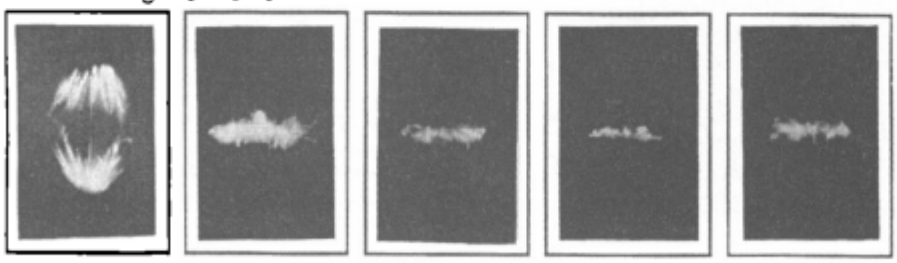
توبولین

0 10 15 80

زمان (دقیقه)

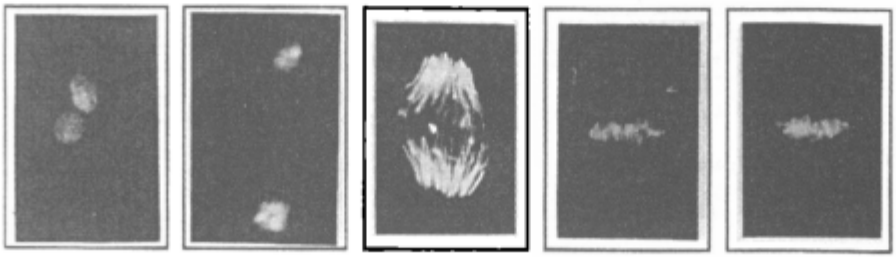
(c) عصاره تیمارنشده + پپتید جعبه تخریبی سیکلین B

۱۵ دقیقه زمان واکنش



DNA

۳۵ دقیقه زمان واکنش



DNA

غلظت پپتید اضافه شده (μg/ml)

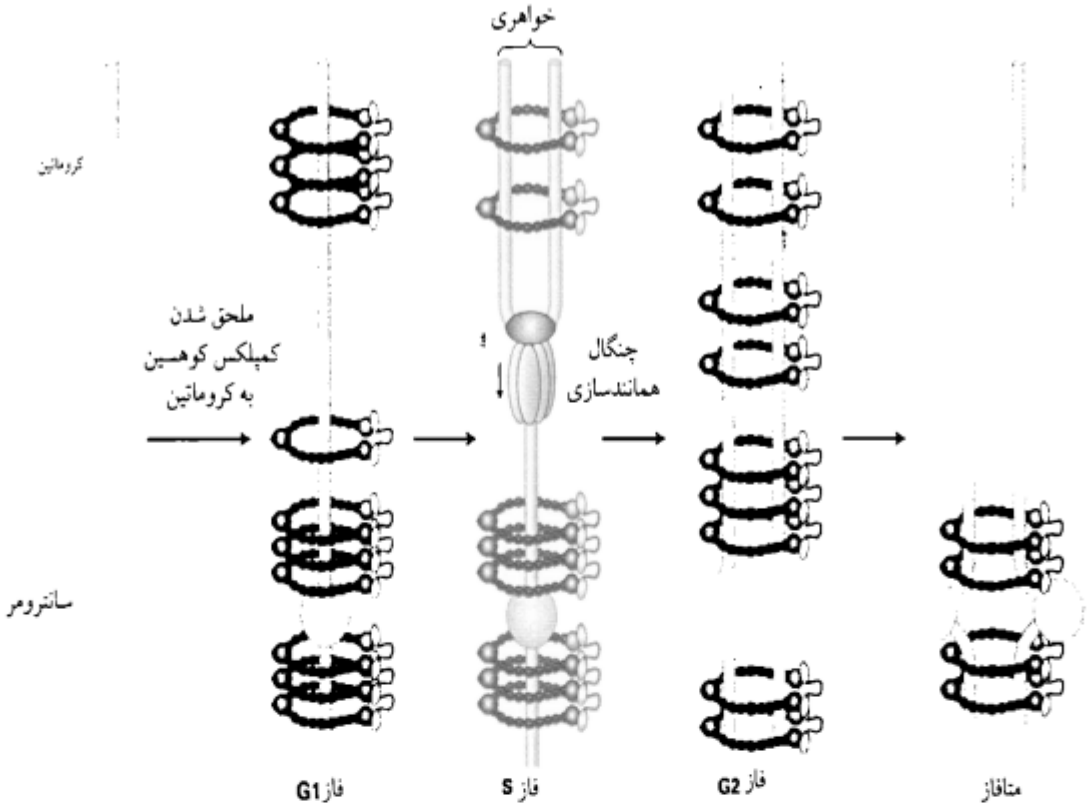
0 20 40 60 80

◀شکل تجربی ۲۰ـ۲۰ شروع مرحله آنافاز به پلی یوبی کوئیتینه شدن پروتئین‌ها، بجز پروتئین سیکلین B بستگی دارد. مخلوط واکنش حاوی عصاره تخم زنوپوس و هسته‌های جدا شده اسپرم زنوپوس تیمار شده و تیمار نشده با RNase تخلیص شد. به علاوه ترکیبات دیگر در زیر نشان داده شده است کروموزوم‌ها با رنگ فلورسانت متصل شونده به DNA مشاهده می‌شوند. توبولین نشان‌دار شده با رودامین فلورسانت در واکنش ما به میکروتوبول‌ها وارد شده و امکان مشاهده دستگاه دوک میتوزی را می‌دهند. (a , b) بعد از آنکه عصاره تخم با RNase به منظور تخریب mRNA های آندوژنی تیمار شد، یک مهارکننده RNAse به محیط اضافه می‌شود. mRNAایی که سیکلین B نوع طبیعی و نوع جهش یافته تجزیه‌ناپذیر را رمزدهی می‌کند، به محیط اضافه می‌شود. زمانی که کروموزوم متراکم و دستگاه دوک تشکیل یافته بعد از افزودن هسته اسپرم مشاهده می‌شوند زمان صفر در نظر می‌گیرند. در حضور سیکلین B نوع وحشی (a) کروموزوم‌های متراکم به میکروتوبول‌های دوک متصل، از یکدیگر جدا شده و به قطب‌های دوک کشیده می‌شوند. بعد از گذشت ۴۰ دقیقه، دوک دپلیمریزه شده (بنابراین قابل مشاهده نمی‌باشد) و به موازات تجزیه سیکلین B کروموزوم‌ها از حالت متراکم خارج می‌شوند (رنگ‌آمیزی DNA باز شده). در حضور سیکلین B غیرقابل تجزیه (b) کروموزوم‌ها (a) به قطب‌های دوک ظرف مدت ۱۵ دقیقه کشیده می‌شوند اما میکروتوبول‌های دوک تجزیه نشده و کروموزوم‌ها نیز حتی بعد از ۸۰ دقیقه از حالت متراکم خارج نمی‌شوند. این مشاهدات نشان می‌دهد که تجزیه شدن سیکلین B برای جدا شدن کروموزوم‌ها در آنافاز مورد نیاز نمی‌باشد، اما عمل تجزیه سیکلین B برای دپلمیریزه شدن میکروتوبل دوک و خارج شدن کروموزوم از حالت متراکم در طول دوره تلوفاز مورد نیاز می‌باشد. (c) غلظت‌های متفاوتی از یک پپتید کوتاه حاوی جعبه تخریب سیکلین B به محلولی که با RNase تیمار نشده بود اضافه شد. نمونه‌ها ۱۵ یا ۳۵ دقیقه بعد از تشکیل دستگاه دوک به منظور رنگ‌آمیزی DNA ، رنگ‌آمیزی شدند. دو تا از پایین‌ترین غلظت‌های پپتید، جدا شدن کروموزوم را به تأخیر انداختند و بالاترین غلظت پروتئین، جدا شدن کروموزوم را کاملاً مهار کرد. در این آزمایش، پپتید جعبه تخریب به نظر می‌آید به طور رقابتی پلی یوبی کوئیتینه شدن APC/C ، سیکلین B و همچنین پروتئین هدف دیگری را که تجزیه شدن‌اش برای جدا شدن کروموزوم‌ها ضروری است، مهار می‌کند.

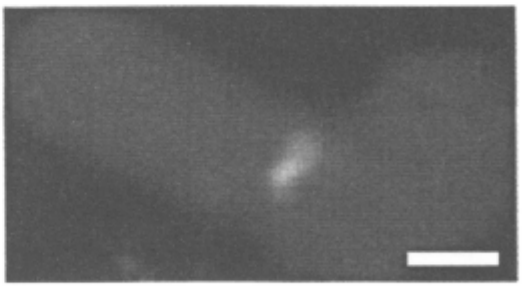
افتاد و در غلظت‌های بالاتر کاملاً متوقف شد (شکل c ۲۰ـ۲۰). گمان می‌رود پپتید جعبه تخریب اضافه شده به عنوان سوبسترا برای سیستم پلی‌یوبی کوئیتینه شدن هدایت شده با APC/C عمل کرده و، با پروتئین‌های طبیعی آندوژن هدف رقابت کرده و بدین وسیله تجزیه آنها را با پروتئوزوم‌ها به تاخیر انداخته و یا مانع آن می‌شود. رقابت با سیکلین B تجزیه آن را به تأخیر می‌اندازد و این دلیل مهار مشاهده شده برای از دست رفتن تراکم کروموزوم است. مشاهده اینکه جدا شدن کروموزوم در این آزمایش مهار شد اما در آزمایش سیکلین B غیرقابل تجزیه به جهش یافته مهار نگردید، نشان داد جدا شدن وابسته به پلی یوبی کوئیتینه شدن یک پروتئین هدف متفاوت به وسیله یک یوبی کوئیتین - پروتئین لیگازی انجام می‌گیرد که هم به جعبه تخریب سیکلین B و هم به پپتید جعبه تخریب متصل می‌شود.

همانطور که قبلاً اشاره شد هر یک از کروماتیدهای خواهری در متافاز از طریق کینه‌توکورهای خود به میکروتوبول‌ها متصل می‌شوند. کینه‌توکورها یک کمپلکس پروتئینی بوده و در سانترومر شکل می‌گیرند. در انتهای دیگر این کینه‌توکور، میکروتوبول‌ها به یکی از قطب‌های دوک متصل می‌باشند (شکل ۳۶ـ۱۸). در مرحله متافاز، دوک در حالت فشار است، در این مرحله نیروهای کششی در کینه‌توکور به طرف قطب‌های مخالف دوک با نیروهای فشاری قطب‌های دوک برای جدا شدن از هم به تعادل می‌رسند. کروماتیدهای خواهری از یکدیگر جدا نمی‌شوند زیرا آنها در سانترومرهایشان به وسیله کمپلکس‌های چندپروتئینی که **کوهسین** نامیده می‌شوند در کنار یکدیگر نگه داشته می‌شوند. در بین پروتئین‌های تشکیل دهنده کمپلکس کوهسین، خانواده پروتئین SMC که در بخش قبل (شکل ۳۸ـ۶) بحث شد، وجود دارد. وقتی عصاره تخم زنوپوس به وسیله تیمار با آنتی‌بادی‌های ویژه کوهسین پروتئین‌های SMC کوهسین را از دست دادند، عصاره‌هایی که کوهسین را از دست داده‌اند بعد از افزودن هسته اسپرم می‌توانند DNAای خود را همانندسازی کند اما کروماتیدهای خواهری به وجود آمده به طور صحیح به یکدیگر متصل نمی‌شوند. علاوه بر این در اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه با جهش‌های حساس به گرما در زیرواحدهای کوهسین، آنکوباسیون در دمای غیرمتعارف با مشکلاتی را در جدا شدن کروموزوم‌ها در طول میتوز می‌تواند به وجود آورد چون اتصال کروماتیدهای خواهری به رشته‌های دوک که از قطب‌های دوکی مخالف می‌آیند، نیازمند اتصال دو کروماتید خواهری به یکدیگر است. این نتیجه قابل پیش بینی است که کروماتیدهای خواهری این سلول‌های جهش یافته در طول میتوز به یکدیگر متصل نمی‌باشند. این یافته ثابت می‌کند، کوهسین برای چسبندگی بین کروماتیدهای خواهری ضروری است.

مولکول‌های کوهسین در اواخر G_1 به کروموزوم‌ها متصل می‌شوند. شکل ۲۱ـ۲۰ یک مدل از چگونگی اتصال کروموزوم‌های خواهری به وسیله کمپلکس کوهسین حلقوی که در فاز S همانندسازی می‌شوند را نشان می‌دهد. براساس این مدل یا چنگال همانندسازی DNA از حلقه‌های کوهسین می‌گذرند و یا حلقه‌های کوهسین باز می‌شوند تا چنگال همانندسازی عبور کند و سپس دوباره

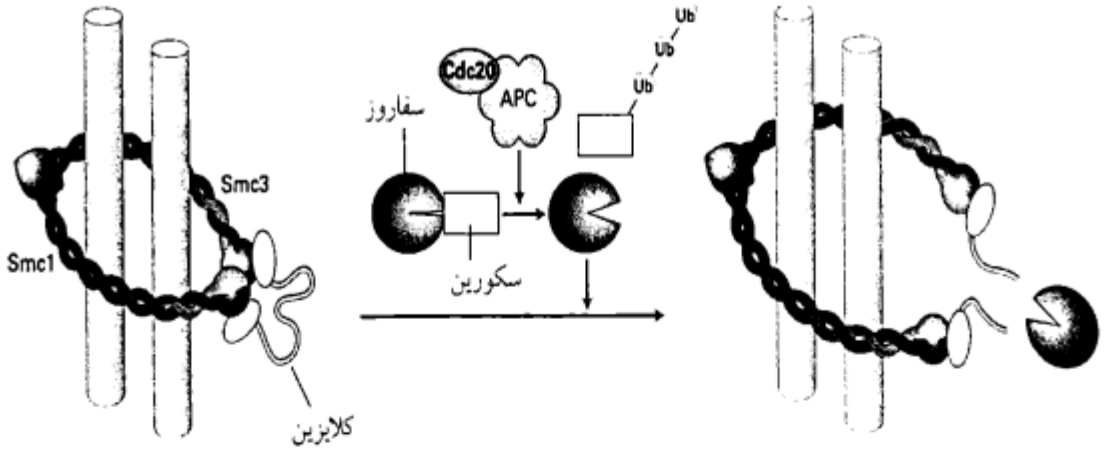


▲ **شکل ۲۱ـ۲۰: مدل اتصال کوهسین در کروموزوم‌های خواهری.** شواهد قوی وجود دارد که کمپلکس کوهسین همانند دیگر کمپلکس‌های پروتئین SMC (شکل ۳۸ـ۶) حلقوی است اما اینکه آیا یک حلقه کوهسین به تنهایی کروماتیدهای دختری را به یکدیگر متصل نگه می‌دارد و یا دو حلقه این کار را می‌کند مشخص نیست. هر یک از این حلقه‌ها به دور یک کروماتید خواهری قرار گرفته و این حلقه‌ها مانند اتصالات در زنجیر به یکدیگر متصل می‌شوند. احتمالاً شامل چندین حلقه کوهسین اتصال یافته در بین کروماتیدهای خواهری می‌باشد. عبور یک چنگال همانندسازی از درون یک حلقه کوهسین سبب اتصال کروماتیدهای خواهری می‌شود. در سلول‌های مهره داران کوهسین‌ها از بازوهای کروموزوم در طول پروفاز و اوایل متافاز آزاد شده و در انتهای متافاز تنها در ناحیه سانترومر باقی می‌مانند.



▲ **شکل ۲۲ـ۲۰ (شکل رنگی) قرارگیری PP2A در سانترومر کروموزوم متافاز انسانی.** DNA به رنگ آبی رنگ‌آمیزی شده است و یک پروتئین نشانگر برای سانترومرها به وسیله آنتی‌بادی ویژه (قرمز) شناسایی شده است که PP2A نیز زیر رده B56α (رنگ سبز) بود.

حلقه‌های کوهسین به دور کروماتیدهای خواهری بسته می‌شوند. این مدل اتصالات کوهسین را در سراسر طول کروماتیدهای خواهری حفظ می‌کند. در بعضی از موجودات مانند کرم حلقوی الگانس اتصالات پروتئینی در بازوهای کروموزوم حفظ می‌شوند با این حال در آنافاز این اتصالات شکسته می‌شوند. هر چند در اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه و مهره داران فسفریلاسیون کوهسین‌ها به وسیله‌ی پروتئین کینازها که به وسیله‌ی MPF فعال می‌شود سبب جدا شدن کوهسین در اواخر پروفاز از بازوهای کروماتید می‌شوند. برخلاف کمپلکس کوهسین در بازوهای کروموزوم، همان مولکول‌های کوهسین در مجاورت سانترومر جدا نشده و به کروماتیدهای خواهری را در ناحیه سانترومر کنار هم نگه می‌دارند. بررسی اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه جهش یافته که در جدا شدن کروموزوم در مرحله میتوز دچار مشکل می‌باشد نشان داد ایزوفرمی خاص از پروتئین فسفاتاز که PP2A نام دارد به طور طبیعی به سانترومر متصل می‌باشد (در کروموزوم‌های انسان مشاهده شده است شکل ۲۲ـ۲۰). این فسفاتاز سریعا کمپلکس‌های کوهسین را که



▲ **شکل ۲۳ـ۲۰: تنظیم برش کوهسین** سپاراز، پروتئازی است که می‌تواند یک بریدگی در زیرواحد کوچک کلایزین در کمپلکس کوهسین، ایجاد کرده و با اتصال سکورین در مرحله قبل از آنافاز مهار شود. زمانی که تمام کینه‌توکورها به میکروتوبول‌های دوک متصل شدند و دستگاه دوک به طور صحیح تجمع یافته و جهت‌گیری کرده، فاکتور اختصاصیت Cdc20 به APC/C متصل شده و آن را به سمت پلی یوبی کوئیتینه کردن سکورین هدایت می‌کند. به دنبال تجزیه سکورین با پروتئوزوم، اسپاراز رها شده زیرواحد کلایزین را بریده، حلقه‌های کوهسین را شکسته و به کروماتیدهای خواهری اجازه می‌دهد تا به وسیله‌ی دستگاه دوک به سمت قطب‌های مخالف کشیده شود.

در اواخر پروفاز به وسیله‌ی پروتئین کیناز فسفریله شده، دفسفریله می‌کند. این عملکرد تنها در مجاورت سانترومر که فسفاتاز متصل است اتفاق می‌افتد. بنابراین کمپلکس‌های کوهسین مجتمع با سانترومر در طول اواخر پروفاز مانند کمپلکس‌های کوهسین در بازوهای کروموزوم، جدا نشده و به کروماتیدها در سانترومر متصل باقی می‌مانند. مطالعات بیشتر در مخمر جهش یافته منجر به ارائه مدل اشاره شده در شکل ۲۳ـ۲۰ شد. این مدل به چگونگی تنظیم APC/C در جداسازی کروماتیدهای خواهری به منظور شروع آنافاز می‌پردازد. پروتئین‌های کوهسین SMC کروماتیدهای خواهری را در سانترومر به یکدیگر متصل می‌کنند. فعالیت برقراری اتصال کوهسین به سکورین وابسته است. این پروتئین در تمام یوکاریوت‌ها یافت می‌شود. قبل از آنافاز سکورین متصل شده و **سپاراز**[1] که یک پروتئاز است را مهار می‌کند. به محض اینکه تمام کینه‌توکورهای کروموزوم به میکروتوبول‌های دوک متصل شدند، بوسیله فاکتور اختصاصی به نام Cdc20 نامیده می‌شود برای پلی یوبی کوئیتینه نمودن سکورین هدایت می‌شود. (توجه کنید این فاکتور اختصاصیت جدای از cdh1 است که APC/C را برای پلی یوبی کوئیتینه کردن سیکلین نوع B هدایت می‌کند). سکورین پلی یوبی کوئیتینه شده، سریعا به وسیله پروتئوزوم‌ها تجزیه شده و در پی آن آنزیم اسپاراز آزاد می‌شود. اسپاراز در غیاب مهارکننده‌اش یک زیرواحد کوچک از کوهسین به نام کلیسین[2] را می‌برد. با بریده شدن کلیسین حلقه‌های پروتئین که کروماتیدهای خواهری را به هم متصل می‌کنند شکسته می‌شوند. زمانی که این ارتباط شکسته شد، آنافاز شروع گردیده و نیرویی که از قطب‌ها روی کینه‌توکورها اعمال می‌شود، کروماتیدهای خواهری را به سمت قطب‌های دوک مخالف حرکت می‌دهد.

چون Cdc20 (فاکتوری اختصاصیتی که APC/C را به سمت سکورین هدایت می‌کند) قبل از Cdh1 (فاکتوری اختصاصیتی که APC/C را به سمت سیکلین‌های میتوزی هدایت می‌کند) فعال می‌شود، فعالیت MPF تا زمان بعد از جدا شدن کروموزوم‌ها کاهش نمی‌یابد. به دنبال این نظم موقت در فعال‌سازی دو فاکتور اختصاصیت APC/C، کروموزوم‌ها به صورت متراکم باقی می‌مانند و تجمع شدن مجدد پوشش هسته‌ای تا هنگامی که کروموزوم‌ها در موقعیت صحیح قرار نگرفته باشند صورت نمی‌گیرد. همانطور که در قسمت ۷-۲۰ خواهیم دید، Cdc20 و Cdh1 به وسیله‌ی مکانیسم‌های نظارتی نقطه کنترل تنظم می‌شوند. تا زمانی که تمام کینه‌توکورها به فیبرهای دوک متصل‌اند و فشار به کینه‌توکور همه کروماتیدهای خواهری اعمال شده و آن‌ها را به سمت قطب‌های دوکی مخالف می‌کشاند، Cdc20 مهار می‌شود. از طرف دیگر Cdh1 تا زمانی که کروموزوم‌های دختری به اندازه کافی فاصله

1- Separase 2- Kleisin

گرفته‌اند که پوشش هسته‌ایی بتواند شکل گرفته و سلول تقسیم شود، مهار می‌گردد.

کاهش تراکم کروموزوم و دوباره تشکیل شدن پوشش هسته به دفسفریلاسیون سوبستراهای MPF بستگی دارد

در بخش‌های پیش به این مبحث پرداخته شد که چگونه فسفریلاسیون از طریق MPF در لامین‌های هسته‌ای، نوکلئوپورین‌ها و پروتئین‌های موجود در غشای داخلی هسته، سبب جدا شدن کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای و جمع شدن غشای هسته‌ای به داخل ER می‌شوند. زمانی که کروموزوم در طول آنافاز به اندازه کافی جدا شدند، مکانیسم نظارتی نقطه کنترل جدا شدن کروموزوم، پروتئین فسفاتاز Cdc14 را فعال می‌کند. Cdc14 گروه‌های فسفاتی را که به وسیله‌ی MPF به پروتئین‌ها اضافه شده، برمی‌دارد. در واقع Cdc14 عکس پروتئین MPF عمل می‌کند. از سوی دیگر Cdc14 سبب دفسفریلاسیون Cdh1 و در پی آن فعال شدن این فاکتور مهم می‌شود. این امر باعث می‌شود، Cdh1 به کمپلکس APC/C متصل شده و با این اتصال، کمپلکس APC/C را به سمت پلی یوبی کوئیتینه کردن سیکلین‌های میتوزی هدایت کرده و باعث تجزیه آن‌هامی شود (شکل ۱۰-۲۰).

انجام عمل معکوس فسفریلاسیون MPF فعالیت تعداد زیادی از پروتئین‌ها را تغییر می‌دهد و آنها را به شرایطی که در سلول‌های اینترفازی داشتند بر می‌گرداند. دفسفریلاسیون کندنسین‌ها، هیستون H_1 و پروتئین‌های دیگری که به کروماتین متصل می‌باشند، موجب کاهش تراکم کروموزوم‌های میتوزی در تلوفاز می‌شود.

پروتئین‌های دفسفریله شده موجود در غشاء داخلی هسته بار دیگر به کروماتین متصل می‌شوند. در نتیجه چندین ناحیه از غشاء ER حاوی این پروتئین‌ها بوده و به نظر می‌رسد به سطح کروموزوم‌هایی که از حالت تراکم خارج شده‌اند متصل می‌گردد. سپس با همدیگر ادغام شده و غشای دوگانه پیوسته‌ای را اطراف کروموزوم‌هایی که تراکم‌شان را از دست داده‌اند، ایجاد می‌کنند (شکل ۲۴-۲۰). دفسفریلاسیون زیر کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای به آنها اجازه می‌دهد تا دوباره مجتمع شده و NPCهای کامل را به وجود آورد. بعد از تشکیل NPCها، این کمپلکس‌ها وارد غشاهای داخلی و خارجی می‌شوند. این عمل بلافاصله بعد از ادغام برآمدگی‌های ER صورت می‌گیرد. Ran.GTP که برای خارج کردن و به داخل بردن مواد در هسته مورد نیاز است (فصل ۱۳) هم موجب تحریک ادغام برآمدگی‌های ER به منظور تشکیل پوشش هسته‌ای دختری می‌شود و هم موجب تجمع زیرکمپلکس‌های منفذ هسته‌ای که به وسیله‌ی فسفریلاسیون MPF روی نوکلئوپورین‌ها در مرحله پروفاز به وجود آمده بودند، می‌شوند (شکل ۲۴-۲۰). غلظت Ran.GTP در فاصله‌های نزدیک به کروموزوم‌ها غیرمتراکم بسیار بالا می‌باشد زیرا فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانین Ran (Ran.GEF) به کروماتین متصل است. در نتیجه، ادغام غشاء در سطح کروموزوم‌های غیرمتراکم تحریک شده و صفحات غشاء هسته‌ای را به وجود می‌آورند که NPCها در آنها وارد می‌شود.

تجمع مجدد غشاءهای دارای NPC_s به دور هر کروموزوم، مینی هسته‌های منفردی که **کاریومر**[1] نامیده می‌شوند را به وجود می‌آورند. ادغام متعاقب این کاریومرها که به هریک از قطب‌های دوک متصل می‌باشد دو هسته سلولی دختر را به وجود می‌آورد که این هسته‌ها هر یک مجموعه کامل از کروموزوم‌ها را در خود دارند. لامین‌های دفسفریله شده A و C ظاهراً از طریق NPCهای تجمع یافته مجدد وارد هسته شده و به صورت لامینای جدید هسته‌ای ظاهر می‌شود. تشکیل شدن مجدد لامینای هسته‌ای در هسته دختر احتمالاً به وسیله‌ی مولکول‌های لامین B شروع می‌شود. لامین B از طریق اتصال ایزوپرنیل خود به غشاء ER در تمام دوره میتوز متصل باقی می‌ماند و در غشاء داخلی پوشش هسته‌ای تجمع یافته مجدد کاریومرها قرار می‌گیرد.

نکات کلیدی بخش ۴-۲۰

مکانیسم‌های مولکولی تنظیم وقایع میتوزی

- در اوایل میتوز، فسفریلاسیون کاتالیز شده با MPF لامین‌های A، B، C و نوکلئوپورین‌ها و پروتئین‌های پوشش داخلی هسته باعث دپلیمریزاسیون رشته‌های لامین (شکل ۱۶-۲۰ ملاحظه کنید) و جداشدن منافذ هسته‌ای بصورت زیر کمپلکس‌های منفذ شده و منجر به خردشدن پوشش هسته‌ای و جمع‌شدن آن به طرف ER می‌شود.
- فسفریلاسیون کمپلکس‌های کندنسین بوسیله MPF یا کیناز تنظیم‌شده با MPF باعث متراکم شدن کروموزوم در اوایل میتوز می‌شود.
- کروماتیدهای خواهری به وسیله همانندسازی DNA در فاز S تشکیل شده و از طریق کمپلکس‌های کوهسین

1- Karyomer

در سانترومرها به هم متصل می‌شوند. کمپلکس‌های کوهسین حاوی پروتئین‌های SMC متصل شونده به DNA و پروتئین‌های دیگر می‌باشد.

■ در شروع آنافاز، APC/C توسط Cdc20 هدایت می‌شود تا سکورین را پلی یوبی‌کوئیتینه نماید. سکورین سپس بوسیله پروتئوزوم‌ها تجزیه می‌شود. این امر باعث فعال شدن اسپاراز می‌گردد. اسپاراز باعث برش در کلایزین (زیرواحدی از کوهسین) و سپس عدم اتصال کرماتیدهای خواهری می‌شود (شکل ۲۳-۲۰ را ملاحظه کنید).

■ بعد از حرکت کروماتیدهای خواهری به طرف قطب‌های دوک، APC/C توسط Cdc1 برای پلی یوبی کوئیتینه کردن سیکلین‌های میتوزی هدایت می‌شود. این امر منجر به تخریب سیکلین‌های میتوزی شده و باعث کاهش فعالیت MPF می‌گردد که نشانه‌ای از آغاز تلوفاز است.

■ افت فعالیت MPF در تلوفاز به فسفاتازهایی همچون Cdcl4 امکان می‌دهد تا فسفاتازهای تنظیمی را از کندانسین، لامین‌ها، نوکلئوپورین‌ها و پروتئین‌های غشاء هسته‌ای دیگر برداشته و امکان از دست رفتن تراکم کروموزوم‌ها و تجمع مجدد غشاء هسته‌ای لامینای هسته‌ای و کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای را می‌دهد.

■ تجمع Ran-GEF با کروماتین باعث افزایش موضعی غلظت Ram-GTP در نزدیکی کروموزوم‌های غیرمتراکم و پیش‌برد ادغام گستره‌های پوشش هسته‌ای از ER در اطراف هر کروموزوم می‌شود. این امر باعث تشکیل کاریومرها می‌گردد. کاریومرها سپس با همدیگر ادغام شده و هسته سلول دختر را می‌سازند (شکل ۲۴-۲۰ را ملاحظه کنید).

۲۰-۵ سیلیکین -CDK و یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگاز مرحله S راکنترل می‌کنند

در اکثر سلول‌های مهره‌داران تصمیم کلیدی تعیین کننده چه سلول بخواهد تقسیم بشود و چه نخواهد، تصمیم ورود به فاز S است. در اکثر موارد هنگامی که یک سلول از مهره‌داران متعهد ورود به فاز S شد، چند ساعت طول می‌کشد تا چرخه سلولی باقی مانده را طی کرده و میتوز کامل شود. مخمر جوانه‌زن اسکیزوساکارومایسیس‌سرویزیه به همین ترتیب تکثیر یافتن خود را تنظیم می‌کند. تمام اطلاعاتی که از مکانیسم مولکولی کنترلی وارد شدن سلول به فاز S و کنترل همانندسازی DNA داریم از مطالعات ژنتیکی اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه منشاء می‌گیرد. سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه به وسیله‌ی جوانه زدن تکثیر می‌یابند (شکل ۲۵-۲۰). سلول‌های مادری ودختری در حالی که در حال رشد می‌باشند هر دو در مرحله G_1 چرخه سلولی باقی می‌مانند.

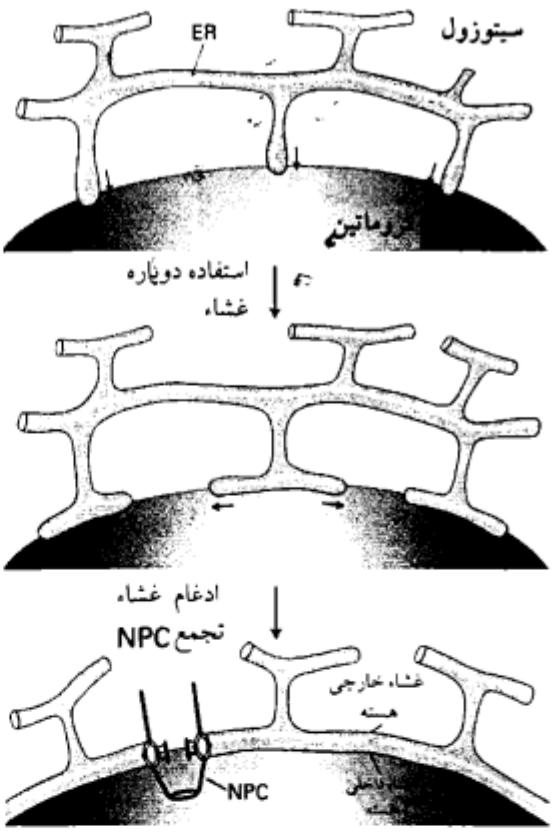
البته در اول برای سلول‌های مادری بزرگ زمان کمتری برای رسیدن به اندازه مناسب جهت تقسیم لازم است. وقتی سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه در مرحله G_1 به اندازه کافی رشد کردند، این سلول‌ها برنامه‌ای از بیان ژن را شروع می‌کنند که آنها را وارد فاز S می‌کند. اگر سلول‌های مرحله G_1 را قبل از رسیدن به اندازه بحرانی از محیط کشت غنی به محیط کشتی با مواد غذایی کم منتقل کنیم، این سلول‌ها در مرحله G_1 باقی مانده و به آرامی رشد می‌کنند تا به اندازه مناسب برای ورود به فاز S برسند.

هنگامی که سلول‌های G_1 به اندازه بحرانی رسیدند، متعهد می‌شوند که چرخه سلولی را کامل کنند یعنی وارد مرحله S شده و از مرحله G_2 گذشته و میتوز را کامل کنند. این عمل حتی هنگامی که سلول‌ها را وارد محیط کشت با مواد غذایی کم نماییم هم صورت می‌گیرد. نقطه‌ای در اواخر G_1 از سلول‌های در حال رشد که در این **اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه** نقطه آنها به طور قطعی متعهد می‌شوند تا وارد فاز S شوند و چرخه سلولی را به پایان برسانند، **استارت**[1] نامیده می‌شد.

همانطور که در قسمت ۶-۲۰ مشاهده می‌کنیم یک فرآیند مشابهی در سلول‌های در حال تقسیم پستانداران رخ می‌دهد.

در این قسمت انتقال $G_1 \rightarrow S$ و رخدادهای مولکولی که استارت را به وجود می‌آورند بررسی می‌شود. ورود به مرحله S یا همانند میتوز به وسیله فعالیت سیکلین -CDK ها کنترل می‌شود. البته مکانیسم تنظیمی که فعالیت این سیکلین -CDK ها را کنترل می‌کند متفاوت از مکانیسم تنظیمی است که کمپلکس‌سیکلین -CDK های میتوزی را کنترل می‌کند. نقش‌های سیکلین -CDK های G_1 و فاز S در شروع سنتز DNA و اطمینان حاصل شدن از همانندسازی DNA که فقط یکبار در طول چرخه سلولی انجام می‌گیرد را بحث و بررسی می‌کنیم و همچنین به بررسی چگونگی دوباره تنظیم شدن چرخه سلولی بعد از اتمام میتوز به منظور آماده‌سازی برای تقسیم بعدی سلولی می‌پردازیم.

1- Start



▲ **شکل ۲۴ـ۲۰: مدل تجمع مجدد پوشش هسته‌ای در طول تلوفاز.** گسترش شبکه آندوپلاسمی (ER) به کروموزوم غیرمتراکم متصل شده و سپس با یکدیگر ادغام شده، یک غشاء دو لایه‌ای اطراف کروموزوم را به وجود می‌آورد. زیرکمپلکس‌های منفذ هسته‌ای دفسفریله شده، دوباره به صورت منفذ هسته‌ای تجمع یافته و سبب به وجود آمدن مینی هسته منفردی به نام کاریومر می‌شوند. کروموزوم‌های محصور شده تراکم خود را از دست می‌دهند و ادغام متعاقب پوشش‌های هسته‌ای کاریومرها در هر قطب دوک یک هسته با یک سری کامل از کروموزوم‌ها را به وجود می‌آورد. NPC = کمپلکس منفذ هسته‌ای

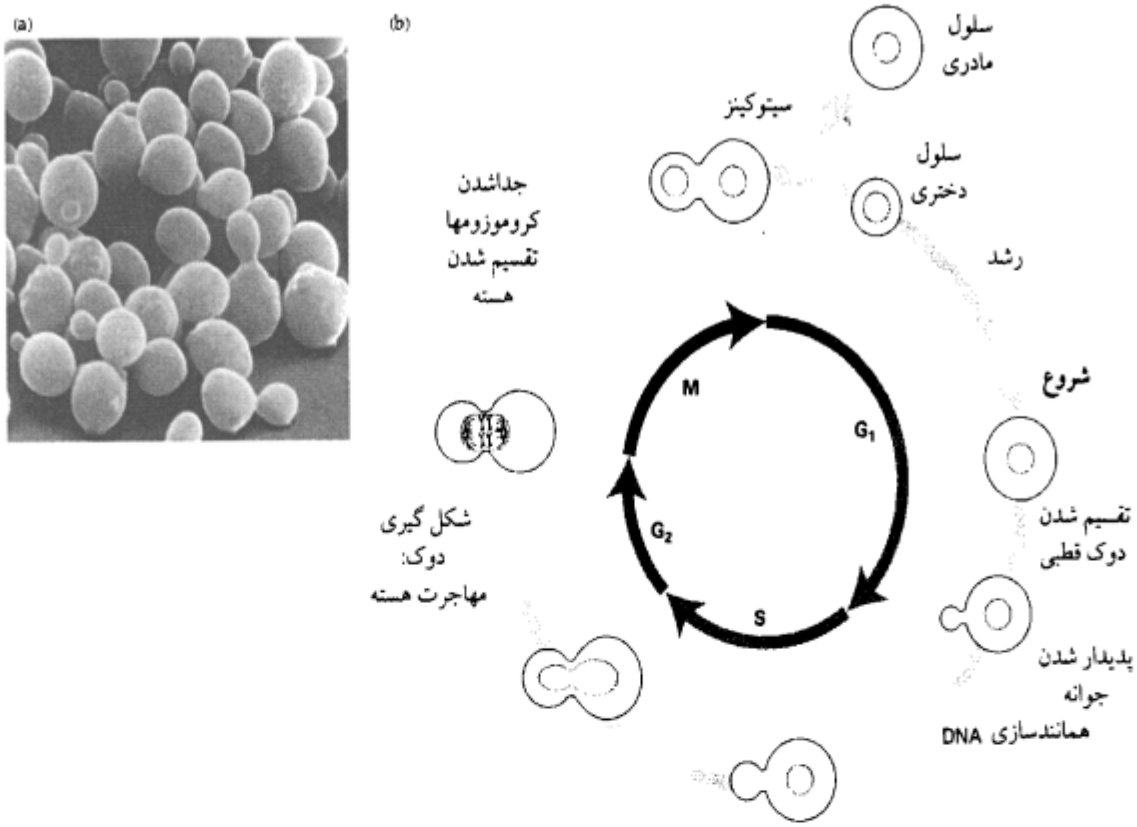
یک کیناز وابسته به سیکلین (CDK) در اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه برای ورود به فاز S حیاتی می‌باشد

تمام سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه که در ژن cdc خاصی دارای جهش می‌باشند با جوانه‌های یک اندازه‌ای در دمای غیرمتعارف متوقف می‌شوند (شکل ۶۶ـ۵). هر کدام از جهش یافته‌ها یک فنوتیپ نهایی با اندازه خاصی از جوانه‌ها دارد. بدون جوانه، جوانه‌هایی با اندازه متوسط، یا جوانه‌های بزرگ. توجه کنید که در اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه ژن‌های نوع وحشی به صورت حروف بزرگ ایتالیک (به‌عنوان مثال CDC28) و ژن‌های مغلوب جهش یافته را به صورت حروف کوچک ایتالیک نشان می‌دهند (به‌عنوان مثال cdc28). در مورد پروتئین نوع وحشی مربوطه، همانند پروتئین‌های اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه حرف اول را به صورت رومی و بزرگ و حروف دیگر را کوچک می‌نویسند (به عنوان مثال Cdc28).

جهش یافته حساس به حرارت در ژن cdc28 شناخته شده که CDK را در ساکارومایسیس سرویزیه رمزدهی می‌کند و در دمای غیرمتعارف، جوانه تشکیل نمی‌دهد. این فنوتیپ نشان می‌دهد که عملکرد Cdc28 برای ورود به فاز S ضروری می‌باشد. وقتی این جهش یافته‌ها به محیط با حرارت غیرمتعارف منتقل شدند شبیه به سلول‌های نوع وحشی که از غذای بطور ناگهانی محروم شده‌اند، رفتار می‌کنند. به این معنی که سلول‌های جهش یافته cdc28 که به اندازه کافی بزرگ شده‌اند تا نقطه استارت را پشت سر بگذارند در زمانی که دما تغییر می‌کند چرخه سلولی را به صورت طبیعی ادامه می‌دهند تا میتوز را به پایان رسانند. از سوی دیگر آنهایی که برای عبور کردن از نقطه استارت بسیار کوچک باشند زمانی که به محیط کشت با دمای غیرمتعارف منتقل شدند حتی در محیط غذایی غنی، مرحله S را پشت سر نمی‌گذارند. با وجود اینکه سلول‌های cdc28 که در G_1 متوقف شده‌اند در دمای غیرمتعارف به افزایش حجم و اندازه خود ادامه می‌دهند اما نمی‌توانند نقطه استارت را پشت سر بگذارند و وارد مرحله S شوند. بنابراین آنها دارای سلول‌های بزرگ و بدون جوانه می‌باشند.

ژن وحشی CDC28 به واسطه‌ی توانایی‌اش در کامل کردن سلول‌های جهش یافته cdc28 در دماهای غیرمتعارف را می‌توان جدا شود (شکل ۴ـ۲۰). تعیین توالی CDC28 نشان داد که پروتئین رمزدهی‌شده به وسیله این ژن همولوگ پروتئین کینازها می‌باشند و هنگامی که پروتئین Cdc28 در E.coli بیان شود، فعالیت پروتئین کینازی کمی نشان می‌دهد. اسکیزوساکارومایسیس پمبه و دارای اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه تنها یک پروتئین کیناز وابسته به سیکلین (CDK) می‌باشند که مستقیماً در کنترل چرخه سلولی فعالیت دارد. مقایسه توالی CDK ها در این دو گونه نشان داد که اینها کاملاً همولوگ می‌باشند.

تفاوت فنوتیپ سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه و اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه که دارای جهش‌های حساس به دما در ژن‌های CDK شان می‌باشند را می‌توان با فیزیولوژی این دو مخمر شرح داد. در سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه که در محیط کشت غنی رشد می‌کنند کنترل چرخه سلولی در ابتدای مرحله گذر $G_2 \rightarrow M$ اعمال می‌شود (مرحله ورود به میتوز). در تعداد زیادی

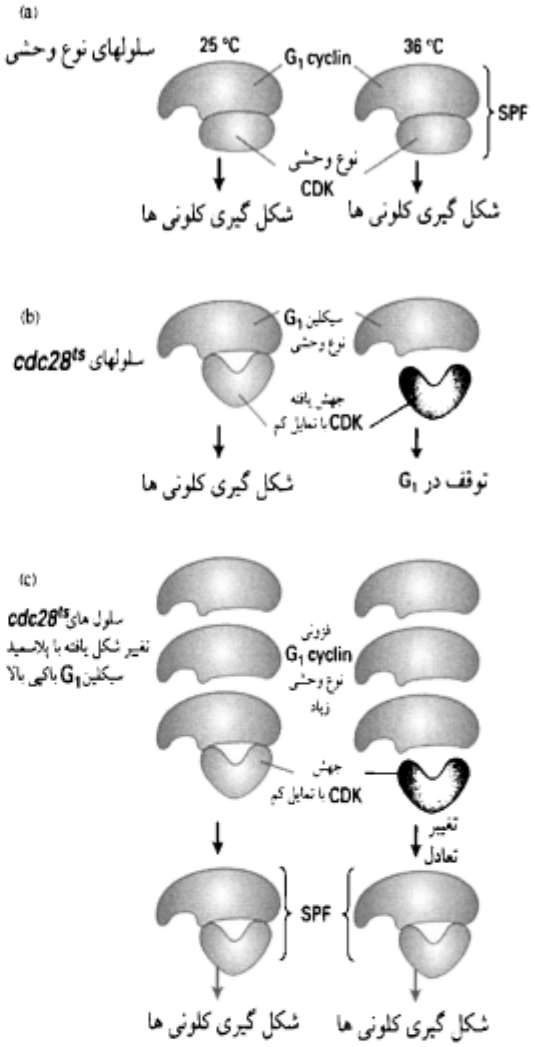


▲ **شکل ۲۵ـ۲۰: مخمر جوانه زن** ساکارومایسیس سرویزیه. (a) اسکن میکروگراف الکترونی از سلول‌های اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه در مراحل متفاوت چرخه سلولی. جوانه‌های بزرگتر که در انتهای فاز G1 پدیدار می‌شوند زمان بیشتری در چرخه بوده‌اند. (b) رخدادهای مهم در چرخه سلولی اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه. سلول‌های دختری زمانی که متولد می‌شوند از سلول مادر کوچکتر بوده و زمان بیشتری را در G1 رشد می‌کنند که به اندازه‌ای برسند تا وارد فاز S شوند. همانطور که در اسکیزوساکارومایسیس پمبه مشاهده می‌شود، پوشش هسته در طول دوره میتوز از بین نمی‌رود. برخلاف کروموزوم‌های اسکیزوساکارومایسیس پمبه کروموزوم‌های کوچک اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه به حد کافی متراکم نمی‌شوند تا با میکروسکوپ نوری مشاهده شوند.

از اسکیزوساکارومایسیس پمبه ها که دارای جهش مغلوب در CDK می‌باشند، فعالیت CDK به مقدار کافی در دمای غیرمتعارف حفظ شده و به سلول‌ها اجازه می‌دهد وارد فاز S شوند اما برای ورود به میتوز کافی نمی‌باشد. این سلول‌ها جهش یافته، اندکی کشیده‌تر بوده و در مرحله G_2 متوقف شده‌اند. در دمای غیرمتعارف، محیط کشت‌های دارای سلول‌های جهش یافته با CDK کاملاً ناقص، دو نوع سلول وجود دارد. عده‌ای از سلول‌ها در G_1 و عده‌ای در G_2 متوقف شده‌اند که این به موقعیت سلول‌ها در چرخه سلولی در هنگام تغییر دما وابسته است. تنظیم چرخه سلولی اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه در ابتدای مرحله گذر $G_1 \rightarrow S$ می‌باشد (در مرحله ورود به فاز S). بنابراین جهش یافته‌های با نقص کم در مرحله G_1 متوقف می‌شوند اما جهش یافته‌های با نقص کامل در CDK بسته به اینکه در هنگام تغییر دما در چه موقعیتی از چرخه سلولی قرار گرفته باشند در G_1 یا در G_2 متوقف می‌شوند . این مشاهدات اثبات می‌کند که CDK ها در اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه و اسکیزوساکارومایسیس پمبه برای ورود به هم فاز S و هم میتوز مورد نیاز است.

سه سیکلین G_1 برای تشکیل فاکتورهای پیش‌برنده فاز S به CDK ی کاسارومیس سرویزیه متصل می‌شوند

تا اواخر سال ۱۹۸۰ مشخص شده بود که فاکتور پیشبرنده میتوز (MPF) از دو زیرواحد تشکیل شده است . یکی CDK و دیگری سیکلین نوع B میتوزی که برای فعالیت زیرواحد کاتالیتیک موردنیاز است. با مقایسه به نظر رسید که احتمالاً اسکیزوساکارومایسیس پمبه یک فاکتور پیشبرنده فاز S (SPF) در خود دارد که فسفریلاسیون و تنظیم پروتئین‌هایی که برای سنتز DNA مورد نیاز می‌باشند را بر

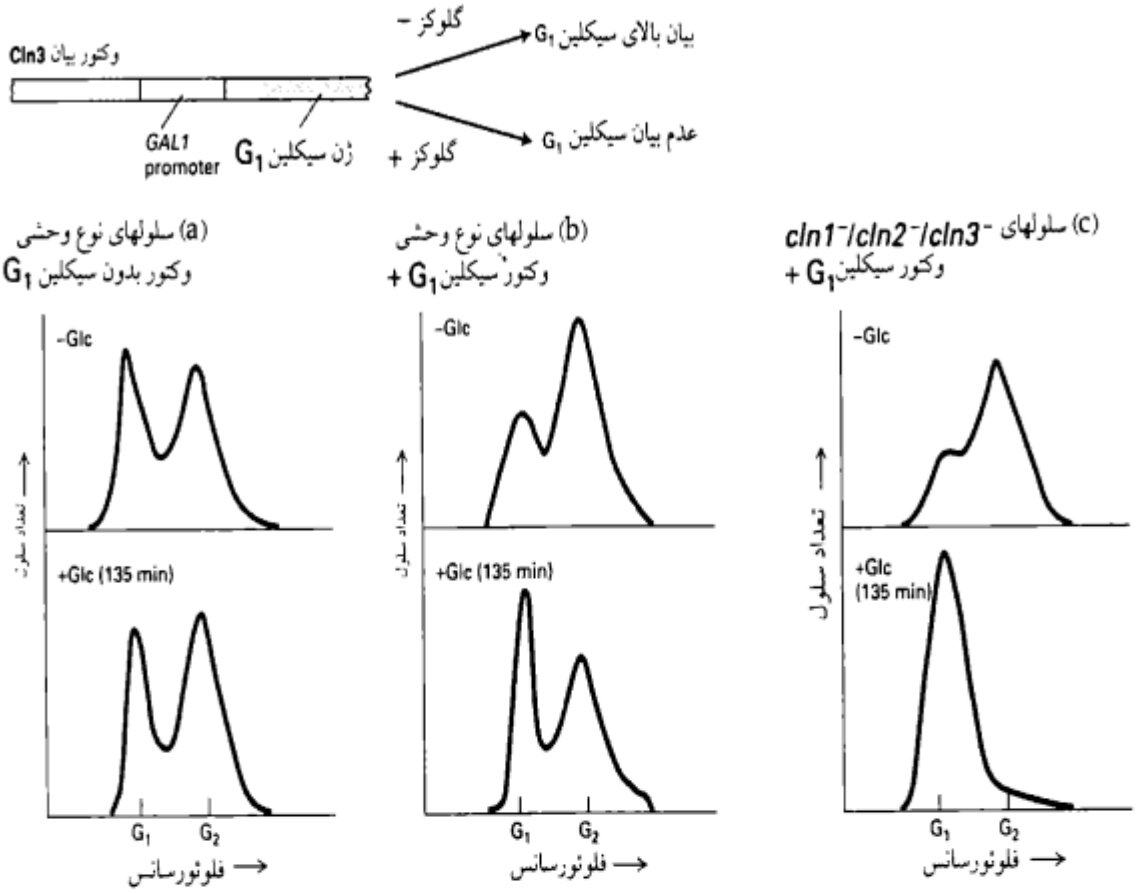


◀ شکل تجربی ۲۶-۲۰ ژن‌های رمزدهی‌کننده دو سیکلین G_1 در به اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه وسیله‌ی توانایشان در سرکوب جهش یافته حساس به دما شناسایی شدند. این غربال ژنتیکی براساس تفاوت میانکنش بین سیکلین‌های G_1 و CDK نوع طبیعی و نوع حساس به دمای (ts) از ساکارومایسیس سرویزیه است. (a) سلول‌های طبیعی یک CDK طبیعی تولید می‌کنند که به سیکلین‌های G_1 متصل می‌شود تا فاکتور پیشبرنده فاز (SPF)S را به وجود آورند و نتیجه آن تشکیل کلونی هم در دمای پایین و هم در دمای بالا است (یعنی دمای ۲۵°c و ۳۶°c) (b)بعضی از سلول‌های جهش یافته Cdc28 ts، یک CDK جهش یافته تولید می‌کنند که تمایل کمی به سیکلین G_1 در دمای ۳۶°c دارد. این سلول‌های جهش یافته به اندازه کافی فاکتور پیشبرنده فاز (SPF)S، سیکلین CDK-G_1 برای رشد و نمو کلونی خود در دمای ۲۶°c تولید می‌کند اما این فاکتور در دمای ۳۶°c به اندازه کافی تولید نمی‌شود. (c) وقتی کتابخانه ژنومی اسکیزوساکارومایسیس سرویزیه را وارد سلول‌های Cdc28 ts کنیم و آنها را در پلاسمید با نرخ بالا کلون کنیم. سه نوع کلونی در دمای ۳۶°c شکل می‌گیرد، یک سری از کلونی‌ها دارای پلاسمید هستند که ژن نوع وحشی CDC28 را حمل می‌کنند و دو دسته دیگر دارای پلاسمیدهایی هستند که یا ژن CLN1 و یا ژن CLN2 را حمل می‌کنند. سلول‌هایی که ژن CLN2 یا CLN1 را حمل می‌کنند غلظت سیکلین G1 رمز شده برای جبران کردن تمایل کم CDK ی جهش یافته به سیکلین ۳۶°C در دمای کافی می‌باشد. در نتیجه به اندازه کافی SPF برای وارد شدن به مرحله S و در پی آن میتوز شکل می‌گیرد. سلول‌هایی که کتابخانه ژنی را دریافت نکرده‌اند و یا سلول‌های cdc28 ts که پلاسمید را دریافت کردند اما در این پلاسمیدها ژن‌های دیگری حمل می‌شد در G_1 متوقف شده و تشکیل کلونی ندادند.

عهده دارد. همانند MPF پیشنهاد شد SPF نیز به صورت هترودیمر متشکل از CDK ی ساکارومایسیس سرویزیه و یک سیکلین وجود دارد (در این مورد سیکلینی که در G_1 عمل می‌کند) (شکل ۲-۲۰ را ملاحظه کنید). برای مشخص کردن سیکلین G_1 محققین به دنبال ژن‌هایی بودند که زمانی با غلظت بالایی بیان می‌شدند، می‌توانستند جهش‌های حساس به دما را در CDK ی اسکیزوساکارومایسیس پمبه مهار کنند. استدلال این روش در شکل ۲۶-۲۰ شرح داده شده است. محققین دو تا از این ژن‌ها یعنی CLN1 و CLN2 را شناسایی کردند. با بکار بردن روش‌های متفاوت، محققین یک جهش غالب را در ژن دیگر شناسایی کردند و آن را CLN3 نامیدند.

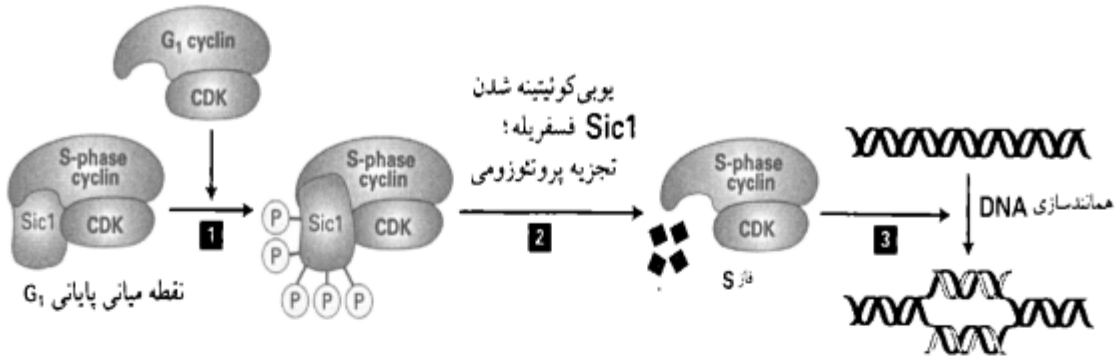
تعیین توالی این سه ژن CLN نشان داد که آنها سه پروتئین مرتبط را رمزدهی می‌کنند هر یک از این پروتئین‌ها دارای یک ناحیه ۱۰۰ اسیدآمینه‌ای هستند که شباهت زیادی را با سیکلین‌های نوع B موجود در انسان، زنوپوس، ساکارومایسیس پمبه و جوجه تیغی دریایی نشان می‌دهند. این ناحیه، دُمینی از سیکلین را رمز می‌کند که با CDK ها میانکنش دارد. این ناحیه در دُمین سیلکین انسان وجود دارد که در شکل c و ۱۵b-۲۰ نشان داده شده است. با کشف اینکه سه پروتئین CLN دارای ناحیه‌ای هستند که با سیلکین‌های میتوزی شباهت دارند، پیشنهاد کرد که آنها سیلکین‌های G_1 موجود در ساکارومایسیس سرویزیه هستند که به دنبال هم فعالیت می‌کنند. (توجه کنید که همولوگ‌های دُمین متصل شونده به CDK که در سیکلین‌های گوناگون دیده شده است ساختار متفاوتی از ناحیه‌ای که در ابتدا اشاره شده دارند و این ناحیه تنها در سیکلین‌های نوع B مشاهده می‌شود).

آزمایش‌های صورت گرفته براساس از بین بردن ژن‌ها نشان داد که سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه در صورت دارا بودن یکی از سه



▲ **شکل تجربی ۲۷ـ۲۰: سیکلین G_1 برای ورود سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه به فاز S مورد نیاز است و بیان زیاد سیکلین G_1 این سلول‌ها را به صورت زود به سمت فاز S سوق می‌دهد.** وکتور مخمری به کار برده شده در این آزمایشات (بالا) ژن یکی از سه سیکلین G_1 در ساکارومایسیس سرویزیه را که به پروموتر قوی GAL1 متصل است، حمل می‌کند. این پروموتر زمانی که گلوکز در محیط است خاموش می‌شود. برای مشخص کردن نسبت سلول‌های موجود در G_1 و G_2، سلول‌ها را در معرض رنگ فلورسانسی که به DNA متصل می‌شود قرار می‌دهند و سپس آنها را از جداکننده سلولی فعال شده با فلورسانس عبور می‌دهند (شکل ۲۸ـ۹ را ملاحظه کنید). چون محتوای DNA مرحله G_2 سلول‌ها دو برابر محتوای DNA سلول‌های G_1 می‌باشد، این روش می‌تواند سلول‌های موجود در این دو فاز از چرخه سلولی را تشخیص دهد. (a) سلول‌های نوع وحشی که واکتور خالی وارد آنها شده است در عدم حضور و حضور گلوکز توزیع یکسانی از سلول‌ها را در G_1 و G_2 نشان می‌دهد. (b) در عدم حضور گلوکز، سلول‌های نوع وحشی که واکتور سیکلین G_1 وارد آنها نشده است درصد بیش از حد طبیعی از سلول‌ها را در مرحله S و G_2 را نشان می‌دهند چرا که تولید زیاد سیکلین G_1 دوره G_1 را کاهش می‌دهد. وقتی بیان سیکلین G_1 در واکتور با اضافه کردن گلوکز خاموش می‌شود، توزیع سلول‌ها به صورت طبیعی بر می‌گردد (منحنی پایین). (c) سلول‌هایی که در هر سه ژن سیکلین G_1 دارای جهش می‌باشند و واکتور سیکلین G_1 واردشان شده است نیز درصد بالایی از سلول‌ها را در فاز S و G_2 در عدم حضور گلوکز در محیط کشت نشان می‌دهند (نمودار بالا). علاوه بر این وقتی بیان سیکلین G_1 از واکتور توسط افزودن گلوکز خاموش می‌شود سلول‌ها چرخه سلولی را کامل کرده و در G_1 متوقف می‌شوند (منحنی پایین) که نشان دهنده نیاز به سیکلین G_1 برای ورود سلول‌ها به فاز S است.

ژن سیکلین G_1 ،می‌توانند در محیط کشت غنی رشد کنند. همانطور که داده‌های این آزمایش در شکل ۲۷ـ۲۰ نشان می‌دهد تولید شدن زیاد یک سیکلین G_1 نسبت به سلول‌های موجود در G_1 را کاهش می‌دهد. این پدیده اثبات می‌کند که بالا بودن سطح کمپلکس سیکلین CDK-G_1 سلول‌ها را به سمت نقطه استارت زودرس سوق می‌دهد. علاوه بر این در عدم حضور هر سه سیکلین G_1 سلول‌ها در G_1 متوقف می‌شوند. این امر نشان می‌دهد که فاکتور SPF یا همان سیکلین CDK-G_1 برای ورود سلول‌های به فاز S ساکارومایسیس سرویزیه مورد نیاز است. این یافته‌ها یادآور نتایج به دست آمده از سیکلین میتوزی اسکیزو ساکارومایسیس بمبه است که از G_2



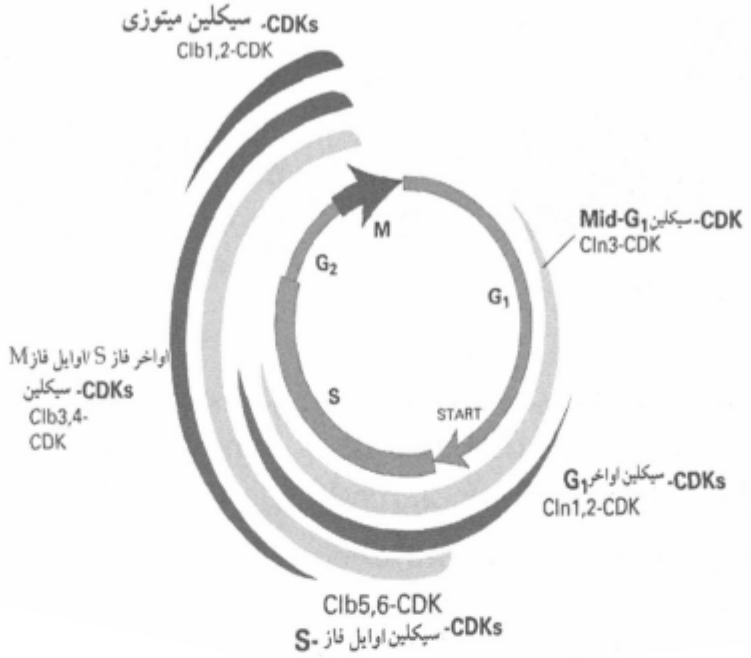
▲ **شکل ۲۸ـ۲۰: کنترل شروع فاز S در ساکارومایسیس سرویزیه به وسیله‌ی پروتئولیز تنظیم شده مهارکننده فاز S، Sic1.** کمپلکس‌های Cyclin-CDK فاز S (Clb6-CDK، سیکلین CDK) شروع به تجمع در G_1 می‌کنند اما به وسیله Sic1 مهار می‌شوند. این مهار مانع از شروع همانندسازی تا آمادگی کامل سلول می‌شود. کمپلکس‌های سیکلین- CDK مرحله G_1 که در اواخر G_1 تجمع می‌یابند (Cln2-CDK، Sic1 را در چندین سیکلین CDK جایگاه فسفریله می‌کنند (مرحله ❶) و با این عمل Sic1 را برای پلی یوبی‌کوئیتینه شدن توسط SCF (یوبی کوئیتین لیگاز) نشاندار می‌کنند که به دنبال آن عمل تجزیه Sic1 به وسیله‌ی پروتئوزوم صورت می‌گیرد (مرحله ❷). کمپلکس‌های فعال سیکلین- CDK فاز S آغاز سنتز DNA را القاء می‌کنند (مرحله ❸). این عمل به وسیله‌ی فسفریلاسیون اجزاء کمپلکس پیش آغاز که در اوایل G_1 روی نقطه آغازنی همانندسازی DNA جمع شده‌اند، صورت می‌گیرد.

عبور می‌کند و وارد میتوز می‌شوند. تولید زیاد سیکلین میتوزی باعث کوتاه شدن G_2 و ورود زودرس به میتوز می‌شود. در صورتی که مهار سیکلین میتوزی به واسطه‌ی جهش سبب طولانی شدن G_2 می‌شود (شکل ۱۲ـ۲۰) لذا این یافته‌ها تأیید می‌کند که پروتئین‌های CLN از ساکارومایسیس سرویزیه همان سیکلین‌های مرحله G_1 می‌باشند که عبور از فاز G_1 چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند.

در سلول‌های مخمر وحشی Cln3 به عنوان سیکلین مرحله میانی G_1 عمل می‌کند چراکه این پروتئین در نقطه میانی G_1 که در سلول‌هایی که به طور مدام تقسیم می‌شوند به طور انبوه بیان می‌گردد. mRNA این پروتئین در کل دوره چرخه سلولی به میزان تقریباً ثابت تولید می‌شود ولی ترجمه این mRNA در پاسخ به میزان مواد غذایی تنظیم می‌شود. mRNAی CLN3 دارای یک قالب قابل خواندن بالادست کوتاه است که آغاز ترجمه از قالب قابل خواندن CLN3 را مهار می‌کند. این مهار در حضور مواد غذایی زیاد حذف می‌شود که منجر به فعال شدن مسیر TOR و متعاقباً افزایش فعالیت فاکتور شروع ترجمه می‌شود (شکل ۸ـ۳۰). چون پروتئین CLN3 شدیداً ناپایدار است، غلظت آن با سرعت ترجمه mRNAاش نوسان می‌کند. در نتیجه میزان فعالیت کمپلکس‌های با سیکلین -CDK نقطه‌ای میانی G_1 که وابسته به غلظت پروتئین سیکلین نقطه‌ای میانی G_1 می‌باشد به میزان قابل توجهی توسط میزان مواد غذایی تنظیم می‌شود.

هنگامی که به اندازه کافی سیکلین نقطه میانی G_1 از mRNAی خود سنتز شد، کمپلکس CDK با سیکلین نقطه میانی G_1، دو فاکتور رونویسی SBF و MBF را فسفریله می‌کند که سبب فعال شدنشان می‌شود. این فاکتورها سبب رونویسی از ژن‌های سیکلین اواخر G_1 یعنی CLN1 و CLN2 را القاء می‌کنند که پروتئین‌های آنها ورود به فاز S را شدت می‌بخشند. لذا گمان می‌رود تنظیم ترجمه mRNAی CLN3 در پاسخ به غلظت مواد غذایی در محیط کشت، عامل اولیه در کنترل طول دوره G_1 در ساکارومایسیس سرویزیه می‌باشد. علاوه بر سیکلین G_1 تأخیری فاکتورهای MBF و SBF سبب تحریک رونویسی چندین ژن دیگر که برای همانندسازی مورد نیاز است نیز می‌شوند. این ژن‌ها شامل ژن‌هایی هستند که زیرواحدهای DNA پلیمراز، زیرواحدهای RPA (پروتئین‌هایی که در یوکاریوت به DNA تک رشته‌ای متصل می‌شوند)، DNA لیگاز و آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز دئوکسی‌ریبونوکلئوتید را رمزدهی می‌کنند.

یکی از مهمترین سوبستراهای کمپلکس CDK سیکلین اواخر G_1 پروتئین Cdh1 است. به خاطر آورید که این فاکتور APC/C را به سمت پلی یوبی کوئیتینه کردن سیکلین نوع B در اواخر آنافاز هدایت می‌کرد که این عمل سیکلین‌های B را برای دستگاه پروتئوزوم نشان‌دار می‌کرد. فسفریلاسیون Cdh1 توسط CDK-سیکلین G_1 سبب می‌شود این پروتئین Cdh1 از کمپلکس



شکل ۲۹ـ۲۰: فعالیت کمپلکس‌های CDK- سیکلین در طی چرخه سلولی پهنای نوارهای رنگی تقریباً متناسب با فعالیت پروتئین کینازهای کمپلکس‌های سیکلین CDK مشخص شده است. ساکارومایسیس سرویزیه تنها یک سیکلین وابسته به کیناز (CDK) که فعالیتش با سیکلین‌های متفاوت کنترل می‌شود را تولید می‌کند. این سیکلین‌ها در طول چرخه سلولی بیان می‌شوند.

APC/C جدا شده و در نتیجه پلی یوبی کوئیتینه شدن بیشتر سیکلین‌های B در طول اواخر G_1 مهار می‌شود (شکل ۱۰ـ۲۰). فاکتور رونویسی MBF که به وسیله‌ی کمپلکس CDK- سیکلین نقطه‌ای میانی G_1 فعال می‌شود، علاوه بر سیکلین‌های اواخر G_1 سبب تحریک رونویسی دو نوع سیلکین B هم می‌شود. به دلیل اینکه کمپلکس‌ها که بین سیکلین‌های نوع B و CDK ی ساکارومایسیس سرویزیه شکل گرفتند برای شروع سنتز DNA مورد نیاز می‌باشند آنها را سیکلین‌های اوایل فاز S می‌نامند. غیرفعال‌سازی Cdh1 به کمپلکس‌های CDK سیکلین فاز S اجازه می‌دهد تا در اواخر G_1 تجمع یابند. فاکتور Cdh1 به وسیله‌ی هم کمپلکس‌های CDK- سیکلین اواخر G_1 و CDK- سیکلین نوع B، فسفریله و غیرفعال می‌شود و لذا در سراسر فاز S، G_2 و فاز M تا اواخر آنافاز یعنی زمانی که فسفاتاز cdc14 فعال شده و فسفات را از Cdh1 برمی‌دارد غیرفعال باقی می‌ماند.

تجزیه مهارکننده فاز S محرک شروع همانندسازی DNA می‌باشد

وقتی هترودیمرهای سیکلین- CDK مرحله S در اواخر G_1 تجمع می‌یابند مستقیماً با اتصال یک مهارکننده که Sic1 نامیده می‌شود، مهار می‌شوند. این پروتئین در اواخر میتوز و در اوایل G_1 بیان می‌شود. چون Sic1 به طور اختصاصی تنها کمپلکس‌های سیکلین- CDK نوع B را مهار می‌کند و روی کمپلکس‌های سیکلین- CDK نوع G_1 اثری ندارد تنها مهارکننده فاز S می‌باشد.

ورود به فاز S با آغاز همانندسازی DNA تعیین می‌شود. در سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه این عمل زمانی رخ می‌دهد که مهارکننده Sic1 تجزیه شود. این عمل بعد از پلی یوبی کوئیتینه شدن Sic1 به وسیله‌ی پروتئین - یوبی کوئیتین لیگاز متفاوت به نام SCF ، صورت می‌گیرد (شکل ۲۸ـ۲۰ و همچنین شکل ۲ـ۲۰ را ملاحظه کنید). هنگامی که Sic1 تجزیه شد، کمپلکس‌های سیکلین CDK فاز S با فسفریلاسیون چندین پروتئین در کمپلکس پیش همانندسازی که به نقطه آغازین همانندسازی متصل می‌باشند همانندسازی DNA را القاء می‌کند. این مکانیسم با فعال کردن کمپلکس سیکلین- CDK فاز S (مهار کردن کمپلکس زمانی که سیکلین در حال سنتز است و پس از آن تجزیه شدن سریع مهارکننده) اجازه می‌دهد تا تعداد زیادی از کمپلکس‌ها به طور ناگهانی فعال شوند. (به جای آنکه فعالیت کینازی به طور تدریجی در نبود مهارکننده با سنتز سیکلین‌های فاز S افزایش یابد).

حال می‌بینیم که تجزیه تنظیم شده توسط پروتئوزوم که به وسیله‌ی

دو کمپلکس پروتئین - یوبی کوئیتین لیگاز، یعنی SCF و APC/C هدایت می‌شود سه گذر مهم و اصلی را در چرخه سلولی کنترل می‌کند: شروع فاز S از طریق تجزیه Sic1 توسط SCF، شروع آنافاز از طریق تجزیه سکورین به وسیله APC/C و خروج از میتوز از طریق تجزیه سیکلین‌های نوع B وابسته به APC/C.

APC/C به وسیله‌ی فاکتور اختصاصیت Cdc20 به سمت پلی یوبی کوئیتینه کردن سکورین مهارکننده در آنافاز هدایت می‌شود (شکل ۲۳-۲۰) کمپلکس APC/C-cdc20 همچنین تجزیه شدن سیکلین‌های فاز S و اغلب سیکلین‌های میتوزی را نیز سبب می‌شود. اما به مقدار کافی سیکلین میتوزی برای حفظ تراکم کروموزوم تا انتهای آنافاز باقی می‌ماند. بنابراین فاکتور اختصاصیت مشخص دیگری (Cdh1)، APC/C را هدف قرار می‌دهد تا سیکلین‌های نوع B باقی بمانند (شکل ۱۰-۲۰). برعکس APC/C، پروتئین - یوبی کوئیتین لیگاز SCF به وسیله‌ی فسفریلاسیون فاکتورهای اختصاصیت تنظیم نمی‌شود و به جای آن توسط فسفریلاسیون سوبسترایش، (Sic1) تنظیم می‌شود. Sic1 به وسیله‌ی سیکلین CDK-G_1های مرحله فسفریله می‌شود (شکل ۲۸-۲۰). این فسفریلاسیون حداقل روی شش جایگاه Sic1 صورت می‌گیرد که این جایگاه‌ها سوبسترای نسبتاً ضعیفی برای کمپلکس سیکلین-CDK مرحله G_1 می‌باشد و این عمل فسفریلاسیون قبل از آن که SCF به خوبی به Sic1 متصل شود و آن را پلی یوبی کوئیتینه کند، صورت می‌گیرد. این تفاوت استراتژی برای تنظیم کردن فعالیت یوبی کوئیتین - پروتئین‌لیگاز SCF و APC/C احتمالاً به این دلیل رخ می‌دهد که APC/C دارای چندین سوبسترا از قبیل سکورین و سیکلین‌های نوع B می‌باشد که باید در زمان‌های مختلف چرخه تجزیه شوند. در مقابل، ورود به فاز S تنها نیازمند تجزیه شدن یک پروتئین (مهارکننده Sic1) است. علاوه بر این نیاز به فسفریلاسیون چندین جایگاه ضعیف در Sic1، شروع فاز S را به تأخیر می‌اندازد تا فعالیت سیکلین- CDK به اوج خود برسد و فسفریلاسیون سایر سوبستراهای سیکلین- CDK مرحله G_1 به پایان برسد. یک امتیاز دیگر استفاده از پروتئولیز برای کنترل کردن مسیر توسط این نقاط بحرانی در چرخه سلولی این است که تجزیه شدن یک عمل غیرقابل برگشت می‌باشد و این اطمینان را می‌دهد که سلول‌ها چرخه سلولی را به طور برگشت‌ناپذیر تنها در یک مسیر طی می‌کنند.

چندین سیکلین فعالیت کینازی CDK ساکارومایسیس سرویزیه را در طی فازهای مختلف چرخه سلولی تنظیم می‌کنند

همچنانکه که سلول‌ها در حال جوانه زدن مخمر در فاز S را پیش می‌روند آنها شروع به رونویسی ژن‌هایی می‌کنند که دوسیکلین دیگر نوع B را رمزدهی می‌کنند. این سیکلین‌ها کمپلکس‌های سیکلین CDK اوایل فاز M و اواخر فاز S را شکل می‌دهند. این کمپلکس‌ها همراه با کمپلکس سیکلین- CDK اوایل فاز S همانندسازی DNA از نقطه آغازی را در سرتاسر فاز S فعال می‌کنند. چون کمپلکس‌های سیکلین CDK اوایل فاز M و اواخر فاز S تشکیل دوک میتوزی را در ابتدای میتوز به کمک دو نوع سیکلین میتوزی دیگر شروع می‌کنند به این اسم نامیده شدند. این سیکلین‌های میتوزی وقتی سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه همانندسازی کروموزوم را کامل کردند و وارد G_2 شدند، بیان می‌گردند. این سیکلین‌ها به عنوان سیکلین‌های اواخر میتوز عمل می‌کنند. به این ترتیب که به CDK متصل می‌شوند تا کمپلکسی که وقایع میتوز را میانجی‌گر می‌کند را تشکیل دهند.

بنابراین هر گروه از سیکلین‌ها، CDKی ساکارومایسیس سرویزیه را به یک عملکرد خاص در ارتباط با فازهای مختلف چرخه سلولی هدایت می‌کند که در شکل ۲۹-۲۰ نشان داده شده است. سیکلین - CDK مرحله میانی G_1، بیان سیکلین‌های اواخر G_1 و پروتئین‌های دیگر مرحله میانی G_1 را به وسیله‌ی فسفریلاسیون و در پی آن فعال کردن فاکتورهای رونویسی SBF و MBF القاء می‌کند. سیکلین - CDKهای مرحله APC/C در G_1 را مهار می‌کنند و به سیکلین‌های نوع B (سیکلین‌های فاز M و S) اجازه تجمع یافتن را می‌دهند. سیکلین - CDK مرحله G_1 تجزیه شدن Sic1 مهارکننده فاز S را نیز سبب می‌شود. در اوایل فاز S کمپلکس‌های سیکلین - CDK موجب سنتز DNA می‌شوند. در اواخر فاز S سیکلین‌ها به‌عنوان سیکلین‌های میتوزی عمل کرده و تشکیل دوک میتوزی را موجب می‌شوند. دو سیکلین باقیمانده از نوع ساکارومایسیس سرویزیه سیکلین‌های میتوزی می‌باشند که غلظتشان در میانه میتوز به بیشترین مقدار خود می‌رسد. این سیکلین‌ها همچنین در تشکیل دوک میتوزی شرکت می‌کنند اما به طور عمده به عنوان سیکلین‌های میتوزی عمل می‌کنند به این صورت که با CDK ایجاد کمپلکس کرده و جدا شدن کروموزوم‌ها و تقسیم هسته را موجب می‌شوند.

همانندسازی در هر نقطه آغازی در طول چرخه سلولی تنها یکبار شروع می‌شود

همانطور که در فصل ۴ بحث شد کروموزوم‌های یوکاریوتی از چندین نقطه آغازی همانندسازی[1]، همانندسازی می‌شوند. شروع همانندسازی از این نقاط در طول مرحله S صورت می‌گیرد و در یوکاریوت‌ها، در طول فاز S تنها یک بار همانندسازی از این نقاط شروع می‌شود. علاوه بر این مرحله S تا آنجا ادامه پیدا می‌کند تا همانندسازی که از نقاط آغازین چندگانه در طول هر کروموزوم شروع شده است باعث همانندسازی کامل در هر کروموزوم شود. این دو عامل یعنی آغاز تنها یکبار همانندسازی از نقاط آغازین و کامل شدن همانندسازی به سلول در طی تکثیر این اطمینان را می‌دهد که تعداد نسخه‌های درستی از ژن‌ها داشته باشد.

نقاط آغازین همانندسازی در مخمر دارای یک توالی ۱۱ جفت بازی حفاظت شده می‌باشد که به یک پروتئین هگزامری متصل می‌باشد (کمپلکس شناسایی‌کننده نقطه آغازین (ORC)[2]). این کمپلکس برای شروع سنتز DNA مورد نیاز می‌باشند، انگشت‌نگاری با استفاده از DNaseI، (شکل ۱۹ـ۷). رسوب‌دهی ایمنی پروتئین‌های کروماتینی (شکل ۳۷ـ۷) متصل به توالی‌های خاصی از DNA در چندین فاز از چرخه سلولی نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها در طی همه فازهای چرخه سلولی متصل به نقاط آغازی باقی می‌مانند. چندین فاکتور شروع همانندسازی دیگر برای آغاز سنتز DNA در نقاط آغازین در ساکارومایسیس سرویزیه به وسیله‌ی مطالعات ژنتیکی شناسایی شده است. فاکتورهای شروع همانندسازی DNA در طول G_1 متصل به ORC باقی می‌مانند اما این فاکتورها در طول G_2 یا M به ناحیه ORC متصل نمی‌باشند. در طول G_1 فاکتورهای شروع متفاوتی به ORC متصل می‌شوند تا یک کمپلکس پیش همانندسازی را در هر نقطه آغازین به وجود آورند (شکل ۳۰ـ۲۰).

محدودیت نقطه آغازین در شروع همانندسازی تنها برای یکبار در هر چرخه سلولی در **ساکارومایسیس سرویزیه** به وسیله چرخه متناوب در میزان فعالیت سیکلین - CDK نوع B از طریق چرخه سلولی اعمال می‌شود. به این صورت که این کمپلکس فعال کمی در تلوفاز از طریق G_1 و فعالیت بالایی در S,G_2 و M از طریق آنافاز پیدا می‌کند. همانطور که ما قبلاً اشاره کردیم کمپلکس‌های فاز S در آغاز سیکلین - CDK مرحله S وقتی مهارکننده ویژه این مرحله یعنی Sic1 تجزیه شد، فعال می‌شود. کمپلکس‌های پیش همانندسازی در نقاط آغازین در اوایل G_1 (شکل ۳۰ـ۲۰، مرحله (۱)) تجمع حاصل می‌کنند و سنتز DNA را در فاز S وقتی که به وسیله‌ی سیکلین - CDK فاز S و پروتئین کیناز هترودیمری دیگر (DDK) فسفریله شدند، شروع می‌کنند. DDK همراه با پروتیئن‌های دیگر که در همانندسازی DNA شرکت می‌کنند در مرحله G_1 بیان می‌شود (مرحله (❷)).

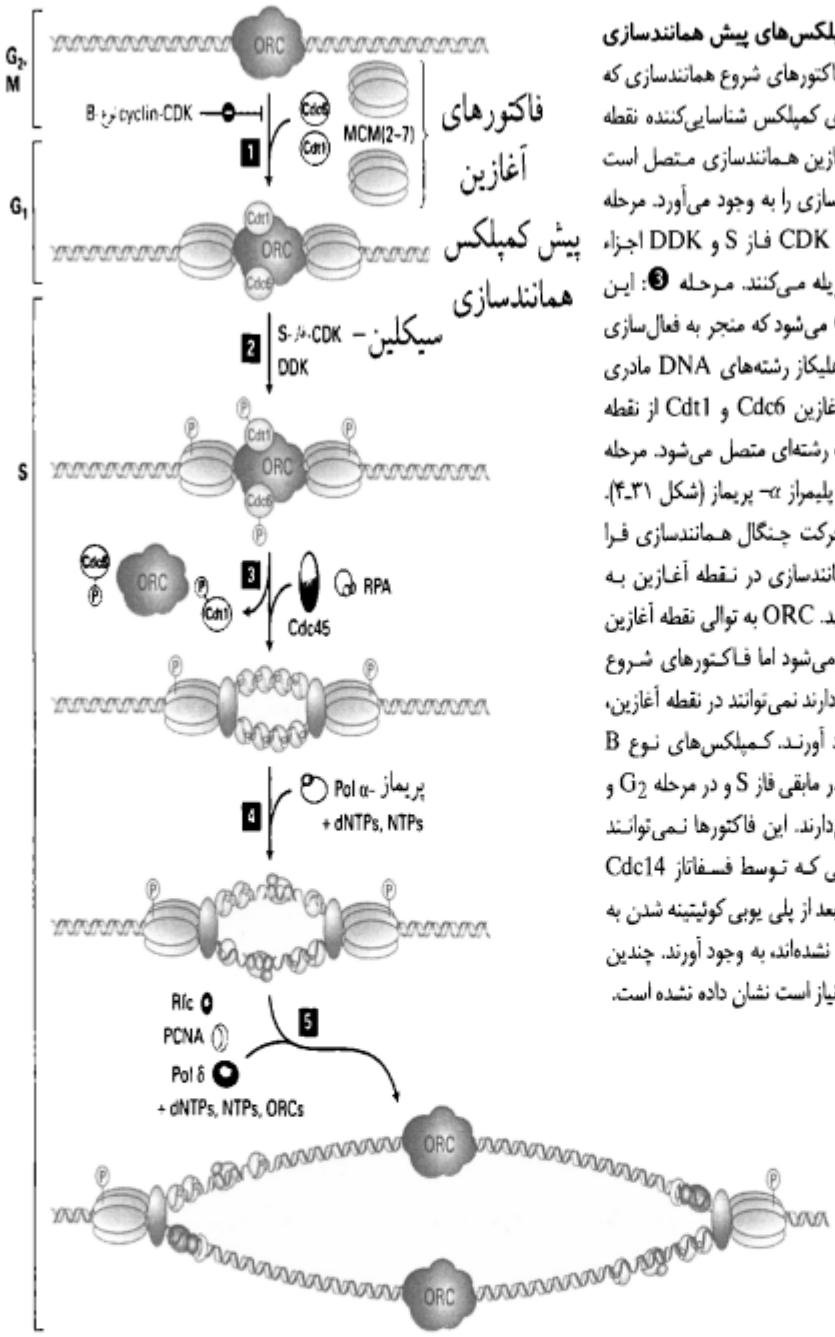
گرچه تمام پروتئین‌هایی که می‌بایست برای فعال کردن سنتز DNA، فسفریله شوند، هنوز مشخص نیستند اما مشخص شده که حداقل، فسفریلاسیون یک زیرواحد از هلیکاز MCM که دارای شش زیرواحد است، و نیز فسفریلاسیون یک فاکتور شروع دیگر به نام Cdc6 برای این امر لازم است. به دنبال فسفریلاسیون این عوامل، هلیکاز DNA را باز می‌کند و DNA تک رشته‌ای حاصل، توسط پروتئین‌های متصل شونده به تک رشته DNA یعنی RPAها و دیگر فاکتورهای همانندسازی اشغال می‌شوند (شکل ۳۰ـ۲۰ مراحل (❸) و (❹) و (❺) و شکل ۳۱ـ۴ را هم ملاحظه نمایید).

هنگامی که چنگال‌های همانندسازی از نقاط آغاز همانندسازی دور می‌شوند، فاکتورهای آغاز فسفریله شده، از کروماتین جدا می‌شوند اما کمپلکس‌های ORC به سرعت به توالی آغاز DNAهای دو رشته‌ای مختصری متصل شده و در تمام چرخه سلولی متصل باقی می‌مانند (شکل ۳۰ـ۲۰ مرحله ❺ را ملاحظه کنید). توالی‌های آغاز فقط یکبار در طول فاز S روشن می‌شوند زیرا فاکتورهای شروع فسفریله شده نمی‌توانند مجدداً به صورت یک کمپلکس پیش همانندسازی تجمع یابند. در نتیجه فسفریلاسیون اجزای کمپلکس پیش همانندسازی توسط سیکلین - CDKهای فاز S و کمپلکس DDK به طور همزمان، آغاز همانندسازی DNA در یک نقطه آغاز را فعال و آغاز مجدد همانندسازی در همان نقطه را مهار می‌نمایند. همانطور که اشاره شد، کمپلکس‌های سیکلین نوع B با -CDK در طول فاز S و G_2 و اوایل آنافاز فعال می‌مانند و حالت فسفریله فاکتورهای شروع همانندسازی که مانع از تجمع کمپلکس‌های جدید همانندسازی می‌شوند را حفظ می‌نمایند (مرحله ❶).

وقتی که Cdc14 فسفاتاز در اواخر آنافاز فعال می‌شود و کمپلکس APC/C-Cdh1 تجزیه تمام سیکلین‌های نوع B را در تلوفاز موجب می‌شود، فسفات‌های روی فاکتورهای آغازی، توسط

1- Replication origin

2- Origin - recognition complex (ORC)



◀ شکل ۳۰ـ۲۰: تجمع و تنظیم کمپلکس‌های پیش همانندسازی

مرحله ❶: در طول ابتدای G_1، فاکتورهای شروع همانندسازی که به صورت غیرفسفریله می‌باشند بر روی کمپلکس شناسایی‌کننده نقطه همانندسازی (ORC) که به نقطه آغازین همانندسازی متصل است تجمع می‌یابند و کمپلکس پیش همانندسازی را به وجود می‌آورد. مرحله ❷: در فاز S، کمپلکس‌های سیکلین- CDK فاز S و DDK اجزاء کمپلکس پیش همانندسازی را فسفریله می‌کنند. مرحله ❸: این فسفریلاسیون منجر به اتصال Cdc45 می‌شود که منجر به فعال‌سازی هلیکاز هگزامر MCM می‌شود. این هلیکاز رشته‌های DNA مادری را باز کرده و موجب جدا شدن فاکتور آغازین Cdc6 و Cdt1 از نقطه آغازین می‌شود. RPA به DNA تک رشته‌ای متصل می‌شود. مرحله ❹: شروع سنتز DNA توسط DNA پلیمراز α- پریماز (شکل ۳۱ـ۴). مرحله ❺ اجزاء دیگر مورد نیاز برای حرکت چنگال همانندسازی فرا خوانده می‌شوند و سنتز دو جهتی همانندسازی در نقطه آغازین به وسیله‌ی هر یک از چنگال‌ها ادامه می‌یابد. ORC به توالی نقطه آغازین در DNA دو رشته‌ای دختری متصل می‌شود اما فاکتورهای شروع همانندسازی که به صورت فسفریله قرار دارند نمی‌توانند در نقطه آغازین، کمپلکس پیش همانندسازی را به وجود آورند. کمپلکس‌های نوع B سیکلین- CDK فاکتورهای آغازین را در مابقی فاز S و در مرحله G_2 و اوایل آنافاز به صورت فسفریله نگه می‌دارند. این فاکتورها نمی‌توانند کمپلکس پیش همانندسازی را تا زمانی که توسط فسفاتاز Cdc14 فسفریله نشده‌اند و سیکلین‌های نوع B بعد از پلی یوبی کوئیتینه شدن به وسیله‌ی APC/C در اواخر آنافاز تجزیه نشده‌اند، به وجود آورند. چندین فاکتور دیگر که برای همانندسازی مورد نیاز است نشان داده نشده است.

Cdc14 فسفاتاز برداشته می‌شوند. این امر موجب تجمع مجدد کمپلکس‌های پیش همانندسازی طی اوایل G_1 می‌شود. همچنانکه قبلاً شرح داده شد، مهار فعالیت APC/C در G_1 باعث تجمع سیکلین‌های فاز S می‌شود که برای شروع فاز S بعدی مورد نیاز هستند. این مکانیسم تنظیمی دو نتیجه دارد: ۱) کمپلکس‌های پیش همانندسازی فقط در طی G_1 و زمانی که فعالیت کمپلکس‌های سیکلین‌های نوع B با CDK- پایین است، تجمع می‌یابند، و ۲) هر نقطه آغاز فقط یک بار در هر فاز S همانندسازی را آغاز می‌کند، (هنگامی که فعالیت کمپلکس سیکلین فاز CDK-S بالا است). در نتیجه DNA کروموزومی فقط یک بار در هر چرخه سلولی همانندسازی می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۵ـ۲۰

سیکلین CDK و یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگاز فاز S را کنترل می‌کنند

■ ساکارومایسیس سرویزیه یک پروتئین کیناز وابسته به سیکلین (CDK) را بیان می‌کند که با سیکلین‌های متعددی طی فازهای مختلف چرخه سلول میانکنش می‌دهد (شکل

۲۹ـ۲۰ را ملاحظه کنید).

■ سه G_1سیکلین در G_1 فعال هستند. غلظت mRNA سیکلین اواسط G_1 طی چرخه سلولی تغییر چشمگیری نمی‌کند اما ترجمه آن با مقدار در دسترس بودن مواد غذایی تنظیم می‌شود.

■ هنگامیکه کمپلکس‌های سیکلین - CDK اواسط G_1 در بین اواسط و اواخر G_1 تجمع می‌یابند، آنها دو فاکتور رونویسی را فسفریله و فعال می‌کنند. این دو فاکتور بیان سیکلین‌های اواخر G_1 و همچنین آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌های مورد نیاز برای همانندسازی DNA، و سیکلین‌های نوع فاز B فاز S را تحریک می‌کنند.

■ کمپلکس‌های سیکلین - CDK اواخر G_1، Cdh_1 را فسفریله و مهار می‌کنند. Cdh_1 فاکتور اختصاصیتی است که کمپلکس پیش برنده آنافاز (APC/C) را به طرف سیکلین‌های نوع B هدایت نموده و بدین ترتیب امکان تجمع سیکلین‌های نوع B فاز S را در اواخر G_1 می‌دهند.

■ کمپلکس‌های سیکلین - CDK فاز S در آغاز بوسیله Sic1 مهار می‌شوند. پلی‌یوبی‌کوئیتینه شدن Sic1 توسط یوبی‌کوئیتین - پروتئین لیگاز SCF، Sic1 را برای تجزیه پروتئوزومی نشاندار نموده و کمپلکس‌های سیکلین - CDK فاز S فعال شده را که آغاز فاز S را شروع می‌کنند، رها می‌نمایند (شکل ۲۸ـ۲۰ را ملاحظه کنید).

■ سیکلین‌های نوع B اواخر فاز S /اوایل فاز M (که بعداً در فاز S بیان می‌شوند) هتردیمرهایی با CDK تشکیل می‌دهند که همانندسازی NDA را پیش رده و باعث شروع تشکیل دوک در اوایل میتوز می‌شوند.

■ سیکلین‌های نوع B اواخر فاز M که در G_2 بیان شده‌اند، هترودیمرهایی با CDK تشکیل می‌دهند که وقایع میتوزی را تحریک می‌کنند.

■ در اواخر آنافاز، فاکتور اختصاصیت Cdh_1 با دفسفریلاسیون فعال شده و سپس APC/C را برای پلی یوبی کوئیتینه کردن همه سیکلین‌های نوع B هدایت می‌کند. در پی آن تجزیه پروتئوزومی آنها، MPF را غیرفعال کرده و امکان خروج از میتوز را می‌دهد (شکل ۱۰ـ۲۰ را ملاحظه کنید).

■ همانندسازی DNA از کمپلکس‌های تجمع یافته در منشأهای همانندسازی طی اوایل G_1، آغاز می‌شود. کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK باعث آغاز همانندسازی از کمپلکس‌های پیش همانندسازی شده و بطور همزمان با فسفریله نمودن اجزاء کمپلکس پیش همانند سازی، از تجمع کمپلکس‌های پیش‌همانندسازی جدید جلوگیری می‌کنند (شکل ۳۰ـ۲۰ را ملاحظه کنید).

■ آغاز همانندسازی DNA در هر کدام از منشأهای همانندسازی (فقط یکبار) اتفاق افتاده و تا آنافاز ادامه می‌یابد، در این مرحله (آنافاز) فعال شدن APC/C منجربه تجزیه سیکلین‌های نوع B می‌شود. بلوکه شدن آغاز مجدد همانندسازی DNA تا جدا شدن کروموزوم‌های همانندسازی شده، تضمین می‌کند که سلول‌های دختر تعداد صحیحی کروموزوم در هر سلول داشته باشند.

۶ـ۲۰ کنترل چرخه سلولی در سلول‌های پستانداران

در موجودات پرسلولی، کنترل دقیق چرخه سلولی در طول رشد و نمو جهت حفظ اندازه و شکل هر بافت، مهم و ضروری است. تکثیر سلولی توسط شبکه‌ای پیچیده‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی کنترل می‌شود. با پیام‌های خارج سلولی براساس هویت و تعداد سلول‌های همسایه و را با پیام‌های داخل سلولی براساس اندازه و برنامه‌ی نموی سلول تداخل می‌کند(فصل ۲۱ و ۲۲). اکثر سلول‌های تمایزیافته در G_1 از چرخه سلولی خارج شده و به مرحله‌ی G_0 وارد می‌شوند (شکل ۱-۲۰). برخی از سلول‌های تمایزیافته (مانند فیبروبلاست‌ها و لنفوسیت‌ها) می‌توانند تحریک شده و مجدداً به چرخه‌ی سلولی وارد شده و تکثیر یابند. اما بسیاری از سلول‌های میتوز یافته و تمایزی، هرگز به چرخه سلولی بازنمی‌گردند و دیگر تکثیر نمی‌شوند. چنان که در این قسمت بحث می‌شود مکانیسم‌های تنظیمی چرخه‌ی سلولی که در مخمرها و در تخم‌ها و جنین‌های زنوپوس وجود دارند، در سلول‌های سوماتیک یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر مانند انسان و دیگر پستانداران نیز عمل می‌کنند.

نقطه‌ی محدودکننده در پستانداران، مشابه استارت در سلول‌های مخمری است

بیشتر مطالعات در زمینه‌ی کنترل چرخه‌ی سلولی در پستانداران توسط سلول‌های کشت شده انجام گرفته که نیاز به فاکتورهای رشد پلی‌پپتیدی خارجی (میتوژن‌ها) برای تحریک تکثیر سلولی دارند. اتصال این فاکتورهای رشد به پروتئین‌های گیرنده اختصاصی که در غشای پلاسمایی قرار گرفته‌اند، آبشار انتقال پیام را آغاز می‌کند که در نهایت بر رونویسی و کنترل چرخه‌ی سلولی تأثیر

می‌گذارد (فصل ۱۵ و ۱۶).

سلول‌های پستانداران که در غیاب فاکتورهای رشد کشت داده شده‌اند، در حالی که کروموزوم‌های دیپلوئید دارند در G_0 متوقف می‌شوند. اگر فاکتورهای رشد به محیط کشت اضافه شوند، این سلول‌های «**خاموش**» از **نقطه‌ی محدودکننده**[1]، ۱۴ تا ۱۶ ساعت بعد می‌گذرند و ۶ تا ۸ ساعت بعد از آن به فاز S وارد می‌شوند و در ادامه‌ی چرخه‌ی سلولی پیش می‌روند (شکل ۲-۲۰). نقطه‌ی محدودکننده، زمانی پس از افزودن فاکتورهای رشد است که در آن دیگر، سلول‌ها برای ورود به فاز S نیاز چندانی به حضور فاکتورهای رشد ندارند. همانند نقطه‌ی استارت در سلول‌های مخمر، نقطه‌ی محدودکننده، نقطه‌ای در چرخه‌ی سلولی است که در آن سلول‌های پستانداران به سمت ورود به فاز S پیش می‌روند و چرخه‌ی سلولی را به پایان می‌رسانند، که این روند در اکثر سلول‌های کشت شده‌ی پستانداران حدود ۲۴ ساعت به طول می‌انجامد.

CDK ها و سیکلین‌های متعددی عبور سلول‌های پستانداران از چرخه‌ی سلولی را تنظیم می‌کنند

برخلاف اسکیزوساکارمایسیس پمبه و ساکارومایسیس سرویزیه، که فقط یک کیناز وابسته به سیکلین (CDK) را جهت تنظیم چرخه‌ی سلولی تنظیم می‌کنند، سلول‌های پستاندازان از خانواده‌ی کوچکی از CDK ها جهت تنظیم پیشروی در چرخه‌ی سلولی استفاده می‌کنند. چهار CDK به میزان‌های مشخصی در اکثر سلول‌های پستانداران بیان می‌شوند و در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش بازی می‌کنند. این CDK ها را CDK_1، CDK_2، CDK_4 و CDK_6 نامیده‌اند که از طریق توانایی کلون‌های cDNA آنها در تکمیل کردن مخمرهای جهش یافته در یک cdc خاص، و یا از روی شباهت آنها با دیگر CDK ها شناخته می‌شوند.

همانند سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه، سلول‌های پستانداران سیکلین‌های متعددی را بیان می‌کنند. سیکلین‌های A و B که در فاز S و G_2 و ابتدای میتوز عمل می‌کنند، در ابتدا هنگام مطالعه‌ی جنین دو موجود دریایی (توتیای دریایی و صدف) به عنوان پروتئین‌هایی که غلظت آن‌ها دچار نوسان می‌شود، شناخته شدند (شکل ۸-۲۰). همتای سیکلین A و سیکلین B در تمام حیوانات پرسلولی که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، پیدا شده است. cDNA های رمزدهی کننده سه به سیکلین مرتبط نوع D انسانی و سیکلین نوع E، براساس توانایی تکمیل سلول‌های ساکارومایسیس سرویزیه جهش یافته در سه ژن رمزکننده‌ی سیکلین‌های G_1، جداسازی شد. مقدار نسبی سه سیکلین نوع D که در انواع مختلف سلول‌ها بیان می‌شوند متفاوت است. در اینجا ما با عنوان سیکلین D از آنها یاد می‌کنیم. سیکلین D و E، به ترتیب، سیکلین‌های اواسط G_1 و اواخر G_1 هستند. آزمایشاتی که در آنها آنتی بادی‌های ضدسیکلین D سلول‌های کشت شده‌ی پستانداران در زمان‌های مختلفی پس از افزودن فاکتورهای رشد تزریق شدند، نشان دادند که سیکلین D برای عبور از نقطه‌ی محدودکننده ضروری است (شکل ۳۱-۲۰).

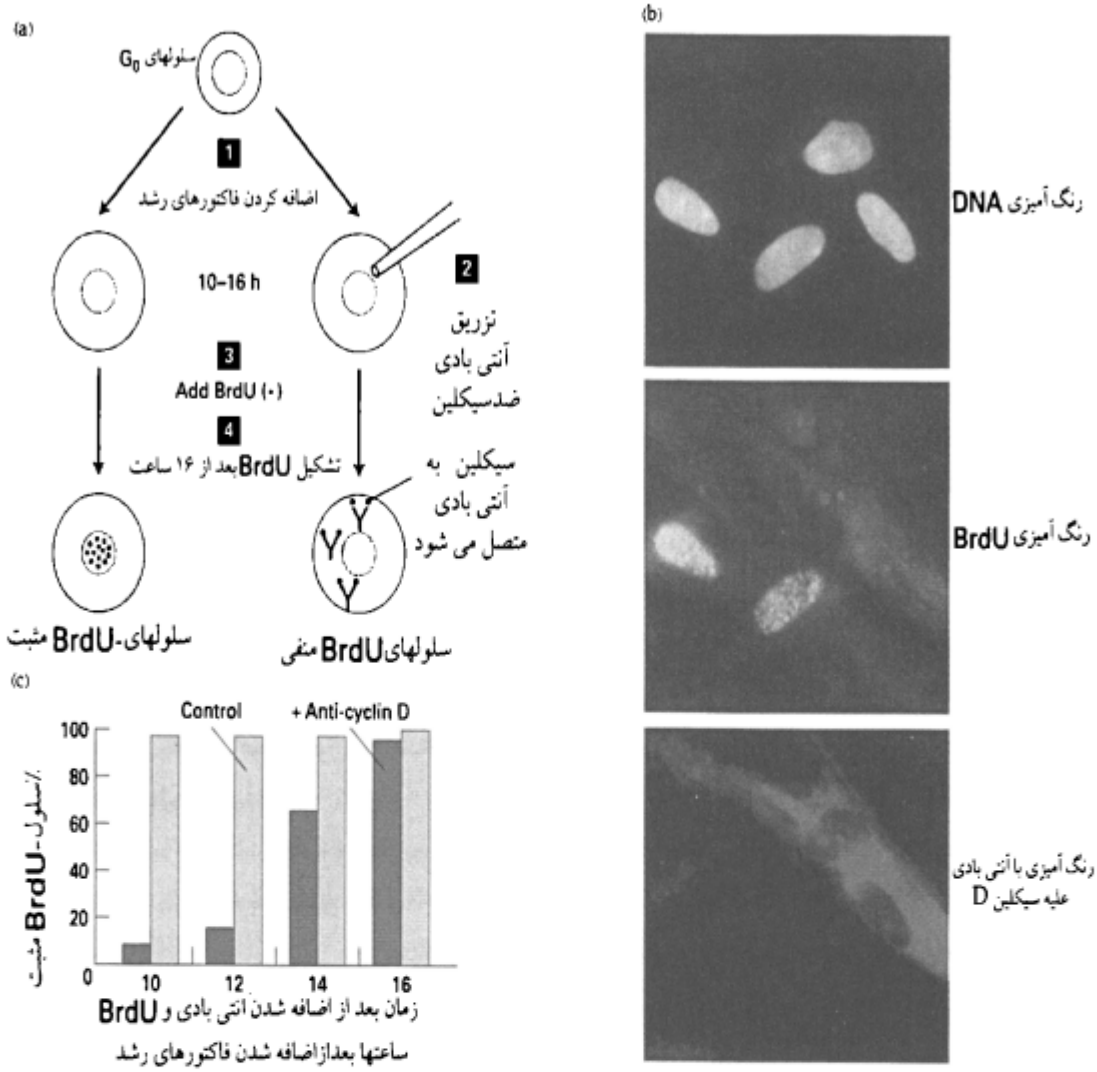
شکل ۳۲-۲۰ یک مدل رایج برای دوره‌های چرخه‌ی سلولی را نشان می‌دهد که در آنها کمپلکس‌های مختلف سیکلین - CDK، در سلول‌های پستانداران متوقف شده در G_0 عمل می‌کنند که باافزودن فاکتورهای رشد تحریک به تقسیم شدند. در غیاب فاکتورهای رشد، سلول‌های کشت شده‌ی G_0 هیچ سیکلین و CDK ی تولید نمی‌کنند. غیاب این پروتئین‌های حیاتی، علت اینکه چرا سلول‌های G_0 در طول چرخه‌ی سلولی پیش نمی‌روند و تقسیم نمی‌شوند را بیان می‌کند.

جدول ۱-۲۰ که پیش‌تر در این فصل نشان داده شد، سیکلین‌ها و CDK های مختلفی را که بیان کردیم و بخش‌هایی از چرخه‌ی سلولی که آنها در آن فعال هستند را خلاصه کرده است. سیکلین‌ها در دو گروه عمده قرار می‌گیرند، سیکلین‌های G_1 و سیکلین‌های نوع B، که در S و G_2 و M عمل می‌کنند. گرچه ممکن نیست که یک ارتباط یک به یک بین عمل سیکلین‌های متعدد و CDK ها در و اسکیزوساکارومایسیس پمبه و ساکارومایسیس سرویزیه مهره‌داران رسم کرد، کمپلکس‌های مختلفی که آنها تشکیل می‌دهند می‌تواند به طور گسترده‌ای برحسب عملکردشان در اواسط G_1، اواخر G_1، S و M مورد توجه قرار گیرند. تمام سیکلین‌های نوع B، یک توالی تخریبی دارند که حفاظت شده بود و توسط پروتئین یوبی کوئیتین لیگاز APC/C - Cdh1 شناسایی می‌شوند، در حالی که سیکلین‌های G_1 این توالی را ندارند. بنابراین APC/C فقط فعالیت کمپلکس‌هایی از سیکلین - CDK را تنظیم می‌کند که سیکلین‌های نوع B را دارند.

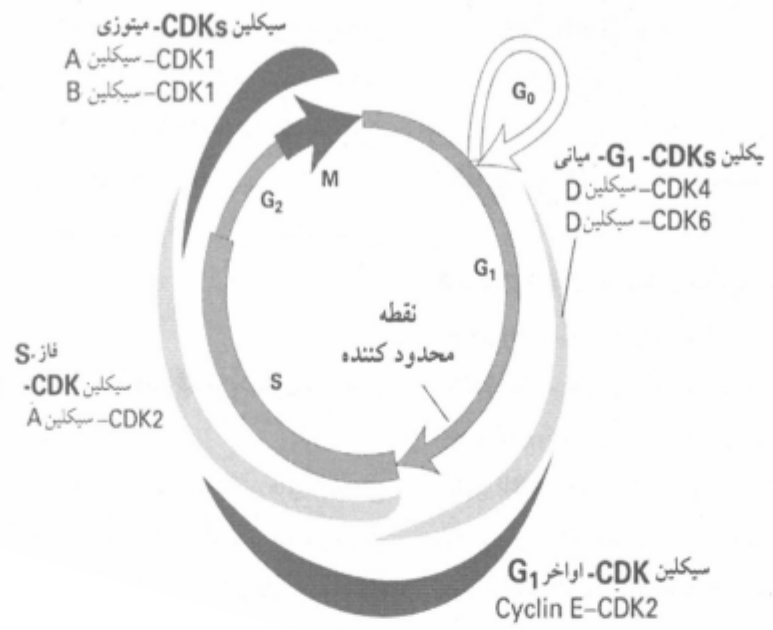
بیان تنظیم شده‌ی دو گروه از ژن‌ها، سلول‌های پستانداران را از G_0 به چرخه‌ی سلولی بازمی‌گردانند

افزودن فاکتورهای رشد به سلول‌های پستانداران که در G_0

1- Restriction point



▲ **شکل تجربی ۳۱-۲۰ (شکل رنگی): آزمایشات تزریق آنتی‌بادی علیه سیکلین D نشان می‌دهد که سیکلین D برای عبور از نقطه‌ی محدودکننده، لازم است.** سلول‌های پستانداران که در G_0 متوقف شده‌اند و در این آزمایش‌ها استفاده شدند، از نقطه‌ی محدودکننده را ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از افزودن فاکتورهای رشد عبور کردند و ۶ تا ۸ ساعت بعد وارد فاز S شدند (a) رئوس مطالب پروتوکل. زمان‌های متفاوتی، ۱۰ تا ۱۶ ساعت پس از افزودن فاکتورهای رشد ❶، به برخی سلول‌ها آنتی‌بادی‌های خرگوشی علیه سیکلین D تزریق شد ❷. بروموئوکسی یوریدین (BrdU)، که یک مشتق تیمیدین است به محیط اضافه شد ❸ و سلول‌های تزریق نشده‌ی کنترل (چپ) و سلول‌های تزریق شده (راست) ۱۶ ساعت دیگر انکوبه شدند. سپس هر نمونه جهت تعیین درصد سلول‌هایی که BrdU به DNA های تازه سنتز شده‌ی آنها وارد شده مورد سنجش قرار گرفتند ❹، این مطلب نشان‌دهنده‌ی این مطلب است که آن سلول‌ها وارد فاز S شده‌اند.(b) آنالیز سلول‌های کنترل و سلول‌های تزریق شده با آنتی‌بادی ضدسیکلین D، ۸ ساعت پس از افزودن فاکتورهای رشد، سه تصویر میکروسکوپ فلورسنت یک زمینه‌ی سلولی را نشان می‌دهند که ۱۶ ساعت پس از افزودن BrdU به محیط رنگ‌آمیزی شده‌اند. سلول‌ها توسط عوامل فلورسنت مختلفی رنگ‌آمیزی شدند، در شکل بالا سلول‌ها با عاملی رنگ‌آمیزی شده‌اند که DNA ی آنها قابل رویت باشد، در شکل وسط BrdU و در شکل پایین با آنتی‌بادی علیه سیکلین D قابل رؤیت شده‌اند. توجه کنید که دو سلولی که به آنها آنتی‌بادی علیه سیکلین D تزریق شده (سلول‌های قرمز رنگ در شکل پایین)، BrdU به DNA هسته‌ای آنها وارد نشده چنان که در شکل وسط رنگی نشده‌اند. (c) درصد سلول‌های کنترل (مستطیل‌های آبی) و سلول‌های مورد آزمایش (مستطیل‌های قرمز) که BrdU به آنها وارد شده است. اکثر سلول‌هایی که آنتی‌بادی ضدسیکلین D دریافت کرده‌اند ۱۲-۱۰ ساعت بعد از افزودن فاکتورهای رشد از ورود به فاز S بازمانده‌اند و این امر از طریق میزان کم ورود BrdU به آنها قابل فهم است. برعکس، آنتی‌بادی‌های ضدسیکلین D که پس از ۱۶-۱۴ ساعت به سلول‌ها اضافه شدند، تأثیر ناچیزی بر ورود به فاز S و همانندسازی DNA داشتند زیرا در این زمان سلول‌ها نقطه‌ی محدودکننده را پشت سر گذاشته‌اند. این نتایج بیان می‌کنند که سیکلین D برای گذر از نقطه‌ی محدودکننده مورد نیاز است، اما هنگامی که سلول‌ها نقطه‌ی محدودکننده را پشت سر می‌گذارند، دیگر نیازی به سیکلین D جهت ورود به فاز S، ۸-۶ ساعت بعد، ندارند.



▲ **شکل ۳۲-۲۰ (شکل رنگی): فعالیت کمپلکس سیکلین - CDKی پستانداران در چرخه‌ی سلولی** سلول‌های کشت شده‌ی متوقف شده در G_1 توسط تیمار با فاکتورهای رشد وادار به تقسیم شده‌اند. پهنای نوارهای رنگی تقریباً متناسب با فعالیت پروتئین کینازی کمپلکس‌های بیان شده است. واژه‌ی «سیکلین D» بیانگر هر سه سیکلین نوع D است.

متوقف شده‌اند باعث تحریک رونویسی چندین ژن می‌شود که اکثر آنها بسته به اینکه چقدر سریع، mRNA آنها ظاهر شود در دو گروه قرار می‌گیرند (ژن‌های پاسخ سریع یا ژن‌های پاسخ تأخیری). رونویسی ژن‌های پاسخ سریع چند دقیقه بعد از افزودن فاکتورهای رشد از طریق آبشارهای انتقال پیام که فاکتورهای رونویسی را در سیتوزول یا هسته تحریک می‌کنند، اتفاق می‌افتد (فصل ۱۶). تعداد زیادی از ژن‌های پاسخ سریع، فاکتورهای رونویسی را رمزدهی می‌کنند، مانند c-Fos و c-Jun، که رونویسی ژن‌های پاسخ تأخیری را تحریک می‌کنند. شکل جهش یافته و تنظیم نشده‌ی c-Fos و c-Jun توسط رتروویروس‌های انکوژنی بیان می‌شوند (فصل ۲۵). کشف این مطلب که فرم‌های فعال شده‌ی رونویسی این پروتئین‌ها (v-Jun و v-Foa) می‌تواند سلول‌های طبیعی را به سلول‌های سرطانی تبدیل کند، منجر به شناسایی اشکال سلولی طبیعی و تنظیم شده این فاکتورهای رونویسی شد.

پس از گذشت ۳۰ دقیقه از افزودن فاکتورهای رشد، غلظت mRNAهای پاسخ سریع افت کرده و در همان سطح می‌ماند تا فاکتورهای رشد از محیط خارج شوند. این کاهش در میزان mRNAهای پاسخ سریع توسط پروتئین‌های پاسخ سریع میانجی‌گری می‌شود.

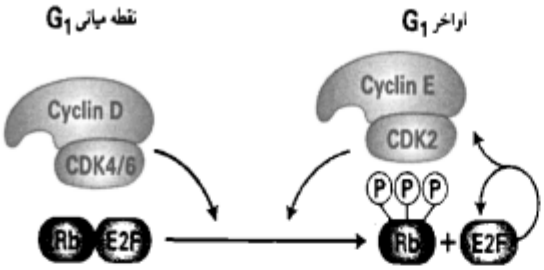
بیان ژن‌های پاسخ تأخیری بستگی به پروتئین‌های رمزدهی شده توسط ژن‌های پاسخ سریع دارد. برخی از ژن‌های پاسخ تأخیری فاکتورهای رونویسی دیگری رمزدهی می‌کنند (پایین را ملاحظه کنید)؛ برخی دیگر، سیکلین‌ها و CDKهای اواسط G_1 و اواخر G_1 را رمز می‌کنند. ابتدا سیکلین‌های اواسط G_1 و CDKهای همراه آنها بیان می‌شوند و به دنبال آن سیکلین‌های اواخر G_1 و CDKهای مربوط به آنها بیان می‌شوند (شکل ۳۲-۲۰). اگر فاکتورهای رشد قبل از عبور از نقطه‌ی محدودکننده برداشته شوند، رونویسی ژن‌هایی که سیکلین‌های G_1 و CDKها را رمزدهی می‌کنند، متوقف می‌شود. از آنجایی که این پروتئین‌ها و mRNAهای رمزکننده‌ی آنها ناپایدار هستند غلظت‌های آنان به سرعت پایین می‌آید. درنتیجه، سلول‌ها، از نقطه‌ی محدودکننده را عبور نکرده و تقسیم نمی‌شوند. علاوه بر کنترل شدن توسط رونویسی ژن‌های رمزدهی‌کننده‌ی سیکلین اواسط G_1 (سیکلین D)، غلظت این سیکلین توسط کنترل ترجمه‌ی mRNAی سیکلین D نیز تنظیم می‌شود. در این مورد، سیکلین اواسط G_1 پستانداران مشابه سیکلین اواسط G_1 در ساکارومایسیس سرویزیه نیز تنظیم می‌شود.

افزودن فاکتورهای رشد به سلول‌های کشت شده‌ی پستانداران باعث آغاز انتقال پیام از طریق مسیر PI-3 کیناز، (که در فصل ۱۶ بحث شد)، شده و منجر به فعال‌سازی مسیر mTOR و فعال‌سازی فاکتورهای آغاز ترجمه می‌گردد (شکل ۳۰-۸). در نتیجه ترجمه‌ی mRNAی سیکلین D و دیگر mRNAها تحریک می‌شود. عواملی که فعال‌سازی فاکتورهای آغاز ترجمه را مهار می‌کنند، مانند TGF-β، ترجمه‌ی mRNA سیکلین D و بنابراین تکثیر سلولی را مهار می‌نمایند.

گذر از نقطه‌ی محدودکننده به فسفریلاسیون پروتئین سرکوب‌گر تومور Rb بستگی دارد

بعضی از اعضای یک خانواده‌ی کوچک فاکتورهای رونویسی وابسته به هم، که به آنها فاکتورهای E2F گفته می‌شود، از طریق ژن‌های پاسخ تأخیری بیان می‌شوند. این فاکتورهای رونویسی، ژن‌هایی را فعال می‌کنند که تعداد زیادی از پروتئین‌های درگیر در سنتز DNA را رمزدهی می‌کنند. آنها، همچنین رونویسی ژن‌های رمزکننده‌ی سیکلین اواخر G_1، سیکلین فاز S و CDK فاز S را تحریک می‌کنند. بنابراین E2Fها در اواخر G_1 مشابه با فاکتورهای رونویسی SBF و MBF در ساکارومایسیس سرویزیه عمل می‌کنند. به علاوه، E2Fها رونویسی ژن‌های خودشان را نیز تحریک می‌کنند. E_2Fها وقتی به پروتئین Rb متصل می‌شوند به عنوان مهارگر آنزیم‌های رونویسی عمل می‌کنند و در عوض Rb به کمپلکس‌های هیستون استیلاز و متیلاز متصل می‌شود. همانطور که در فصل ۷ بحث شد، داستیلاسیون هیستون‌ها و متیلاسیون سرین‌های خاص، هیستون‌ها موجب می‌شود که کروماتین فشرده شود و از نظر رونویسی به حالت غیرفعال درآید.

پروتئین Rb در ابتدا به عنوان محصول پروتیپ ژن **سرکوب‌گر تومور** (RB) شناسایی شد. محصولات ژن‌های سرکوب‌گر تومور به طرق مختلفی پیشروی چرخه‌ی سلولی را مهار می‌کنند (فصل ۲۵). جهش‌هایی که منجر به از دست رفتن عملکرد RB می‌شوند با بیماری **رتینوبلاستومای ارثی** در ارتباط هستند. کودکی با این بیماری یک آلل طبیعی RB^+ از یک والد خود و یک آلل جهش یافته‌ی RB از والد دیگر دریافت می‌کند. اگر آلل RB^+ در یکی از تریلیون‌ها سلول سازنده بدن انسان جهش یابد و به RB^- تبدیل شود آنگاه پروتئین Rb فعالی ساخته نخواهد شد و سلول، یا یکی از سلول‌های حاصل از تقسیم آن به طرف سرطانی شدن پیش می‌رود.



▲ **شکل ۳۳-۲۰(شکل رنگی): تنظیم Rb و فعالیت E2F در اواسط و اواخر G_1.** تحریک سلول‌های G_0 توسط میتوژن‌ها بیان CDK4، CDK6، سیکلین‌های نوع D و فاکتورهای رونویسی E2F، و همه‌ی ژن‌هایی که پروتئین‌های پاسخ تأخیری را رمزدهی می‌کنند را القاء می‌کند. پروتئین Rb ابتدا فعالیت E2F را مهار می‌کند. هنگامی که پیام‌رسانی از طرف میتوژن‌ها ادامه پیدا می‌کند، کمپلکس CDK4/6 - سیکلین D شروع به فسفریلاسیون Rb می‌کند که موجب آزاد شدن مقداری E2F می‌شود. این مقدار E2F رونویسی ژن‌های رمزدهی‌کننده سیکلین CDK2E، و خود E2F (خودالقائی) را القاء می‌کند. کمپلکس CDK2 سیکلین- E پروتئین Rb را بیشتر فسفریله می‌کند که این عمل فیدبک مثبت (پیکان‌های آبی) داشته که منجر به افزایش سریع در بیان و فعالیت E2F و CDK2 - سیکلین هنگامی که سلول به نقطه‌ی گذر $G_1 \rightarrow S$ می‌رسد، می‌شود.

به دلایل نامعلومی این اتفاق در سلول‌های شبکیه می‌افتد و موجب ایجاد تومورهای شبکیه می‌شود، که مشخصه این بیماری است. بعداً کشف شد که عملکرد Rb در تقریباً تمام سلول‌های سرطانی غیرفعال می‌شود، (یا از طریق جهش در هر دو آلل RB و یا از طریق تنظیم غیرطبیعی فسفریلاسیون Rb).

پروتیئن Rb یکی از سوبستراهای مهم کمپلکس‌های سیکلین G_1 - CDK است. فسفریلاسیون Rb در چندین نقطه از این پروتئین، از اتصال آن به E_2Fها جلوگیری می‌کند، بنابراین به E2Fها اجازه می‌دهد که رونویسی ژن‌های مورد نیاز برای ورود به فاز S را فعال کند. همانطور که در شکل ۳۳-۲۰ نشان داده شده است، فسفریلاسیون پروتئین Rb توسط کمپلکس‌های سیکلین - CDK اواسط G_1 آغاز می‌شود. وقتی سیکلین و CDK اواخر G_1 با فسفریلاسیون بخشی از Rbها تحریک می‌شود، کمپلکس سیکلین - CDK اواخر G_1 حاصل شده، Rb را در اواخر G_1 بیشتر فسفریله می‌نماید.

وقتی CDK سیکلین اواخر G_1 تجمع می‌یابد و به غلظت

بحرانی خود می‌رسد، فسفریلاسیون بیشتری روی Rb بوسیله‌ی کمپلکس اواخر G_1 صورت می‌گیرد و این عمل حتی در صورت از دست دادن فعالیت سیکلین -CDK اواسط G_1 نیز ادامه پیدا می‌کند. این فعالیت یکی از عملکردهای اساسی بیوشیمیایی است که مسئول عبور از نقاط محدودکننده است. در این مورد، فسفریلاسیون بیشتر Rb توسط سیکلین -CDK اواخر G_1 حتی در صورت برداشتن و حذف میتوژن‌ها و کاهش غلظت سیکلین - CDK اواسط G_1 صورت می‌گیرد. چون E2F بیان خود و بیان سیکلین اواخر G_1 و CDK را تحریک می‌کند، تنظیم مثبت بیان E2F و - سیکلین CDK اواخر G_1 موجب افزایش سریع در فعالیت این دو کمپلکس در اواخر G_1 می‌شود.

همچنانکه این فاکتورها تجمع می‌یابند سیکلین - CDK فاز S و کمپلکس سیکلین - CDK میتوزی پروتئین Rb را در سراسر فاز G_2 و S و اوایل فاز M در وضعیت فسفریله نگه می‌دارند. بعد از آنکه سلول‌ها آنافاز را به اتمام رساندند و وارد مراحل ابتدایی G_1 یا G_0 می‌شوند کاهش غلظت سیکلین - CDK منجر به دفسفریلاسیون Rb می‌شود. در نتیجه Rb دفسفریله برای مهار فعالیت E2F در طول اوایل G_1 از چرخهٔ بعدی و در سلول‌های متوقف شده در مرحله G_0، وجود دارد.

سیکلین A برای سنتز DNA و CDK1 برای ورود به میتوز مورد نیاز می‌باشد

سطوح بالای E2F ها، رونویسی ژن‌های سیکلین A را در سلول‌های پستانداران فعال کرده و باعث گذر $G_1 \rightarrow S$ می‌شود. (سیکلین A برخلاف نامش، یک سیکلین نوع B می‌باشد، به جدول ۱-۲۰ مراجعه کنید). اختلال در عملکرد سیکلین A در سلول‌های پستانداران باعث ممانعت از سنتز DNA می‌شود که این امر پیشنهاد می‌کند که سیکلین A یک سیکلین فاز S بوده (به همراه CDK2) و ممکن است همچون کمپلکس‌های سیکلین - CDK مربوط به ساکارومایسیس سرویزیه عمل کند و باعث آغاز سنتز DNA شود. همچنین مدارکی وجود دارد که کمپلکس‌های سیکلین CDK - مربوط به G_1 تأخیری[1] در فعال‌سازی کمپلکس‌های پیش همانندسازی نیز شرکت می‌کنند. شایان ذکر است که کمپلکس‌های CDK2 با سیکلین‌های فاز S و G_1 تأخیری همراه هست (شکل ۳۲-۲۰ را ملاحظه نمایید).

۳ پروتئین بازدارندهٔ CDK مرتبط با هم، یا CKI ها ($P21^{CIP}$ و $P57^{KiP2}$ و $P27^{KiP1}$) به نظر می‌رسد که در عملکرد ممانعتی Sic_1 در فاز S مربوط به ساکارومایسیس سرویزیه، سهیم باشند (شکل ۲۸-۲۰ را ملاحظه نمایید). فسفریلاسیون $P27^{KIP1}$ توسط سیکلین - CDK اواخر G (CDK - سیکلین مربوط به G_1 اواخر [انتهای G_1])، آن را برای پلی یوبی کوئیتینه کردن[2] توسط کمپلکس SCF پستانداران نشاندار می‌کند (شکل ۲۸-۲۰ را ببینید). مکانیسم‌های تجزیه $P21^{CIP}$ و $P27^{KIP2}$ کاملاً شناخته نشده است.

فعالیت کمپلکس سیکلین - CDK2 پستانداران نیز از طریق مکانیسم‌های فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون مشابه با آنچه که فاکتور فعال‌کننده میتوز[3] در اسکیزوساکارومایسیس پمبه را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌گردد (شکل ۱۴-۲۰ را ملاحظه کنید).

cdc25A فسفاتاز که فسفات ممانعت‌کننده را از روی CDK2 برمی‌دارد معادل cdc25 موجود در پستانداران هست با این تفاوت که در گذر $G_1 \rightarrow S$ بیشتر از گذر $G_2 \rightarrow M$ عمل می‌کنند. فسفاتاز پستانداران در حالت عادی در انتهای G_1 فعال می‌شود ولی در پاسخ سلول‌های پستانداران به آسیب DNA برای جلوگیری از ورود سلول‌ها به فاز S غیرفعال می‌شود (بخش ۷-۲۰ را ملاحظه نمایید).

زمانی که سیکلین ـ CDK ی مربوط به اواخر G_1 ـ تأخیری و سیکلین ـ CDK ی مربوط به فاز S توسط Cdc25A فعال شدند و مهار کننده‌های فاز S از کار افتادند، همانندسازی DNA در کمپلکس‌های پیش همانندسازی آغاز می‌شود. گفته می‌شود مکانیسم عمومی همسو با چیزی است که در ساکارومایسیس سرویزیه رخ می‌دهد (شکل ۳۰-۲۰ را ملاحظه نمایید). (اگرچه تفاوت‌های کوچکی در مورد مهره‌داران پیدا می‌شود). فسفریلاسیون کمپلکس‌های پیش آغاز همانندسازی DNA در مبدأ همانندسازی که توسط سیکلین ـ CDK اواخر فاز G_1 و سیکلین ـ CDK فاز S انجام می‌گیرد، احتمالاً باعث فعال کردن آغاز همانندسازی DNA می‌شود. در مخمر فسفریلاسیون این فاکتورهای آغازی احتمالاً باعث مهار بازآرایی کمپلکس‌های پیش همانندسازی تا زمانی می‌شود که سلول میتوز را سپری کند و این امر به خاطر تضمین این مسئله هست که همانندسازی از هر مبدأ تنها یکبار در طول هر چرخه سلولی انجام می‌گیرد. در متازوآها، یک پروتئین کوچک ثانویه به نام Geminin در مهار بازآغازی در مبدأها فعالیت دارد تا اینکه سلول‌ها یک چرخه سلولی کامل را انجام دهند. Geminin در اواخر G_1

1- Late G_1 2- Polyubiquitination
3- Mitosis - Promoting Factor = MPF

بیان می‌شود. این پروتئین به فاکتورهای آغاز همانندسازی متصل و باعث مهار آنها می‌شود که این فاکتورها همینکه همانندسازی DNA در طول فاز S آغاز می‌شود، از کمپلکس‌های پیش آغازگر رها می‌شوند (شکل ۳۰-۲۰ مرحله ۳) و از این طریق این پروتئین در مهار بازآغازی از یک مبدأ شرکت می‌کند.

Geminin واجد یک جعبه تخریب در انتهای N خود هست که توسط APCLC-Cdh1 شناسایی شده و باعث فسفریلاسیون آن در اواخر آنافاز و از کار افتادن توسط پروتئوزوم‌ها می‌شود. این فرآیند باعث آزاد شدن فاکتورهای آغاز همانندسازی می‌شود که توسط Cdcl4 فسفاتازدفسفریله می‌شوند تا به ORC موجود بر روی مبدأهای همانندسازی متعددی متصل شده و در طول ادامه فاز G_1 کمپلکس‌های پیش آغازگر را تشکیل دهند.

CDK مهم پستانداران در G_2 و میتوز، CDK1 می‌باشد (شکل ۳۲-۲۰ را ملاحظه کنید). این CDK که به شدت با CDK مربوط به ساکارومایسیس سرویزیه مشابه می‌باشد با سیکلین‌های A و B تجمع می‌یابد. mRNA رمزدهی کننده هر دوی این سیکلین‌های پستانداران زمانی که به اووسیت‌های زنوپوس که متوقف شده در G_2، تزریق می‌شوند، می‌توانند باعث پیشروی بلوغ میوزی[1] شوند. این مسئله ثابت می‌کند که این سیکلین‌ها به عنوان سیکلین‌های میتوزی عمل می‌کنند. (شکل ۶-۲۰ را ملاحظه نمایید). در سلول‌های سوماتیک مهره‌داران سیکلین CDK1-A و سیکلین CDK1-B با هم، هم ارز MPF (سیکلین ـ CDK میتوزی موجود در ساکارومایسیس سرویزیه فعالیت می‌کنند: فعالیت کینازی این کمپلکس‌های پستانداران نیز از طریق پروتئین‌های مشابه که فعالیت MPF مربوط به ساکارومایسیس سرویزیه را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌شود. (شکل ۱۴-۲۰ را ملاحظه نمایید). فسفات مهار کننده بر روی CDK1 توسط Cdc25C فسفاتاز برداشته می‌شود که شبیه به فسفاتاز Cdc25 موجود در ساکارومایسیس سرویزیه می‌باشد.

در سلول‌های پستانداران، ابتدا سیکلین B در اواخر فاز S سنتز شده و در طی پیشروی سلول‌ها در طول G_2، غلظت آن افزایش می‌یابد، و در طول متافاز به بالاترین حد خود رسیده و بعد از اواخر آنافاز کاهش می‌یابد. این فرآیند همانند دوره‌های زمانی بیان سیکلین B در سلول‌های چرخه‌ای حاصل از تخم زنوپوس می‌باشد. (شکل ۹-۲۰ را ملاحظه کنید). در سلول‌های انسانی، سیکلین B ابتدا در سیتوزول انباشته شده و سپس درست قبل از اینکه پوشش هسته به درون ER در میتوز کشیده شود، وارد هسته می‌گردد.

بنابراین فعالیت MPF نه تنها توسط فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون کنترل می‌شود، بلکه از طریق تنظیم ورود آن به درون هسته هم صورت می‌گیرد، در واقع سیکلین B بین سیتوزول و هسته رفت و آمد می‌کند و تغییر در جایگیری آن در طول چرخه سلولی از تغییر در سرعت‌های ورود و خروج آن ناشی می‌شود، همانند تخم‌های زنوپوس و ساکارومایسیس سرویزیه، سیکلین‌های A و B در طول اواخر آنافاز توسط کمپلکس APC/C-Cdh1 پلی یوبی کوئیتینه شده و سپس توسط پروتئوزوم‌ها از کار می‌افتند (شکل ۱-۲۰ را ملاحظه کنید).

دو نوع از مهارکننده‌های سیکلین ـ CDK در پستانداران در کنترل چرخه سلولی شرکت می‌کنند:

همانطور که در بالا اشاره شد سه CKI وابسته به هم (شامل $P57^{KIP2}$ / $P27^{KIP1}$ و $P57^{KIP2}$) باعث مهار فعالیت سیکلین ـ CDK مربوط به اواخر G_1 و سیکلین ـ CDK مربوط به فاز S شده و باید قبل از آنکه همانندسازی DNA بتواند شروع شود، از کار بیافتند. این پروتئین‌های مهار کننده CDK مشابه، همچنین می‌توانند به سایر کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK پستانداران که در کنترل چرخه سلولی شرکت دارند متصل شده و باعث مهار آن‌ها شوند. همانطور که بعداً اشاره خواهد شد $P27^{KIP1}$ در پاسخ سلول‌های پستانداران به آسیب DNA نقش دارد. آزمایشات انجام گرفته در مورد موش‌های Knockout شده در $P27^{KIP1}$ نشان می‌دهد که این CKI دارای اهمیت ویژه‌ای در کنترل عمومی تکثیر سلولی،به محض تولد می‌باشد. گرچه این موش‌هایی که فاقد ژن $P27^{KIP1}$ هستند بیشتر از موش‌های طبیعی هستند معمولاً بطور جداگانه‌ای تمایز می‌یابند.(در مقابل، موش‌هایی که ژن $P57^{KIP1}$ در آن‌ها تخریب شده است نقایصی را در تمایز سلولی نشان می‌دهند و اغلب مدت کوتاهی بعد از تولد می‌میرند که این امر به دلیل رشد ناقص اندام‌های مختلف می‌باشد).

دسته دوم مهارکننده‌های سیکلین ـ CDK، *INK4*ها خوانده می‌شوند (مهار کننده‌های کیناز ۴) که شامل چندین پروتئین مرتبط به هم هست که تنها با CDKهای اواسط G_1، CDK4 و CDK6 میانکنش داده و بنابراین به طور اختصاصی در کنترل فاز اواسط G_1 عمل می‌کنند. اتصال INK4ها به CDK4 و CDK6 مانع از میانکنش آنها با سیکلین D شده و لذا از فعالیت پروتئین کینازی آنها

1- Meiotic maturation

ممانعت می‌کند. در نتیجه کاهش فسفریلاسیون پروتئین Rb باعث ممانعت از فعالیت رونویسی توسط E2Fها و ورود به فاز S می‌شود. یکی از INK4ها به نام p16 همانند پروتئین Rb یک سرکوب‌گر تومور p16 می‌باشد که بعداً به آن اشاره خواهد شد. حضور دو آلل جهش یافته p16 در بخش بزرگی از سرطان‌های انسانی دال بر اهمیت نقش p16 در کنترل چرخه سلولی می‌باشد (فصل ۲۵).

نکات کلیدی بخش ۶-۲۰

کنترل چرخه سلولی در سلول‌های پستانداران

■ فاکتورهای رشد پلی‌پپتیدی متعددی به نام میتوژن‌ها، سلول‌های کشت داده‌شده پستانداران را تحریک می‌نمایند تا با القاء بیان ژن‌های پاسخ اولیه تکثیر یابند. بسیاری از این ژن‌ها فاکتورهای رونویسی را رمزدهی می‌کنند که بیان ژن‌های پاسخ تأخیری را تحریک می‌کنند. ژن‌های پاسخ تأخیری، CDKهای G_1، سیکلین‌های G_1 و فاکتورهای رونویسی E2F را رمزدهی می‌کنند.

■ هنگامیکه سلول‌ها از نقطه محدودکننده عبور کردند آنها می‌توانند به فاز S وارد شده و در غیاب فاکتورهای رشد، فاز S، G_2 و میتوز را کامل کنند.

■ سلول‌های پستانداران از CDKها و سیکلین‌های مختلفی برای تنظیم عبور از چرخه سلولی استفاده می‌کنند. سیکلین CDK4-D و سیکلین CDK6-D از اواسط تا اواخر G_1 سیکلین CDK2-E در اواخر G_1 و اوایل S، سیکلین CDK2-A در S و سیکلین CDK1-A و سیکلین CDK1-B در G_2 و M طی آنافاز عمل می‌کنند (شکل ۳۲-۲۰ را ملاحظه کنید).

■ پروتئین Rb فسفریله شده به E2Fها متصل شده و آنها را به مهارگر رونویسی تبدیل می‌کند. فسفریلاسیون Rb بوسیله سیکلین - CDK اوایل G_1 E2Fها را آزاد می‌کند تا رونویسی ژن‌های رمزدهی کننده سیکلین اواخر G_1 و CDK و همچنین سایر پروتئین‌های مورد نیاز برای فاز S را فعال می‌کند. E2Fها رونویسی ژن‌های خودشان را نیز تحریک می‌کنند.

■ سیکلین - CDK اواخر G_1، Rb را بیشتر فسفریله کرده و E2F را بیشتر فعال می‌کند. هنگامیکه مقدار بحرانی از سیکلین - CDK اواخر G_1 بیان شود یک حلقه پس نورد مثبت با E2F باعث افزایش سریع فعالیت هر دو شده و سبب عبور از نقطه محدودکننده می‌شود (شکل ۳۳-۲۰ را ملاحظه کنید).

■ فعالیت سیکلین - CDK (که با فعالیت بالای E2F القاء می‌شود) بوسیله CKIها (همانند یک مهارکننده فاز S عمل می‌کند) و فسفات مهاری بر روی CDK2 (CDK فاز S) تحت کنترل قرار می‌گیرد. تجزیه پروتئوزومی مهارکننده‌ها و فعال‌سازی فسفاتاز Cdc25A هنگامیکه سلول‌ها از گذار G_1-S می‌گذرند سیکلین - CDK فاز S فعال را می‌سازد به همراه سیکلین - CDK اواخر G_1، این کمپلکس، کمپلکس‌های پیش همانندساری فعال را می‌کند تا سنتز DNA شبیه به مکانیسم ساکارومایسیس سرویزیه شروع نماید.

■ سیکلین CDK1-A و سیکلین CDK1-B وقایع میتوزی را در اوایل آنافاز القاء می‌کند. سیکلین‌های A و B بوسیله کمپلکس پیش‌برنده آنافاز (APC/C) در طی اواخر آنافاز پلی یوبی‌کوئیتینه شده و سپس با پروتئوزوم تجزیه می‌شوند.

■ فعالیت کمپلکس‌های سیکلین - CDK میتوزی بوسیله فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون مشابه با مکانیسم موجود در اسکیزوسکارومایسیس پمبه که در آن فسفات‌های مهاری بوسیله Cdc25c برداشته می‌شوند (شکل ۱۴-۲۰ را ملاحظه کنید) تنظیم می‌گردند.

■ فعالیت‌های کمپلکس‌های سیکلین - CDK پستانداران نیز بوسیله مهارکننده‌های CDK (CKIها) (که به هر کدام از کمپلکس‌های سیکلین - CDK متصل شده و آنها را مهار می‌کنند) و پروتئین‌های INK4 (گذار از G_1 را با مهار اختصاصی CDKهای G_1 یعنی CDK4 و CDK6 بلوکه می‌کند) تنظیم می‌شوند.

۷-۲۰ نقاط کنترلی در تنظیم چرخه سلولی

پیش از پرداختن به این بحث بگذارید مروری بر مراحل اصلی در چرخه سلولی یوکاریوت‌ها داشته باشیم که در شکل ۳۴-۲۰ خلاصه شده است. در چرخه پیوسته سلولی، کمپلکس‌های سیکلین - CDK در G_1 ابتدایی حضور ندارند. فاکتورهای هیپوفسفریله شده آغاز همانندسازی DNA، برای اتصال به کمپلکس‌های ORC در مبدأ شروع همانندسازی، آزاد هستند که این اتصال باعث ایجاد کمپلکس‌های پیش همانندسازی می‌شود و تا زمانی که توسط یک سیکلین - CDK مربوط به فاز S فسفریله شوند، غیر فعال خواهند

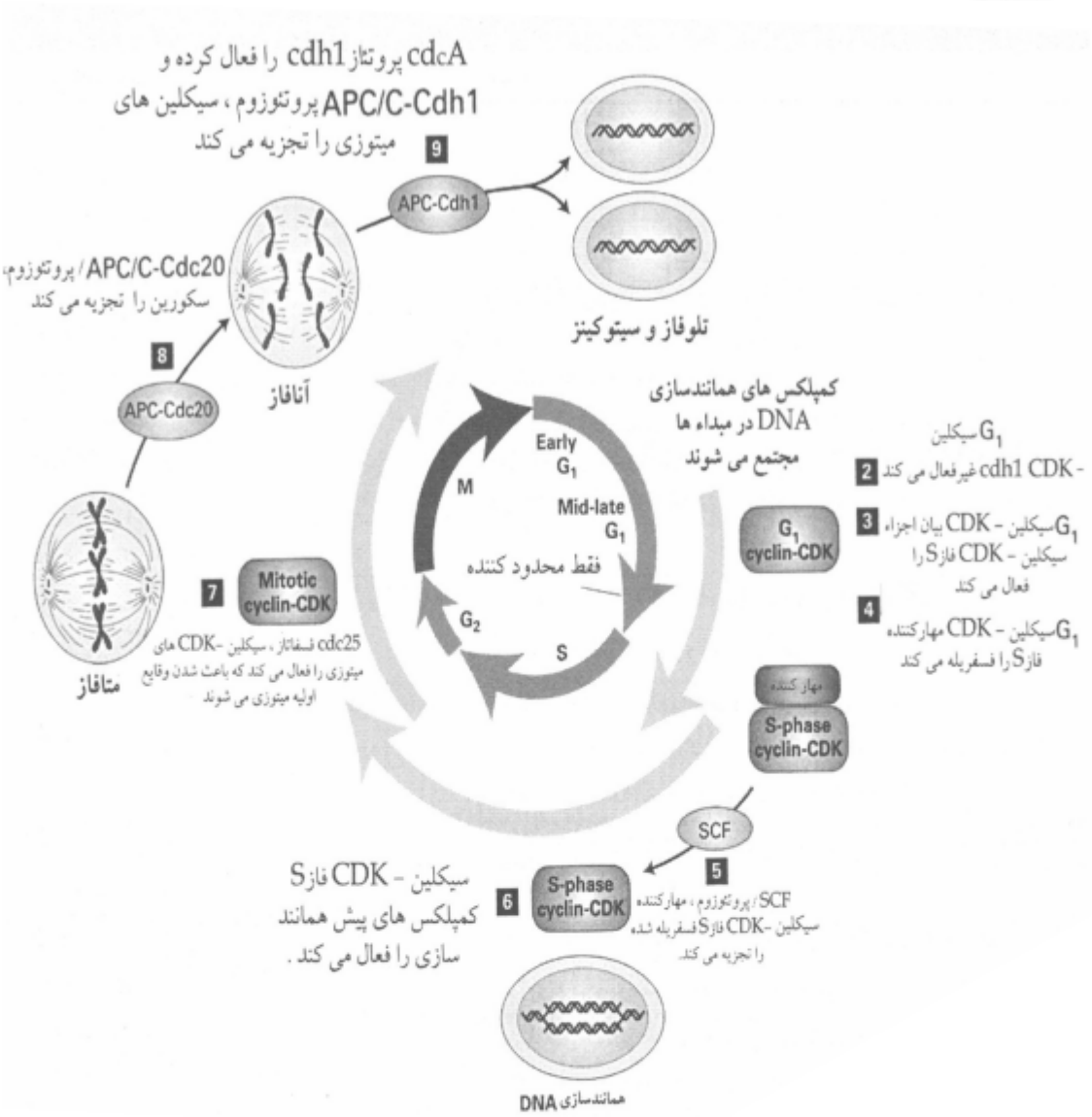
بود. (مرحله ❶). در اواسط G_1، سیکلین ـ CDKهای اواسط G_1 بیان شده و فاکتور تشخیصی APC/C یعنی cdh1 را فسفریله کرده و باعث غیر فعال شدن آن شده و اجازه می‌دهند که سیکلین‌های نوع B تازه ساخته شده (و Geminin در مهره داران) زمانی که بیان می‌شوند، تجمع یابند (مرحله ❷). ـ سیکلین ـ CDKهای اواسط G_1 همچنین باعث فسفریلاسیون فاکتورهای اختصاصی رونویسی می‌شوند و باعث فعالسازی بیان سیکلین‌های اواخر G_1 و فاز S (و CDK در سلول‌های سوماتیک مهره‌داران) می‌شوند (مرحله ❸). با وجود این، به موازات بیان سیکلین‌های نوع B، فوراً مهار کننده‌ها به آنها متصل می‌شوند. زمانی که فعالیت سیکلین -CDKی مربوط به G_1 به بالاترین حد خود می‌رسد باعث فسفریلاسیون این مهار کننده‌ها در چندین جایگاه شده (مرحله ❹) و در واقع باعث نشانه گذاری آنها برای پلی یوبی کوئیتینه شدن توسط SCF یوبی کوئیتین ـ پروتئین لیگاز و متعاقب آن تجزیه شدن با پروتئوزوم‌ها می‌شوند (مرحله ❺).

این تجزیه سریع مهار کننده‌های سیکلین ـ CDK مرحله S باعث فعالیت‌های سیکلین ـ CDK فاز S می‌شود که جایگاهای کلیدی تنظیم در کمپلکس‌های پیش همانندسازی را فسفریله کرده و باعث تحریک آغاز همانندسازی DNA در چندین مبدأ می‌شود. (مرحله ❻). سیکلین ـ CDKهای میتوزی در اواخر فاز S و G_2 بیان می‌شوند. زمانی که همانندسازی DNA تکمیل شد اینها توسط Cdc25 فسفاتاز فعال شده و یا اینها و یا سایر پروتئین کینازهایی که اینها فعال کرده‌اند باعث فسفریلاسیون جایگاه تنظیم خاص در بیش از یک صد پروتئین شامل هیستون H_1، کاندنسین‌ها[۱]، کوهسین‌ها[۲]، پروتئین‌های وابسته به کروماتین، پروتئین‌های وابسته به میکروتوبول‌ها و پروتئین‌های کمپلکس منافذ هسته‌ای می‌شوند. این فسفریلاسیون چندتایی و اختصاصی وقایع اولیه میتوز که عبارتند از تراکم کروموزوم‌ها، تغییر شکل میکروتوبول‌ها به صورت دستگاه دوک میتوزی (در گیاهان و جانوران)، باز جذب پوشش هسته‌ای به درون ER. (مرحله ❼) را القاء می‌کند.

هنگامیکه که کینه توکورهای هر کدام از کروماتیدهای خواهری در طی متافاز به فیبرهای دوک میکروتوبولی متصل شدند، مهارکننده‌گر فاکتور تشخیص cdc20 برداشته می‌شود. این کار به ApC/C-cdc20 فعال و پلی یوبی کوئیتینه و تجزیه پروتئوزومی سکورین[۳] منجر می‌شود (مرحله ❽). تجزیه سکورین باعث فعالیت پروتئولیتیکی سپاراز می‌شود که سپس باعث شکست حلقه‌های کوهسین در سانترومرها[۴] که کروماتیدهای خواهری را کنار هم نگه داشته‌اند، می‌شود. پس از آن نیروی ناشی از دستگاه دوک میتوزی باعث کشیده شدن کروماتیدهای خواهری جدا شده در جهت خلاف هم به سوی قطب‌های دوک می‌شود. نتیجه این فرآیند جداشدن تمام کروماتیدهای خواهری است که بیانگر آغاز آنافاز می‌باشد. همینکه کروموزوم‌های دختری با موفقیت جدا شدند و اطمینان حاصل شد که جداسازی تمام کروموزوم‌ها به سلول‌های دختری در طول سیتوکینز به طور مساوی صورت گرفته است، فسفاتاز Cdc14 فعال می‌شود. Cdc14 فاکتور تشخیص APC/C (cdh1) را فسفریله و فعال می‌کند. و این امر منجر به پلی یوبی کوئیتینه شدن و تجزیه پروتئوزومی تمامی سیکلین‌های نوع B (و Geminin در مهره‌داران) و متعاقب آن حذف فعالیت MPF می‌شود (مرحله ❾). جایگاه‌های موجود بر روی چندین پروتئین که با سیکلین ـ CDKها فسفریله می‌شوند، توسط Cdc14 دفسفریله می‌گردند. این عمل باعث بازگشت پروتئین‌ها به عملکرد اینترفازی‌شان شدن و منجر به باز شدن (غیر متراکم شدن) کروموزوم‌ها، تشکیل یک اسکلت سلولی اینترفازی میکروتوبولی با یک مرکز منفرد سازماندهی میکروتوبولی، و بازآرایی پوشش هسته‌ای در طول تلوفاز می‌شود در پی آن سیتوکنیز انجام می‌گیرد. سپس فاکتورهای آغاز همانندسازی DNAی دفسفریله شده (آزاد شده توسط تجزیه یا Geminin در مهره‌داران)، کمپلکس‌های پیش آغازی را روی کمپلکس‌های ORC متصل به مبدأهای همانندسازی در سلول‌های دختر بازآرایی کرده و آماده چرخه سلولی دیگری می‌شوند (مرحله ❶).

تکمیل موفق چرخه سلولی نیازمند چندین مورد کلی هست. هر کدام از فرآیندهای خلاصه شده در شکل ۳۴-۲۰ قبل از رخ دادن مراحل بعدی باید به طور کامل انجام شوند و مراحل باید که در یک نظم و ترتیب صحیح انجام گیرند. در صورتی که پیش از تکمیل دقیق مرحله قبلی، سلول‌ها وارد فاز بعدی چرخه سلولی شوند این امر می‌تواند منجر به یک آسیب ژنتیکی فاجعه بار شود. به عنوان مثال، زمانی که سلول‌های فاز S توسط ادغام با سلول میتوزی وادار به ورود به میتوز می‌شوند، MPF موجود در سلول میتوزی باعث القاء متراکم شدن کروموزوم‌های سلول در فاز S می‌شود. این ورود پیش از بلوغ به میتوز منجر به قطعه قطعه شدن کروموزوم‌های فاز S می‌شود که نتیجه فاجعه‌آمیزی برای سلول خواهد داشت.

1- Condensins
2- Cohesins
3- Securin
4- Centromeres



▲ **شکل ۳۴-۲۰ فرآیندهای اساسی در چرخه سلولی یوکاریوت‌ها** (برای توضیح به متن مراجعه کنید).

مثال دیگر در مورد اهمیت ترتیب وقایع در چرخه سلولی مربوط هست به اتصال کینه توکورها به میکروتوبول‌ها دوک میتوزی در طول متافاز هست، اگر پیش از آنکه کینه توکورهای یک کروموزوم همانند سازی شده به میکروتوبول‌های قطب‌های مخالف دوک متصل شوند، آنافاز آغاز گردد، سلول‌های دختری حاصل دارای کروموزوم‌های کمتر و یا بیشتر خواهند بود. چنین فرآیندی جدانشدگی [1] نامیده می‌شود. زمانی که غیرجدانشدگی در سلول‌های میتوزی اتفاق افتد، می‌تواند باعث تنظیم غلط ژن‌ها و در ادامه باعث ایجاد سرطان شود.

زمانی که غیرجدانشدگی در طول یک تقسیم میوزی که باعث تولید تخم انسانی می‌شود. اتفاق افتد، می‌تواند باعث ایجاد سندرم داون از تریزومی کروموزوم ۲۱ شود که منجر به غیر طبیعی بودن تکوینی و عقب افتادگی ذهنی می‌شود. مکانیسم‌های دیگری نیز می‌تواند باعث ایجاد تریزومی گردد (تریزومی برای هر کدام از کروموزوم‌های انسانی می‌تواند اتفاق بیافتد اما برای همه کروموزوم‌ها، غیر از کروموزوم ۲۱ این امر باعث مرگ جنین و یا مرگ در مدت کوتاهی بعد از تولد می‌شود).

دیدیم که چگونه پیشروی چرخه سلولی تحت تأثیر تنظیم دقیق فعالیت‌های چندین کمپلکس سیکلین ـ CDK صورت می‌پذیرد. جدول ۲-۲۰ انواع مختلفی از تنظیم کننده‌های فعالیت سیکلین ـ CDK را خلاصه کرده است. وقایع کلیدی چرخه سلولی،

1- Nondisjunction

جدول ۲-۲۰ تنظیم‌کننده‌های فعالیت سیکلین-CDK

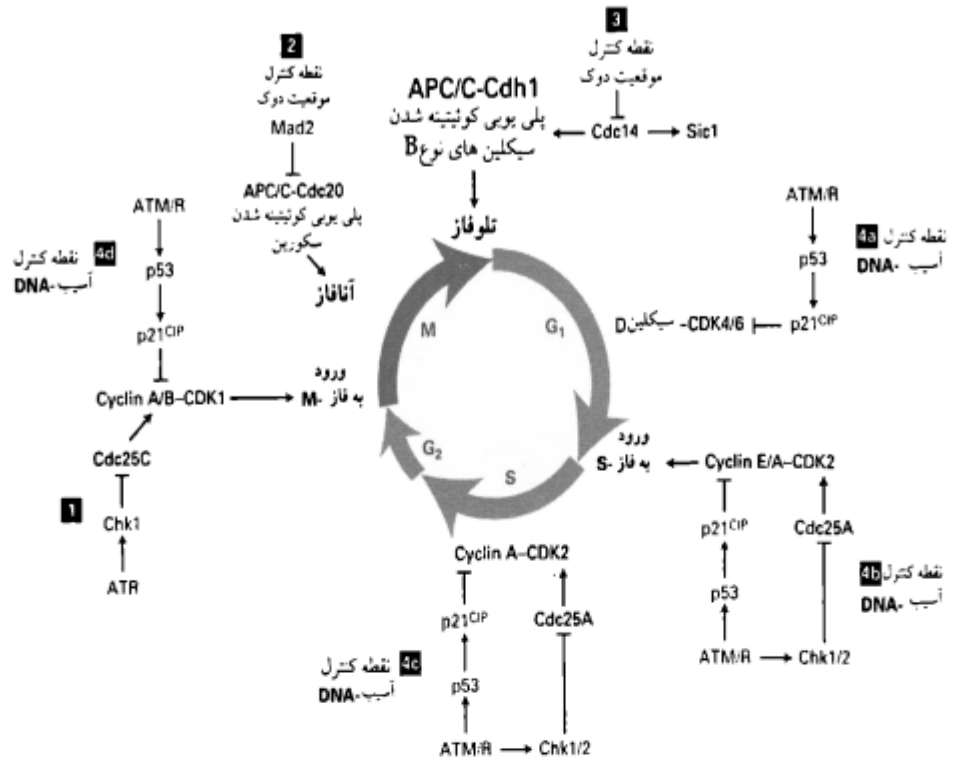
نوع تنظیم‌کننده	عملکرد
کینازها و فسفاتازها	
CAK کیناز	سیکلین-CDKها را فعال می‌کند
Weel کیناز	سیکلین-CDKها را مهار می‌کند
Cdc25 فسفاتاز	سیکلین-CDKهارا فعال می‌کند
Cdc14 فسفاتاز	Cdh1 را فعال می‌کند تا سیکلین-CDK میتوزی را مهار می‌کند
Cdc25A فسفاتاز	سیکلین-CDK فاز S مهره‌داران را فعال می‌کند
Cdc25C فسفاتاز	سیکلین -CDK میتوزی مهره‌داران را فعال می‌کند
Atm/ATR کینازها	نقطه کنترل را کنترل می‌کند، Chk1/Chk2 کینازها را فعال می‌کند
Chk1/Chk2 کینازها	نقطه کنترل را کنترل می‌کند، فسفاتازهای Cdc25A و Cdc25C را غیرفعال می‌نماید تا متوقف چرخه سلولی را القاء کند.
پروتئین مهاری	
Sic1	به سیکلین-CDKهای فاز S متصل شده و آن را مهار می‌کند
$p21^{CIP}$ و $p51^{KIP2}$ و $CKISp27^{KIP1}$	به سیکلین-CDK متصل و آنها را مهار می‌کند.
INK4	به CDKهای G_1 میانی متصل و آنها را مهار می‌کند
Mad2	نقطه کنترل تجمع دوک را کنترل می‌کند، به Cdc20 متصل شده و مانع شروع آنافاز می‌شود، غیرفعال نمود از سیکلین-CDKهای نوع B
Rb	به E2Fها متصل می‌شود. مانع رونویسی چندین ژن چرخه رونویسی می‌شود
یوبی کوئیتین - پروتئین لیگازها	
SCF	تجزیه sic1 فسفریله یا $p27^{KIP1}$ تا سیکلین-CDKهای فاز S را فعال می‌کند
APC/C+Cdc20	القا تجزیه سکورین، شورع آنافاز، القاء تجزیه جزئی سیکلین‌های نوع B
APC/C+Cdh1	تجزیه کامل سیکلین‌های نوع B را القاء می‌نماید تا تلوفاز شروع شود، و geminin را در متازوآها القا می‌کند تا امکان کمپلکس‌های پیش همانندسازی روی منشاء همانندسازی DNA فراهم گردد.

همانندسازی DNA و جداشدن کروموزوم‌ها باید در کمال صحت و درستی انجام پذیرد. برای اطمینان از اینکه این فرآیندها به درستی و در نظم و ترتیب صحیحی انجام می‌پذیرند، سلول‌ها دارای چندین سطح تنظیمی کنترل کننده این وقایع اساسی چرخه سلولی می‌باشند. در مجموع این مکانیسم‌های تنظیمی تحت عنوان نقاط کنترل یا نامیده می‌شوند (شکل ۳۵-۲۰) به مثال‌های متعددی از نقاط کنترل چرخه سلولی پیشتر در این فصل اشاره شده است. در این قسمت ما به این نقاط کنترل و نیز نقاط کنترل دیگری که در رابطه با فرآیندهای اصلی چرخه سلولی در بالا گفته شده است، اشاره می‌کنیم. مکانیسم‌های کنترلی که در این نقاط کنترل اجرا می‌شوند تضمینی برای دست نخورده ماندن کروموزوم‌ها بوده و همچنین باعث می‌شوند هر مرحله از چرخه سلولی پیش از آغاز مرحله بعدی به طور کامل انجام گرفته باشد.

درک ما از این مکانیسم‌های کنترل در سطح مولکولی به طور قابل توجهی در سالهای اخیر پیشرفت کرده است. جدول ۳-۲۰ چهار نقطه کنترل مهم چرخه سلولی را آورده و مکانیسم کنترل به کار برده شده در فقط کنترل را بطور خلاصه، بیان کرده است.

وجود DNA همانندسازی نشده از ورود به میتوز جلوگیری می‌کند

سلول‌هایی که نتوانسته‌اند تمام کروموزم‌های خود را همانندسازی کنند در حالت عادی وارد میتوز نمی‌شوند. کاربرد نقطه کنترل درون فاز S شامل تشخیص DNA همانندسازی نشده و چنگال‌های همانندسازی از کار افتاده هست که باعث جلوگیری و مهار فعالیت MPF می‌شود (شکل ۳۵-۲۰ مرحله ❶ را ملاحظه نمایید). مطالعات ژنتیکی در مخمر و مطالعات بیوشیمیایی انجام گرفته با عصاره‌های تخم زنوپوس اثبات کرده است که پروتئین



▲ **شکل ۳۵-۲۰ (شکل رنگی) مرور کنترل نقاط کنترلی در چرخه سلولی:** نقطه کنترل درون فاز S از فعال شدن سیکلین CDK1-A و سیکلین CDK1-B (یعنی فاکتور پیشبرنده میتوز MPF) توسط فعال‌سازی یک آبشار ATR-Chk1 پروتئین کیناز که Cdc25c را فسفریله و غیر فعال می‌کند، جلوگیری کرده و لذا مانع ورود به میتوز می‌شود. در نقطه کنترل تجمع دوک ❷، Mad2 و سایر پروتئین‌ها، از فعالسازی فاکتور تشخیص ApcC/C (Cdc20 مورد نیاز برای پلی یوبی کوئیتینه شدن سکورین ممانعت نموده بنابراین از ورود به آنافاز جلوگیری می‌کند. نقطه کنترل موقعیت دوک ❸ از رهاشدن Cdc14 فسفاتاز از هستک جلوگیری می‌کند، بنابراین فعالیت فاکتور تشخیص Apc/c (Cdh1) مورد نیاز برای پلی یوبی کوئیتینه شدن Apc/C مربوط به سیکلین‌های نوع B و القاء Sic1، مسدود می‌شود. در نتیجه کاهشی در مورد نیاز فعالیت MPF برای وقایع تلوفاز، اتفاق نمی‌افتد. در فاز آغازی نقطه کنترل آسیب DNA ❹ پروتئین کیناز (ATM/R)، AIM یا ATR فعال می‌شود. سپس کیناز فعال دو مسیر را در پیش می‌گیرد: مسیر Chk-Cdc25A (❹b و ❹c)، بلوکه شدن ورود یا گذر از فاز S، و مسیر P53-P21^{CIP} برای توضیح بیشتر به متن مراجعه کنید. نمادهای قرمز نشان دهنده مسیرهایی هست که پیشروی در طول چرخه سلول را مهار می‌کنند.

کینازهای ATR و Chk1 در سلول‌هایی که سنتز DNA را کامل نکرده‌اند مانع از ورود آن‌ها به میتوز می‌شوند. گفته می‌شود که تجمع ATR با چنگال‌های همانند سازی باعث فعال شدن فعالیت پروتئین کینازی شده و منجر به فسفریلاسیون و فعال شدن Chk1 کیناز می‌گردد. سپس Chk1 فعال، Cdc25 فسفاتاز (Cdc25c در مهره‌داران) را فسفریله و غیرفعال می‌کند این فسفاتاز، فسفات مهاری را از CDK های میتوزی برمی‌دارد. در نتیجه کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK میتوزی به صورت مهار شده باقی مانده و نمی‌توانند اهداف مورد نیاز برای شروع میتوز را فسفریله کنند. ATR به شروع این آبشار پروتئین کینازی ادامه می‌دهد، تا زمانی که تمام چنگال‌های همانندسازی، همانندسازی DNA را تکمیل کرده و از همدیگر جدا شوند. این مکانیسم باعث می‌شود که آغاز میتوز وابسته به تکمیل همانندسازی کروموزوم باشد. این وابستگی یا نیاز، که یک فاز چرخه سلولی باید پیش از شروع مرحله بعدی تمام شود جنبه مهم و اساسی از عملکرد نقاط کنترلی برای پیشروی منظم فرآیندهای اساسی چرخه سلولی می‌باشد (شکل ۳۴-۲۰ را ملاحظه نمایید).

تجمع نادرست دوک میتوزی از آغاز آنافاز جلوگیری می‌کند

نقطه کنترل تجمع دوک، تا زمانی که هر کدام از کینه توکورهای منفرد هر کروماتید به طور صحیح با میکروتوبول‌های دوک تجمع نیابند از ورود به آنافاز جلوگیری می‌کند. حتی اگر یک کینه توکور به یک میکروتوبول دوک وصل نشده باشد، آنافاز مهار می‌شود.

جدول ۳-۲۰ پروتئین‌های نقطه کنترل

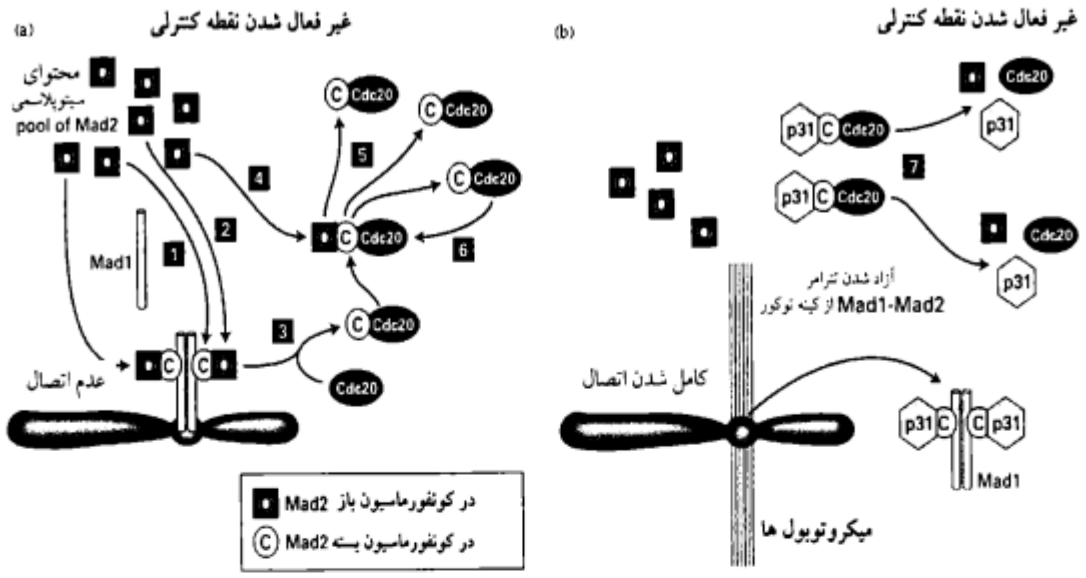
نقطه کنترل	هدف	حسگر	عمل
نقطه کنترل درون فاز S	تضمین کامل‌شدن همانندسازی DNA قبل از ورود به فاز M	ATR چنگال‌های همانندسازی را شناسایی می‌کند	مهار Cdc25 برای ممانعت از فعال‌سازی سیکلین-CDKهای میتوزی، بلوکه نمودن وقایع اولیه میتوز
نقطه کنترل تجمع دوک	تضمین می‌کند تا کینه‌توکور همه کروموزوم‌ها قبل از آنافاز به میکروتوبول‌های دوک متصل شوند	Mad2 کینه توکورهای متصل نشده به میکروتوبول‌ها را شناسایی می‌کند	مهار Cdc20 برای ممانعت از فعال‌سازی اسپاراز و شروع آنافاز
نقطه کنترل موقعیت دوک	تضمین می‌کند همه کروموزوم‌ها قبل از تلوفاز و سیتوکینز بطور مناسب به سلول‌های دختری جدا شوند	Tem-1 (S.cerevisiae) موقعیت مناسب جسم قطب دوک را در جوانه شناسایی می‌کند	ممانعت از فعال‌سازی Cdc14 و تجزیه سیکلین‌های میتوزی، بلوکه‌کردن وقایع اواخر متیوز
نقطه کنترل آسیب DNA	آسیب به DNA را در کل چرخه سلولی شناسایی می‌کند	ATM، ATR آسیب DNA را شناسایی می‌کند	مهار Cdc25A برای ممانعت از ورود به فاز S، مهار p21CIP همه کمپلکس‌های سیکلین-CDK جهت القاء توقف چرخه سلولی

یافته‌هایی که چگونگی عملکرد ابتدایی این نقطه کنترل را بیان می‌کنند از جداسازی جهش یافته‌های مخمر در حضور بنومیل[1] (یک داروی دپلیمریزه کننده میکروتوبول) حاصل شده‌اند غلظت پایین بنومیل باعث افزایش زمان لازم برای سلول‌های مخمری به منظور تجمع دوک میتوزی و اتصال کینه‌توکورها به میکروتوبول‌ها می‌شود. سلول‌های نوع وحشی که در معرض بنومیل قرار گرفته بودند تا زمانی که این فرآیندها کامل نشده باشد آنافاز را شروع نکرده و پس از آن در طول میتوز پیش‌روی می‌کنند و سلول‌های دختر طبیعی را ایجاد می‌کند. در مقابل این، جهش یافته‌های دارای نقص در نقطه کنترل تجمع دوک قبل از آنکه تجمع دوک و اتصال کینه‌توکورها کامل شود بودند، در طول آنافاز پیشروی کرده و در نتیجه جداسازی کروموزوم‌های آن‌ها به صورت اشتباه صورت می‌گیرد و باعث تولید سلول‌های دختر غیرطبیعی می‌شود که می‌میرند.

بررسی این جهش یافته‌ها، یک پروتئین به نام Mad2 (نقص‌باز دارنده میتوزی)[2] و نیز پروتئین‌های دیگری که Cdc20 را تنظیم می‌کنند را شناسایی کرد و Cdc2 که فاکتور تشخیص مورد نیاز برای هدف‌گیری APC/C به سکورین (Securin) می‌باشد. (شکل ۳۵-۲۰ را ملاحظه نمایید). به یاد آورید که پلی یوبی کوئیتینه شدن سکورین با واسطه APC/C-Cdc20 و تجزیه آن در ادامه، برای فعال‌سازی آنزیم سپاراز و ورود به آنافاز مورد نیاز می‌باشد (شکل ۲۳-۲۰ را ملاحظه نمایید). نشان داده شده است که Mad2 با کینه‌توکورهایی که به میکروتوبول‌ها متصل نمی‌شوند مرتبط می‌شود. Mad2 متصل به کینه‌توکور ، به سرعت با یک فرم محلول Mad2 که تمام Cdc20 ها را در سلول مهار می‌کند، مبادله می‌شود. زمانی که میکروتوبول‌ها به کینه توکورها متصل می‌شوند، کینه توکورها، Mad2 اتصال یافته را رها کرده و فرآیند مهار کنندگی ایجاد شده توسط فرم محلول Mad2 را متوقف می‌کنند. با وجود این، حتی زمانی که یک کینه توکور منفرد به میکروتوبول‌هایی که از قطب مقابل دوک مربوط به خواهر آن آمده‌اند، متصل نشود، مقدار کافی Mad2 محلول به اندازه کافی در کینه‌توکور اتصال نیافته تولید می‌شود تاتمام Cdc20ها را در سلول مهار کند. مدل رایج برای چگونگی عملکرد این مکانیسم تنظیمی (شکل ۳۶-۲۰) توسط کریستالوگرافی اشعه X و داده‌های NMR که نشان دهنده ساختار

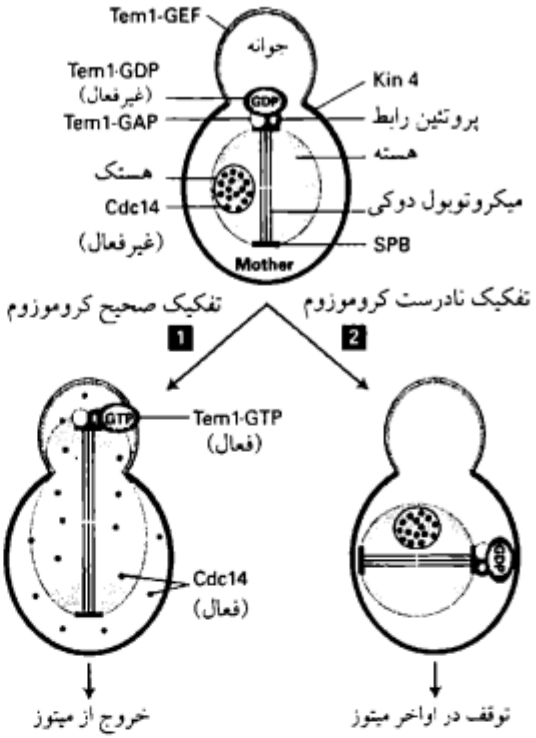
1- Benomyl

2- Mitotic arrest defective 2



▲ **شکل ۳۶-۲۰ (شکل رنگی) مدل تنظیمی Cdc20** نقطه کنترل کننده تجمع و تشکیل شدن دوک، تا زمانی که تمام کینه‌توکورها بطور درست به میکروتوبول‌های دوکی متصل یابند فعال باقی می‌ماند. (a) پروتئین Mad2 در دو ساختمان فضایی وجود دارد یکی در حالت "باز" (مربع‌های قرمز) و دیگری در حالت "بسته" (دایره‌های نارنجی). بر طبق این مدل Mad2 در ساختمان فضایی باز می‌تواند هم به Mad1 و هم به Cdc20 اتصال یابد. اتصال به Cdc20 یا Mad1 سبب تبدیل Mad2 به ساختمان فضایی بسته می‌شود که در این حالت بطور پایدار به این پروتئین‌ها متصل است. Cdc20 متصل به ساختمان فضایی بسته Mad2 ، غیر فعال است. دو Mad2 یی که در یک ساختمان فضایی قرار دارند با هم میانکنشی ندارند اما Mad2 باز و Mad2 بسته از طریق جایگاهی که متفاوت از جایگاه اتصال Mad2 به Mad1 و Cdc20 است بطور گذرا و ناپایدار به یکدیگر متصل می‌شوند. Mad1 و ساختمان فضایی بسته Mad2 تترامری بوجود می‌آورند که از طریق Mad1 به کینه‌توکوری که به میکروتوبول متصل شده است اتصال می‌یابد ❶. Mad2 در ساختمان فضایی باز می‌تواند بطور موقت به Mad2 بسته اتصال یافته به Mad1 در محل کینه‌توکور اتصال یابد ❷. این میانکنش با فرم بسته Mad2، فرم باز Mad2 را تحریک می‌کند تا با یک Cdc20 اتصال یابد. فرم باز Mad2 تنها زمانی می‌تواند با Cdc20 اتصال یابد که Cdc20 به فرم بسته Mad2 متصل باشد. این امر سبب تبدیل فرم باز پروتئین Mad2 به ساختمان فضایی بسته می‌شود که موجب جدا شدن Mad2 بسته از کینه‌توکور می‌شود ❸. میانکنش پایدار Mad2 بسته با Cdc20 از اتصال Cdc20 به APC/C جلوگیری می‌کند. علاوه بر این فرم بسته Mad2 که به Cdc20 متصل است می‌تواند بطور موقت با Mad2 در ساختمان فضایی باز میانکنش دهد ❹ ، که موجب اتصال آن به Cdc20 دیگر می‌شود. که این عمل، Mad2 را به فرم بسته‌ای که به Cdc20 متصل است تبدیل می‌کند. این کمپلکس Mad2 بسته با Cdc20 که تازه شکل گرفته است از جفت Mad2-Cdc20 اولی جدا می‌شود تا در نهایت دو کمپلکس Mad2-Cdc20 ایجاد می‌شود ❺. بنابراین Mad2 ایی که در ساختمان فضایی باز بصورت آزاد وجود دارد با تکرار این چرخه، سریعاً به فرم بسته‌ای که به Cdc20 متصل است تبدیل می‌شود ❻. منبع فرم بسته‌ای Mad2 که این چرخه زنجیره‌ای را آغاز می‌کند، فرم بسته Mad2 ی متصل به Mad1 تجمع یافته با به کینه‌توکور (واکنش) است و نشان می‌دهد که چگونه یک کینه‌توکور آزاد می‌تواند سبب غیر فعال شدن تمام Cdc20 سلول از طریق تشکیل کمپلکس‌های Mad2-Cdc20 بسته شود. (b) اتصال میکروتوبول‌ها (سبز) به کینه‌توکورها سبب جابجایی تترامر Mad1/Mad2 می‌شود. Mad2 ی موجود در تترامر جابجا شده و نمی‌تواند با Mad2 ی باز میانکنش دهد. اما در عوض به پروتئین دیگری بنام $P31^{comet}$ متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند و این پروتئین به Mad2 در کمپلکس‌های Mad2-Cdc20 اتصال می‌یابد و Cdc20 فعال را آزاد می‌کند ❼. تنها تعداد کمی از تترامرهای Mad1-Mad2 ایی که به کینه‌توکورها متصل هستند می‌توانند کمپلکس‌های کافی از Mad2-Cdc20 را توسط مکانیسم نشان داده شده در (a) برای غلبه کردن بر فعالیت p31 تولید کنند. هنگامی که تمام کینه‌توکورها به میکروتوبول‌ها متصل هستند. این امر موجب آزاد شدن تترامرهای Mad1-Mad2 شده که فعالیت p31 را افزایش می‌دهد که‌آزادشدن و این امر Cdc20 را در پی دارد. Cdc20 آزاد به APC/C اتصال می‌یابد که نتیجه آن پلی یوبی کوئیتینه شدن و در پی آن تجریه شدن پروتئوزومی سکورین و شروع آناقاز است.

پروتئین‌های میانکنش دهنده درگیر در این فرآیند می‌باشد، پیشنهاد شده است. این مدل از طریق جهش زایی هدفمند هدایت شده با این ساختارها، مطالعات بیوشیمیایی میانکنش‌های پروتئین - پروتئین و مطالعات میکروسکوپی صورت گرفته در سلول‌های زنده با استفاده از پروتئین‌های نشاندار شده با GFP تائید شده است. این مدل ظریف برای نقطه کنترل تجمع دوک می‌تواند توانایی یک کینه‌توکور منفرد



▲ **شکل ۳۷-۲۰ نقطه کنترلی قرارگیری دوک.** فعالیت فسفاتاز Cdc14 برای خروج از میتوز مورد نیاز است. شکل‌بالا : ساکارومایسیس سرویزیه طی اینترفاز و اوایل میتوز Cdc14 در هستک قرار گرفته و غیر فعال می‌شود. Tem1.GDP (ارغوانی) غیرفعال به جسم دوک قطبی (SPB) نزدیک جوانه در اوایل آنافاز از طریق پروتئین رابط (آبی) متصل می‌شود و بوسیله GAP (پروتئین سرعت دهنده GTPase) مشخص در وضعیت غیر فعال نگه داشته می‌شود. اگر جدا شدن کروموزوم ❶ به درستی صورت گیرد، گسترش یافتن میکروتوبول‌های دوک، SPB سلول دختری را وارد جوانه می‌کنند که موجب آمدن و در تماس قرار گرفتن Tem1 با GEF (فاکتور مبادله‌کننده نوکلئوتید گوانین) موجود در کورتکس جوانه و غیرفعال شدن Tem1-GAP می‌شود. این عمل Tem1.GDP غیرفعال را به Tem.GTP فعال تبدیل می‌کند که فعالیت آبشاری پروتئین کینازی و در نهایت آزاد شدن Cdc14 فعال و خروج از میتوز را درپی بردارد. اگر دستگاه دوک در قرار دادن SPB دختری در جوانه ❷ شکست بخورد، SPB با Kin4 موجود در کورتکس مادری تماس برقرار می‌کند که این عمل Tem1-GAP را فعال می‌کند تا Tem1 را در حالت اتصال به GDP که فرم غیر فعال است حفظ کند در نتیجه Cdc14 در حالت متصل به هستک باقی مانده و این امر سبب توقف در اواخر میتوز می‌شود.

متصل نشده برای باز دارندگی و مهار Cdc20 سلولی، تا زمانی که کینه توکور به درستی با میکروتوبول‌های دوک اتصال برقرار کند را مورد توجه قرار دهد.

جداشدن صحیح کروموزوم‌های دختری توسط شبکه خروج میتوزی کنترل می‌شود

به محض جدا شدن صحیح تلوفاز شروع می‌شود. وقایع گوناگون تلوفاز و در پی آن سیتوکینز، مجموعاً به عنوان خروج از میتوز نامیده می‌شود که نیازمند غیر فعال شدن MPF می‌باشد. همانطور که بیان شد، دفسفریلاسیون فاکتور تشخیص APC/C (Cdh1) از طریق Cdc14 فسفاتاز باعث تجزیه سیکلین‌های میتوزی و حذف فعالیت MPF در اواخر آنافاز می‌شود (شکل ۱۰-۲۰ را ملاحظه کنید). در طول اینترفاز و اوایل میتوز، Cdc14 در هسته کنار گذاشته شده و غیرفعال می‌شود. نقطه کنترل وضعیت دوک[1] که موقعیت جداشدن کروموزوم‌های دختری را در انتهای آنافاز کنترل می‌کند، تعیین کننده این مسئله هست. که آیا Cdc14 فعال، از هسته رها می‌شود تا خروج از میتوز امکان‌پذیر گردد. (شکل ۳۵-۲۰ را ملاحظه کنید).

کاربری این نقطه کنترل در ساکارومایسیس سرویزیه به یک سری از پروتئین‌ها بستگی دارد که به عنوان شبکه خروج میتوزی[2] بیان می‌شوند. تنظیم فعالیت Cdc14 در اکثر یوکاریوت‌ها به سادگی انجام می‌گیرد. در تقسیم مخمر ساکارومایسیس سرویزیه شکل‌گیری جداره یا سپتوم که سلول‌های دختری را تقسیم می‌کند، با پروتئین‌هایی تنظیم می‌شود که مشابه با پروتئین‌هایی هستند که شبکه خروج میتوزی را در ساکارومایسیس سرویزیه تشکیل می‌دهند. ژن‌های رمزدهی‌کننده پروتئین‌های مشابه در موجودات زنده عالی یافت شده‌اند که اعمال مشابهی در نقاط کنترل همسان انجام می‌دهند و زمانی که کروموزوم‌های دختری به درستی جدا نشده باشند، باعث توقف در اواخر میتوز می‌شوند. یک جزء کلیدی در شبکه خروج میتوزی یک GTPآز کوچک (مونومری) می‌باشد که Tem1 (شکل ۳۷-۲۰) نامیده می‌شود. این عضو از ابرخانواده[3] GTPآز مربوط به پروتئین‌های تغییردهنده، فعالیت یک آبشار پروتئین کیناز را کنترل می‌کنند که مشابه مسیر کنترل MAP کیناز توسط Ras است (فصل ۱۶). در طول آنافاز، Tem1 با جسم قطبی دوک (SPB)[4] نزدیک جوانه سلول دختری، مجتمع می‌شود (SPB، جایی که میکروتوبول‌های دوک از آن منشاء می‌گیرند معادل سانتروزوم در یوکاریوت‌های عالی می‌باشد). در SPB، از طریق یک GAP خاص (پروتئین فعال کننده GTP آز)، Tem1 در حالت غیرفعال متصل به GDP نگه داشته می‌شود. GEF (فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانوزین[5]) که Tem1 را فعال می‌کند در قشر

1- Spindle - position - checkpoint
2- Mitotic exit network
3- GTPase superfamily
4- Spindle pole body
5- Guoninesine nucleotide - exchange fact

جوانه جایگیری کرده و در سلول مادر حضور ندارد. پروتئین دیگر، پروتئین کیناز kin4 در قشر سلول مادر جایگیری کرده و در جوانه حضور ندارد. زمانی که طویل شدن میکروتوبول‌های دوک به درستی باعث جایگیری صحیح کروموزوم‌های دختری به درون جوانه شد، Tem1 با GEF مربوط به خود تماس برقرار کرده و Tem1-GAP فسفریله و مهار می‌شود. در نتیجه Tem1 به حالت فعال خود یعنی متصل به GTP تبدیل می‌شود. کیناز انتهایی در آبشار، توسط Tem1 . GTP فعال شده و سپس لنگر هسته‌ای[1] که به Cdc14 فسفاتاز متصل و آن را مهار می‌کند وفسفریله نموده باعث آزادشدن Cdc14 فسفاتاز به سیتوپلاسم . سلول مادری و سلول جوانه می‌شود (شکل ۳۷-۲۰) به محض اینکه Cdc14 فعال در دسترس قرار گرفت، یک سلول می‌تواند در طول تلوفاز و سیتوکینز پیشروی کند.

شبکه خروج میتوزی یک مثال خوب از وابستگی فاز چرخه سلولی به تکمیل شدن فاز قبلی می‌باشد. تا زمانی که مکانیسم جداشدن کروموزوم‌ها، کروموزوم‌های دختری را به جوانه منتقل نکرده است، تلوفاز و سیتوکینز نمی‌توانند شروع شوند. این دلیل وابستگی شروع تلوفاز به فعال شدن Cdc14 بوده و فعال شدن Cdc14 نیازمند این هست که Tem1 به قشر جوانه رانده شود. اگر کروموزوم‌های دختری نتوانند به درون جوانه بروند، Tem1 با Tem1-GEF مواجه نخواهد شد. در عوض کیناز kin4 با قشر سلول مادری مجتمع شده و Tem1-GAP را در حالت فعال شده نگه می‌دارد. در نتیجه Tem1 در حالت غیر فعال خود، متصل با GDP باقی مانده و Cdc14 از هستک آزاد نشده و خروج از میتوز مهار می‌شود (شکل ۳۷-۲۰ و مرحله ۲). kin4 در سلول‌هایی که کروموزوم‌های خود را بدرستی جدا کرده‌اند مورد نیاز نیست اما تنها در گروه کوچکی از سلول‌هایی که نتوانسته‌اند بدرستی اینکار را انجام دهند، زمان بیشتری در اختیارشان گذاشته می‌شود که کروموزوم‌های دختری را به جوانه برانند. در ساکارومایسیس سرویزیه، جداشدن اشتباه کروموزوم‌ها کمتر از یک در 10^5 تقسیم سلولی می‌باشد.

توقف چرخه سلولی در سلول‌های واجد DNA آسیب دیده بستگی به سرکوب‌گرهای تومور دارد

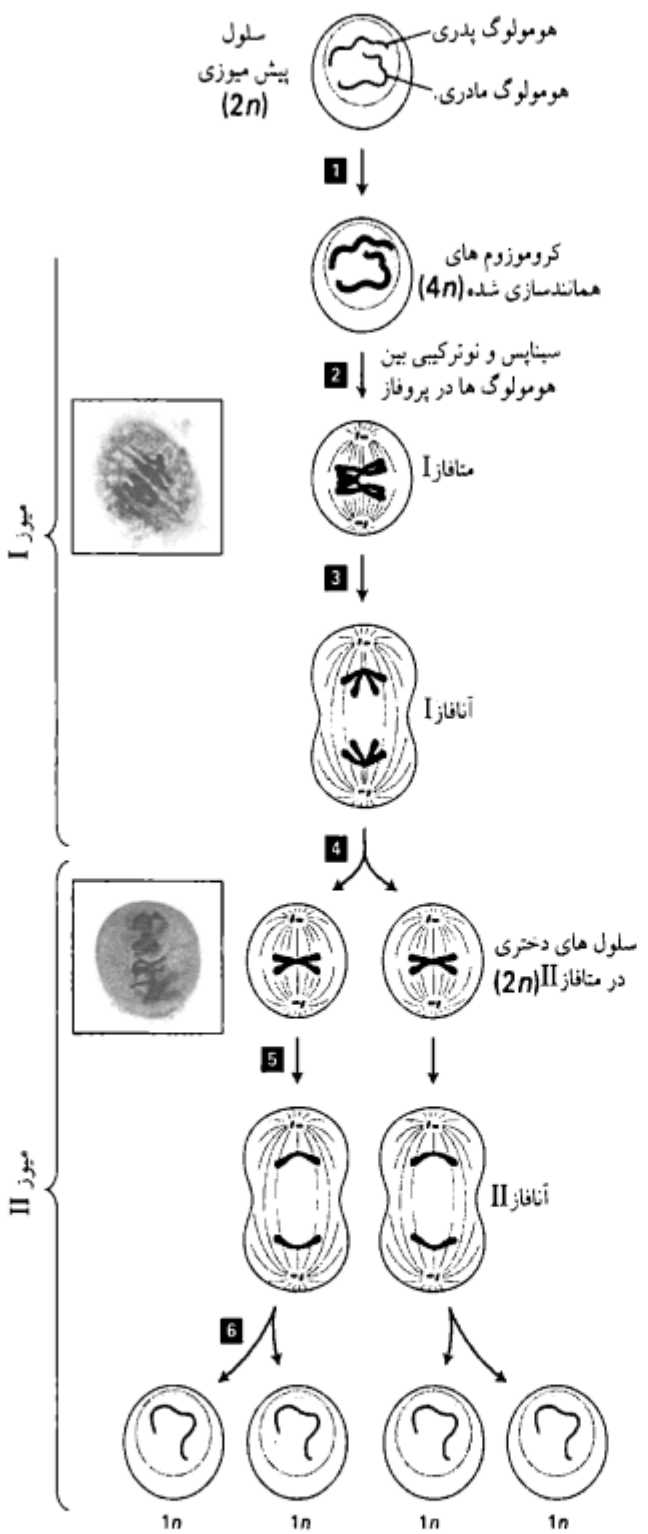
پروتئین‌های مربوط به نقطه کنترل آسیب DNA، آسیب DNA را شناسایی کرده و از پیشروی چرخه سلولی را تا زمانی که آسیب ترمیم شود، جلوگیری می‌کنند. آسیب به DNA می‌تواند از عوامل شیمیایی و یا تشعشعات ماورای بنفش (UV) و یا پرتوهای گاما (γ) حاصل شده باشد. توقف در G_1 و S باعث جلوگیری از کپی شدن بازهای آسیب دیده می‌شود که می‌توانستند باعث تثبیت جهش در ژنوم شوند. همانندسازی DNA ی آسیب دیده همچنین باعث سازماندهی جدید کروموزومی می‌شود که می‌تواند در شروع سرطان نقش داشته باشند. توقف در G_2 اجازه می‌دهد که DNA دو رشته‌ای قبل از آن‌که وارد میتوز شود، برای انجام ترمیم، شکسته شود. اگر شکست DNA دو رشته‌ای ترمیم نشود، قطعه دور شکسته شده مربوط به کروموزوم آسیب دیده به درستی جداسازی نمی‌شود چون از لحاظ فیزیکی به سانترومری که در طول آنافاز در جهت یک قطب دوک کشیده می‌شود، متصل نمی‌باشد.

همانطور که به تفصیل در فصل ۲۵ توضیح داده شده است، غیر فعال شدن ژن‌های سرکوب‌گر تومور[2] در پیشروی سرطان نقش دارد. پروتئین‌های رمزدهی شده با چندین ژن سرکوبگر تومور، همچون ATM، Chk2، معمولاً در نقطه کنترل آسیب DNA فعالیت می‌کنند. در بیماران دارای جهش در هر دو نسخه ATM یا Chk2، این امر بیش از حالت عادی باعث پیشروی سرطان می‌شود. هر دو ژن، پروتئین کینازها را رمزدهی می‌کنند.

آسیب DNA ناشی از نور UV توسط پروتئین‌هایی که وجود آسیب DNA ناشی از UV را شناسایی می‌کنند به ATM کیناز علامت داده شده و باعث فعال شدن آن می‌شوند. سپس ATM فعال شده، Chk2 را فسفریله و فعال می‌کند، سپس این Chk2، cdc25A فسفاتاز را فسفریله کرده و آن را برای پلی یوبی کوئیتینه شدن توسط یک پروتئین ـ یوبی کوئیتین لیگاز و در ادامه آن تجزیه پروتئوزومی، نشاندار می‌کند. به یاد آورید که برداشت فسفات مهاری از CDK2 پستانداران توسط Cdc25A، نیازمند شروع و عبور از فاز S هست که توسط سیکلین CDK2-E و سیکلین CDK2-A میانجیگری می‌شود. تجزیه Cdc25A ناشی از فعالیت مسیر ATM-Chk2 در فاز G_1 یا فاز S سلول‌ها باعث توقف G_1 یا S می‌شود (شکل ۳۵-۲۰-۴b و ۴c را ملاحظه کنید) یک مسیر مشابه، شامل پروتئین کینازهای ATR و Chk1 باعث فسفریلاسیون و پلی یوبی کوئیتینه شدن Cdc25A در پاسخ به تشعشعات γ (گاما) می‌شود. همانطور که پیشتر در رابطه با نقطه کنترل درون فاز S بیان شد، Chk1 نیز Cdc25C را غیر فعال می‌کند و مانع از فعالیت CDK1 و ورود به میتوز می‌شود.

سرکوب‌گر تومور دیگر، پروتئین P53 در توقف سلول‌ها DNA

1- nucleolar anchor 2- tumor supressor genes



◀ **شکل ۳۸-۲۰: میوز،** سلول‌های پیش میوزی دارای ۲ نسخه از هر کدام از کروموزوم‌ها هستند (۲n) یکی از والد پدری و یکی از والد مادری مشتق شده است. برای سهولت هومولوگ‌های پدری و مادری تنها یک کروموزوم نشان داده شده‌اند. مرحله ❶: همه کروموزوم‌ها در طول فاز S پیش از تقسیم اول میوز همانندسازی شده‌اند که نتیجه آن مکمل کروموزومی ۴n می‌باشد کمپلکس‌های اتصالی (نشان داده نشده است) کروماتیدهای خواهری را متصل می‌کند که این کمپلکس‌ها در تمام طول کروموزوم‌ها تشکیل می‌شود. مرحله ❷: همینکه کروموزوم‌ها در طول پروفاز میوز اول فشرده می‌شوند، هومولوگ‌های همانندسازی شده حداقل در نتیجه یک کراسینگ آور بین یک کروماتید پدری و یک کروماتید مادری جفت می‌شوند. این جفت شدن کروموزم‌های هومولوگ همانندسازی شده سیناپس[1] نامیده می‌شود. در متافاز، نشان داده شده، در اینجا، هر دو کروماتید یک کروموزوم با میکروتوبول‌های نشأت گرفته از یک قطب دوک مجتمع شده ولی هر عضو یک جفت کروموزم هومولوگ با میکروتوبول‌های نشأت گرفته از قطب‌های دوکی مقابل هم مجتمع می‌شوند. مرحله ❸: در طول آنافاز میوز I کروموزوم‌های هومولوگ، هر کدام شامل دو کروماتید، به طرف قطب‌های دوکی مقابل هم کشیده می‌شوند. مرحله ❹: سیتوکینز باعث می‌شود که دو سلول دختری (اکنون ۲n)، بدون انجام همانندسازی DNA و دارد میوز II شوند. در متافاز میوز II، نشان داده شده در اینجا، کروماتیدهای تشکیل دهنده هر کروموزوم همانندسازی شده به میکروتوبول‌های آمده از قطب‌های دوکی مقابل هم متصل می‌شوند، همانند مرحله میتوز. مرحله ❺: و ❻: جداسازی کروموزوم‌ها به طرف قطب‌های دوکی مقابل هم در طول آنافاز میوز دوم با سیتوکینز ادامه پیدا می‌کند که باعث تولید سلول‌های زایشی هاپلوئید (۱n) حاوی یک نسخه از هر کروموزوم می‌شوند. میکروگراف‌های سمت چپ نشان دهنده متافاز میوز I و II در گامت‌های رشد یافته از اوول‌های لیلیوم (Lily) می‌باشد. کروموزوم‌ها در صفحه متافازی ردیف شده‌اند

آسیب دیده دخالت می‌کند. سلول‌های دارای P53 عملکردی زمانی که با اشعه γ مواجه شوند در G_1 و G_2 متوقف می‌شوند و سلول‌های فاقد P53 عملکردی در G_1 متوقف نمی‌گردند. اگرچه پروتئین P53 یک فاکتور رونویسی هست، تحت شرایط طبیعی بسیار ناپایدار بوده و عموماً تا مقادیری که برای تحریک رونویسی مورد نیاز است انباشته نمی‌شود. ناپایداری P53 ناشی از پلی یوبی کوئیتینه شدن توسط یک پروتئین ـ یوبی کوئیتین لیگازی به نام Mdm2 است که آن تجزیه پروتئوزومی صورت می‌گیرد.

تجزیه سریع P53 توسط ATM و ATR مهار می‌شود که این

1- Synapsis

پروتئین‌ها P53 را در جایگاهی که در اتصال با Mdm2 دخالت می‌کند، فسفریله می‌کنند، این تغییر و سایر تغییرات P53 در پاسخ به آسیب DNA به طور قابل توجهی توانایی آن را برای فعال کردن رونویسی از ژن‌های خاصی که سلول را یاری می‌کنند تا از عهده آسیب DNA برآید، افزایش می‌دهد. یکی از این ژن‌ها $P21^{CIP}$ (یک CKI عمومی که به تمام کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK پستانداران متصل شده و همگی را مهار می‌کند) یا رمزدهی می‌کند، در نتیجه، سلول‌ها تا زمانی که آسیب DNA ترمیم شود و میزان P53 و متعاقب آن میزان $P21^{CIP}$ کاهش پیدا کند در G_1 و G_2 متوقف می‌شوند. (شکل ۳۵-۲۰، ۴d و ۴a را ملاحظه کنید).

تحت برخی شرایط، همچون زمانی که آسیب DNA شدید می‌باشد، P53 همچنین بیان ژن‌هایی را فعال می‌کند که موجب آپوپتوز می‌شوند، آپوپتوز فرآیند مرگ برنامه است سلولی‌ریزی شده که در حالت عادی در سلول‌های خاصی در طول رشد جانوران پرسلولی اتفاق می‌افتد. در مهره‌داران پاسخ P53 دربردارنده القاء آپوپتوز در مواجهه با آسیب وسیع DNA هست که احتمالاً برای جلوگیری از انباشته شدن جهش‌های چندتایی می‌باشد که یک سلول عادی را به یک سلول سرطانی تبدیل می‌کنند. نقش دوگانه P53 در توقف چرخه سلولی و القاء آپوپتوز، احتمالاً توضیحی برای مشاهده‌ای است که تقریباً تمام سلول‌های سرطانی دارای جهش در هر دو آلل ژن P53 یا در مسیرهایی که P53 را در پاسخ به آسیب DNA پایدار می‌کنند، است (فصل ۲۵). پیامد جهش‌های P53، ATM و Chk2 بیانگر مثال‌هایی هستند که اهمیت نقاط کنترل چرخه سلولی را در سلامتی موجودات زنده پرسلولی نشان می‌دهند.

نکات کلیدی بخش ۷-۲۰

نقاط کنترلی در تنظیم چرخه سلولی

■ نقاط کنترلی، دست نخورده ماندن کروموزوم‌ها و همچنین کامل شدن مراحل اساسی از چرخه سلولی قبل از اینکه مرحله بعدی شروع می‌شود را تضمین می‌کنند.

■ نقاط کنترلی درون فاز S در طی S و G_2 به منظور جلوگیری از فعالسازی MPF قبل از اینکه سنتز DNA با مهار فعال‌سازی CDK1 توسط Cdc25 کامل شود عمل می‌کنند (شکل ۳۵-۲۰ ملاحظه کنید).

■ نقطه کنترلی تجمع دوک (که مانع از شروع زودرس آنافاز می‌شود) از Mad2 و سایر پروتئین‌های به منظور تنظیم Cdc20 فاکتور تشخیص APC/C استفاده می‌کند که سکورین را برای پلی یوبی‌کتینه شدن مورد هدف قرار می‌دهد (شکل ۳۵-۲۰، ۲ و شکل ۳۶-۲۰ را ملاحظه کنید).

■ نقطه کنترل موقعیت دوک تا جدا شدن صحیح کروموزوم‌های دختری مانع از تلوفاز و سیتوکینز می‌شود. تا سلول دختری مجموعه کاملی از کروموزوم‌ها را داشته باشد. (شکل ۳۵-۲۰ و ۳ را ملاحظه نمائید)

■ در نقطه کنترل موقعیت دوک GTPase از کوچک Tem1 در دسترس بودن Cdc14 فسفاتاز را کنترل می‌کند که آن نیز Cdh1 فاکتور تشخیص APC/C را فعال می‌کند که سیکلین‌های نوع B را برای تجزیه مورد هدف قرار می‌دهد و این امر باعث غیرفعال‌سازی MPF می‌شود (شکل ۱۰-۲۰ را ملاحظه کنید).

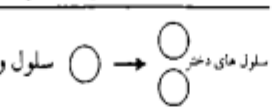
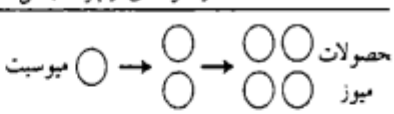
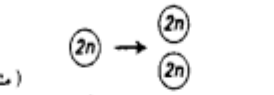
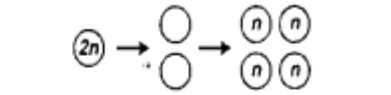
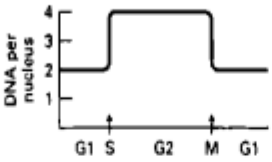
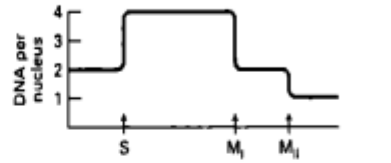
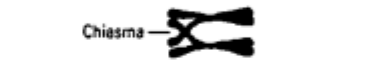
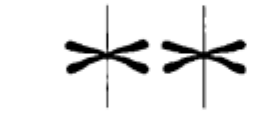
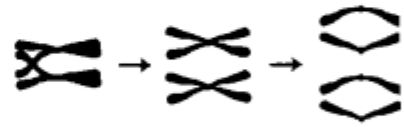
■ نقطه کنترلی آسیب DNA چرخه سلولی را در پاسخ به آسیب DNA تا وقتی که آسیب ترمیم شود، متوقف می‌کند. سه نوع پروتئین سرکوبگر تومور (P53,Chk1/2,ATM/ATR) برای این نقطه کنترلی ضروری هستند.

■ فعالسازی پروتئین کینازهای ATR و ATM در پاسخ به آسیب DNA در اثر نور UV و تابش گاما می‌باشد. دومین‌آسیب DNA به علت نور UV و تابش گاما از طریق مسیری که منجر به کاهش فعالیت Cdc25A فسفاتاز می‌شود، باعث توقف در فاز G_1 و S می‌شود. در دومین مسیر ATM/R فعال شده P53 را فعال می‌کند که آن نیز بیان $P21^{CIP}$ را تحریک می‌کند. مهار بعدی چندین کمپلکس سیکلین-CDK توسط $P21^{CIP}$ باعث توقف مدت‌دار در G_1 و G_2 می‌شود (شکل ۳۵-۲۰ و ۴a-۴d را ملاحظه کنید).

■ در پاسخ به آسیب شدید DNA، P53 ژن‌هایی را که آپوپتوز را القاء می‌کنند، فعال می‌کند.

۸-۲۰ میوز: نوع خاصی از تقسیم سلولی

تقریباً در تمام یوکاریوت‌های دیپلوئید، **میوز**، تولید کننده سلول‌های جنسی هاپلوئید می‌باشد (تخم‌ها و اسپرم) که می‌توانند با یک سلول جنسی از فرد دیگر ترکیب شده و سلول تخم دیپلوئید را که منشاء فرد دیگری هست تولید کنند. میوزیک جنبه اساسی زیست شناختی و تکاملی تمام یوکاریوت‌هاست زیرا که میوز باعث بازآرایی

ردیف	میتوز	میوز
	در سلول های سوماتیک	در سلول های در چرخه جنسی
1	یک تقسیم سلولی منجر به ۲ سلول دختری می شود 	دو تقسیم سلولی منجر به ۴ محصول میوزی می شود. 
2	عدد کروموزومی برای هر هسته حفظ شده است (مثلا برای یک سلول دیپلوئید) 	عدد کروموزومی در محصولات میوزی نصف شده است. 
3	یک فاز پیش میتوزی برای هر تقسیم سلولی 	یک فاز که پیش میوزی برای هردو تقسیم سلولی 
4	در حالت نرمال در پروفاز کروموزوم های هومولوگ جفت نمی شود	سیناپس کامل کروموزومی های هومولوگ در پروفاز
5	در حالت نرمال در پروفاز نوترکیبی وجود ندارد	حداقل یک نوترکیبی بین کروماتیدهای غیرخواهری رخ می دهد 
6	جهت گیری دو طرفه کینه‌توکورهای خواهری	جهت گیری یک طرفه کینه توکورهای خواهری
7	عدم پیوستگی بین بازوهای کروماتید خواهری در طول متافاز 	حفظ پیوستگی بین بازوهای کروماتید خواهش در طول متافاز میوز I
8	سانترومرها در آنافاز تقسیم می شوند	سانترومرها در آنافاز I تقسیم نشده ولی در آنافاز II تقسیم می شوند. 
	فرایند حفظ شده: ژنوتیپ های سلول های دختری با ژنوتیپ والدی ملیکان است	ایجاد تنوع بین محصولات میوزی
	سلول های تحت میتوز می توانند دیپلوئید و یا هاپلوئید باشند.	سلول تحت میوز دیپلوئید می باشد

▲ **شکل ۳۹-۲۰: مقایسه مشخصات اصلی میوز و میتوز**

سری‌های کروموزومی دریافت شده از والدین یک فرد می‌شود. بازآرایی کروموزوم‌ها و **نوترکیبی** بین مولکول‌های DNA والدینی در طول میوز، تضمین کننده این امر هست که هر کدام از سلول‌های جنسی هاپلوئید، ترکیب منحصر بفردی از آلل‌های ژنی را دریافت خواهند کرد که متفاوت از هر کدام از والدین و نیز از هر سلول جنسی هاپلوئید تشکیل یافته دیگر می‌باشد.

مکانیسم‌های میوز مشابه میتوز می‌باشد. با وجود این چندین تفاوت کلیدی در میوز، این امکان را به آن می‌دهد که سلول‌های هاپلوئید با تنوع ژنتیکی باور نکردنی تولید کند. (شکل ۳-۵ را ملاحظه کنید) در این بخش، ما به موارد همسوی بین مکانیسم مولکولی میتوز و میوز و نیز تفاوت‌های مکانیسمی مسئول تفاوت‌های فاحش بین این دو فرآیند اساسی تقسیم سلولی خواهیم پرداخت.

مشخصات کلیدی متمایزکننده میوز از میتوز

در طول میوز (شکل ۳۸-۲۰)، یک دور همانندسازی DNA با دو چرخه تقسیم سلولی دنبال می‌شود که میوز I و میوز II نامیده می‌شوند که هر کدام متفاوت از تقسیم میتوزی سلول‌های سوماتیک هستند. شکل ۳۹-۲۰ تفاوت‌های بین میتوز و میوز را نشان می‌دهد. در G_2 و پروفاز میوز I، دو کروماتید جداسازی شده مربوط به هر کروموزوم (شکل ۳۸-۲۰ مرحله ❶) از طریق کمپلکس‌های

اتصالی[1] در تمام طول بازوی کروموزوم‌ها با همدیگر مجتمع می‌شوند، (همانند رویدادهایی که بعد از همانندسازی DNA در یک چرخه سلول میتوزی اتفاق می‌افتند) (شکل ۲۱-۲۰، فاز G_2 را ملاحظه کنید) یک تفاوت عمده بین میوز و میتوز این هست که در پروفاز میوز I، کروموزوم‌های همولوگ (یعنی کروموزوم ۱ پدری و مادری، کروموزوم ۲ پدری و مادری و...) با هم دیگر جفت می‌شوند، این فرآیند به عنوان سیناپس شناخته می‌شود (شکل ۳۹-۲۰ ردیف ۴) این امر باعث تشکیل یک کروموزوم دوتایی[2] یا تتراد[3] متشکل از ۴ کروماتید همولوگ، ۲ تا مادری و ۲ تا پدری می‌شود. به طور معنی داری حداقل یک نوترکیبی بین یک کروماتید پدری و یک کروماتید مادری در هر تتراد اتفاق می‌افتد. (شکل ۳۹-۲۰ ـ ردیف ۵). **کراسینگ آور** کروماتیدها که از طریق نوترکیبی ایجاد می‌شود و با استفاده از میکروسکوپ می‌تواند در پروفاز و متافاز میوز اول به صورت ساختارهایی که کیاسماتا[4] نامیده می‌شوند، مشاهده می‌گردند. در مقابل، هیچگونه جفت شدنی بین کروموزوم‌های همولوگ در طول میتوز اتفاق نمی‌افتد و نوترکیبی بین کروماتیدهای غیرخواهری نادر می‌باشد.

تفاوت کلیدی دیگر بین میتوز و میوز اینست که در متافاز میوز I، کینه توکورها در سانترومرهای کروماتیدهای خواهری به رشته‌های دوک نشأت گرفته از قطب‌های دوک مخالف متصل می‌شوند. با وجود این کینه توکورهای کروموزوم‌های پدری و مادری مربوط به هر تتراد به میکروتوبول‌های دوکی مربوط به قطب‌های مخالف دوک متصل می‌شوند. (شکل ۳۸-۲۰، مرحله، شکل ۳۹-۲۰ ردیف ۶) اگرچه اتصال بین تمام طول بازوهای کروماتید خواهری در سرتاسر متافاز میوز I حفظ می‌شود، این امر برخلاف میتوز هست چراکه اتصال بین بازوهای کروماتید خواهری در طول پروفاز در سلول‌های میتوزی در بیشتر موجودات زنده وجود ندارد و اتصال تنها در ناحیه سانترومر در طول متافاز میتوز حفظ می‌شود (شکل ۲۱-۲۰ شکل ۳۹-۲۰ ردیف ۷). چون کروماتیدهای غیر خواهری حداقل یکبار از طریق متافاز میوز I نوترکیبی کرده‌اند و به خاطر اینکه اتصال بین بازوهای کروماتیدهای خواهری حفظ شده است، (از آن‌جا که کروموزوم‌های پدری و مادری در متافاز در جهت قطب‌های دوکی مخالف کشیده می‌شوند) لذا کروماتیدهای همولوگ توسط کیاسماتای بین آن‌ها و پیوستگی کروماتیدهای خواهری دور از کراس آور با هم نگه داشته می‌شوند (شکل ۴۰-۲۰). در طول آنافاز میوز I، تجزیه سکورین، سپاراز را رها می‌کند این عمل حلقه‌های اتصالی نگه دارنده بازوهای کروموزومی را همانند میتوز می‌شکند (شکل ۲۳-۲۰). با وجود این در طول میوز I حلقه‌های اتصال در سانترومر شکافته نمی‌شوند (شکل ۳۹-۲۰، ردیف ۸). این امر امکان می‌دهد که کروموزوم‌های مادری و پدری نوترکیب جدا شوند، ولی هر جفت از کروماتیدها در سانترومر پیوسته باقی می‌مانند (شکل ۳۸-۲۰، مرحله ۳ با شکل ۳۹-۲۰ ردیف ۸).

در برخی موجودات زنده، میوز II بدون باز شدن تراکم کروموزوم‌ها و تجمع پوشش هسته‌ای پیش می‌رود. در سایر موجودات زنده این وقایع معمول اینترفازی رخ می‌دهند ،ولی اینترفاز کوتاه بوده و پوشش هسته‌ای به ER (شبکه آندوپلاسمی) باز جذب شده و متراکم شدن کروموزوم‌های میوزی پروفاز II به سرعت در پی آن انجام می‌گیرد. در طول متافاز II (شکل ۳۸-۲۰، مرحله ❹) همانند میتوز، کینه توکورهای هر کدام از کروماتیدهای خواهری به میکروتوبول‌های مربوط به قطب‌های دوکی مخالف متصل می‌شوند. همچنین در طول میتوز، پیوستگی بین بازوهای کروماتیدی وجود ندارد و تنها در ناحیه سانترومر این پیوستگی وجود دارد. زمانی که کینه توکورهای نهایی به طور صحیح به یک میکروتوبول دوک متصل می‌شود آنافاز II رخ می‌دهد. (شکل ۳۸-۲۰، مرحله ❺) و با تلوفاز II و سیتوکینز ادامه می‌یابد تا اینکه ۴ سلول زایشی هاپلوئید ایجاد شود (شکل ۳۸-۲۰ مرحله ۶). به ازاء هر کروموزوم، حداقل ۲ تا از سلول‌های زایشی هاپلوئید دارای کروموزم‌های نوترکیب هستند که از نوترکیبی بین کروموزم‌های پدری و مادری در طول پروفاز میوز I ایجاد می‌شود، (شکل ۳۸-۲۰، مرحله ❷). بنابراین نوترکیبی بین دو کروماتید غیر خواهری که در میوز I به وقوع می‌پیوندد دو نتیجه عملی دارد؛ نخست این امر کروموزوم‌های همولوگ را در طول متافاز میوز I در کنار هم نگه می‌دارد. (شکل ۴۰-۲۰) و دوم: در تنوع ژنتیکی بین افراد یک گونه با تضمین ایجاد ترکیب‌های جدید مربوط به آلل‌های ژنی در افراد مختلف، ایفای نقش می‌کند. همچنین تنوع ژنتیکی از دسته بندی مجدد و مستقل همولوگ‌های پدری و مادری در طول تقسیمات میوزی حاصل می‌شود.

مهار سیکلین‌های G_1 و یک پروتئین کیناز مختص میوز مرحله S قبل از میتوز را تحریک می‌کند

در ساکارومایسیس سرویزیه و اسکیزوساکارومایسیس پمبه کاهش منابع نیتروژن و کربن موجب القاء میوز در سلول‌های دیپلوئید

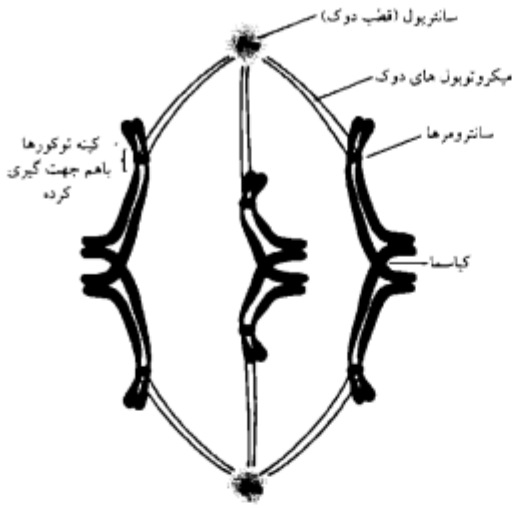
1- Cohesin complexes
2- Bivalent chromosomes
3- Tetrad
4- Chiasmata (جمع کیاسما)

شده تا هاگ‌های هاپلوئید را بوجود آورد (شکل ۶-۱). این فرآیند در این موجودات مشابه شکل‌گیری سلول‌های زایشی در یوکاریوتهای پیشرفته است. چندین جهش در مخمر که موجب عدم تشکیل هاگ می‌شود شناسایی شده‌اند و پروتئین‌های نوع وحشی که از این ژنها رمز می‌شوند نیز بررسی شده‌اند. این مطالعات موجب شناسایی پروتئین‌های چرخه سلولی مورد نیاز برای میوز گردیده است.

در وضعیتی که مواد غذایی کم است بیان سیکلین‌های G_1 در ساکارومایسیس سرویزیه مهار می‌شود و حرکت طبیعی سلول‌ها در مرحله G_1 برای تکمیل میتوز متوقف می‌شود. در عوض یکسری از پروتئین‌های مورد نیاز برای شروع میوز تولید می‌شوند. یکی از این پروتئین‌ها **Ime2** می‌باشد که یک پروتئین کیناز با تشابه بسیار زیاد با CDK ها می‌باشد که این پروتئین بصورت سیکلین - CDK ای G_1 در ورود به فاز S عمل می‌کند. این پروتئین به این صورت عمل می‌کند. (۱) فسفریلاسیون فاکتور تشخیصی APC/C، (Cdh1)، که با این فسفریلاسیون، APC/C غیرفعال شده و به دنبال آن سیکلین‌های نوع B تجمع می‌یابند. (۲) فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی که بیان ژنهای مورد نیاز در فاز S مانند DNA پلیمرازها و سیکلین‌های فاز S و CDK را برعهده دارند. (۳) فسفریلاسیون مهار کننده فاز S، (Sic1)، که منجر به آزاد شدن کمپلکس‌های سیکلین - CDK فاز S و آغاز همانندسازی DNA در میوز I می‌شود.

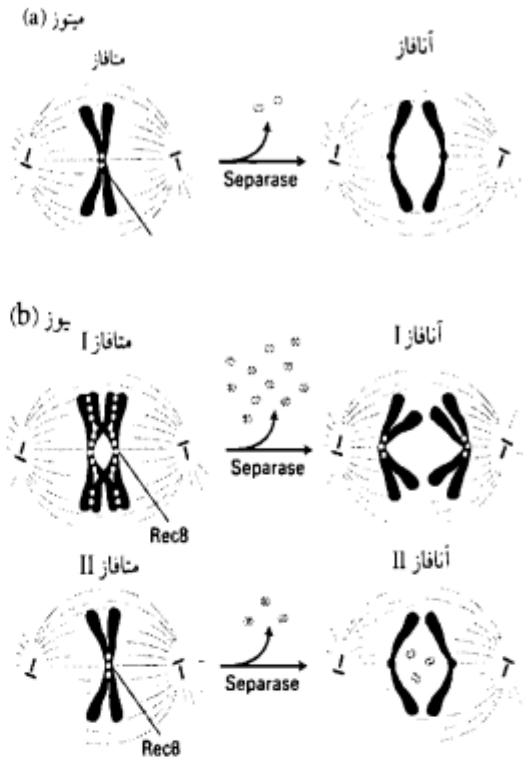
سلول در طول میوز از **Ime2** بجای سیکلین - CDK های G_1 استفاده می‌کند بنابراین فعالیت پروتئین کینازی آن بصورت متفاوتی تنظیم می‌شود. در حالی که رونویسی و ترجمه سیکلین‌های G_1 که برای فعالیت سیکلین - CDK ها مورد نیاز است، در سلول‌هایی که در شرایط گرسنگی قرار گرفته‌اند مهار و رونویسی و ترجمه **Ime2** فعال می‌شود. همچنین فعالیت کینازی **Ime2** بطور متفاوت توسط سیکلین‌های G_1 تنظیم می‌شود. این پروتئین کیناز برای فعالیت کینازی خود نیاز به همکاری با سیکلین نداشته و توسط پروتئین کینازها و فسفاتازهای دیگری که برای تنظیم فعالیت سیکلین - CDK های G_1 مورد نیاز می‌باشند تنظیم نمی‌شوند. مکانیسمی که بوسیله آن همانندسازی DNA در بین میوز I و میوز II مهار می‌شود هم اکنون در حال بررسی است. بعد از آنافاز میوز I فعالیت MPF کاهش نمی‌یابد در حالی که فعالیت این پروتئین بعد از آنافاز میتوز کاهش می‌یابد.

فعالیت MPF در سطح متوسط برای یک میوز II طبیعی مورد نیاز است به نظر می‌رسد که فعالیت MPF به اندازه‌ای کاهش می‌یابد که امکان سیتوکینز را بصورت جزئی و یا کامل می‌دهد ولی آن



▲ **شکل ۴۰-۲۰ (شکل رنگی) اتصال بین کروموزوم‌های همولوگ در متافاز میوز I** اتصال بین کروموزوم‌ها در طول میوز I را می‌توان به سادگی در موجودات زنده‌ای با سانترومرهای آکروسنتریک مانند ملخ مشاهده کرد. کینه‌توکورها در سانترومر کروماتیدهای خواهری به میکروتوبول‌های دوک که از یک دوک قطبی منشأ می‌گیرند متصل می‌شوند. کینه‌توکورهای مادری (قرمز) و پدری (آبی) کروموزوم‌ها به میکروتوبول‌های دوکی که از قطب‌های مخالف سرچشمه می‌گیرند متصل می‌شوند. کروموزوم‌های مادری و پدری در کیاسماتا به یکدیگر متصل می‌باشند. کیاسماتا توسط نوترکیبی بین کروموزوم‌های پدری و مادری و اتصال بین بازوهای کروماتیدهای خواهری که در تمام طول متافاز میوز I پابرجا می‌باشند، بوجود می‌آید. به خاطر داشته باشید که حذف پیوستگی بین بازوهای کروماتیدهای خواهری تنها عاملی است که برای جداشدن کروموزوم‌ها در آنافاز مورد نیاز است.

قدر این فعالیت کاهش نمی‌یابد که امکان فسفریلاسیون فاکتورهای آغازی همانندسازی DNA نیز ایجاد می‌شود. احتمالاً علت روی ندادن همانندسازی بین میوز I و میوز II به این خاطر است که فاکتورهای شروع همانندسازی DNA بصورت شدیداً فسفریله نگه داشته می‌شوند و نمی‌تواند بصورت پیش کمپلکس‌های همانندسازی روی DNA تجمع یابند (شکل ۳۰-۲۰). دومین افزایش فعالیت MPF در زمان تشکیل دوک میوز II رخ می‌دهد. بعد از آن که کینه‌توکورهای خواهری به میکروتوبول‌ها از قطب‌های دوک مخالف متصل شدند، فعالیت Cdc20 دوباره مهار شده و سپاراز فعال گشته و سلول‌ها وارد آنافاز میوز II، تلوفاز و سیتوکینز می‌شوند تاسلول‌های زایشی هاپلوئید را بوجود آورند. (شکل ۳۸-۲۰، مرحله ۵).



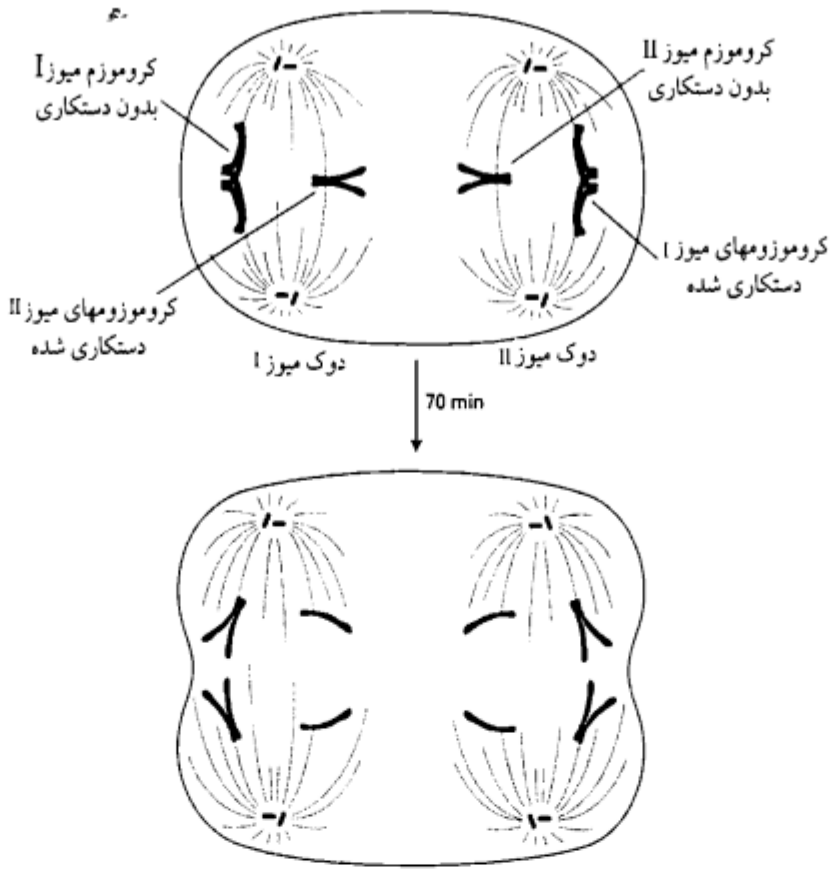
▲ **شکل ۴۱-۲۰ (شکل رنگی) عملکرد کوهسین در طول میتوز و میوز** (a) در طول میتوز کروماتیدهای خواهری که توسط همانندسازی DNA در فاز S بوجود آمده‌اند از ابتدا بوسیله کمپلکس‌های کوهسین در طول کروماتید به یکدیگر متصل‌اند. در طی متراکم شدن کروموزوم‌ها، کمپلکس‌های کوهسین (زرد) به ناحیه سانترومر کروموزوم در متافاز محدود می‌شوند (در شکل نشان داده شده). هنگامی که سپاراز زیر واحد کلیسین از کمپلکس کوهسین را می‌شکند (شکل ۲۳-۲۰ را ملاحظه نمایید) کروماتیدهای خواهری می‌توانند جدا شوند که نشانه‌ای از آغاز آنافاز می‌باشد. (b) در پروفاز میوز I نوترکیبی بین کروماتیدهای پدری و مادری سیناپس را در کروموزوم‌های همولوگ بوجود می‌آورد. در مرحله متافاز، کروماتیدهای هر کروموزوم همانندسازی کرده، در طول خود بوسیله کمپلکس‌های کوهسین متصل یافته‌اند. Rec8 که یک پروتئین ویژه میوز می‌باشد و همولوگ کلیسین به هم میتوزی است در بازوهای کروموزوم شکسته می‌شود اما در سانترومر دست نخورده باقی می‌ماند که این امر جدا شدن جفت کروموزوم‌های همولوگ را در سلول‌های دختری در پی دارد. Rec8 سانترومری در طول میوز II شکسته می‌شود و اجازه می‌دهد تا کروماتیدها جدا شده و وارد سلول‌های دختری شوند.

نوترکیبی و یک زیر واحد کوهسین مختص میوز برای جداسازی خاص کروموزم‌ها در میوز I مورد نیاز می‌باشند.

همانطور که قبلاً بحث شد در متافاز میوز I دو کروماتید خواهری در یک کروموزوم به میکروتوبول‌هایی که از یک قطب دوک سرچشمه گرفته‌اند متصل می‌شوند در صورتی که در میتوز این میکروتوبول‌ها از قطب‌های مخالف سرچشمه گرفته‌اند که نتیجه آن کشیده شدن کروماتیدهای خواهری یک کروموزوم به قطب‌های مخالف است. دو اتصال فیزیکی بین کروموزوم‌های همولوگ به نظر می‌رسد که در برابر نیروی کششی دوک تا آنافاز مقاومت می‌کند: الف) کراسینگ آور بین کروماتیدها، یک کروماتید از یک کروموزوم همولوگ با کروماتید دیگر از کروموزوم همولوگ دیگر و، (ب) نیروی چسبندگی که بین کروماتیدهای خواهری در اطراف نقط کراسینگ آور وجود دارد (شکل ۴۰-۲۰). شواهد عملکرد نوترکیبی طی میوز در ساکارومایسیس سرویزیه از این مشاهدات حاصل می‌شود که هنگامی که نوترکیبی توسط جهش در پروتئین‌های عامل این فرآیند متوقف می‌شود، کروموزوم‌ها بطور تصادفی در طول میوز I جدا می‌شوند، به این مفهوم که کروموزوم‌های همولوگ الزامی برای جدا شدن و حرکت بسوی دوک قطب‌های مخالف ندارند. جدا شدن و حرکت به سمت قطب‌های مخالف زمانی بطور طبیعی رخ می‌دهد که کروماتیدهای جفت کروموزوم همولوگ مادری و پدری به فیبرهای دوک که از قطب‌های مخالف سرچشمه می‌گیرند متصل شوند (شکل ۳۸-۲۰ را ملاحظه کنید، مرحله ❸ و شکل ۴۰-۲۰).

همانطور که در بالا بحث شد برای روی دادن این فرآیندها لازم است که کروموزوم‌های همولوگ در پروفاز میوز I در کنار یکدیگر جفت شوند. پی بردن به این مهم که جهش‌هایی که نوترکیبی را متوقف می‌کند همچنین موجب توقف جدا شدن صحیح کروموزمهای همولوگ می‌شود، دلالت بر اهمیت نوترکیبی در بوجود آمدن سیناپس در کروموزوم‌های همولوگ در ساکارومایسیس سرویزیه دارد. برخلاف آنافاز میتوز (شکل ۴۱a-۲۰)، در شروع آنافاز میوز I، اتصال عرضی بین بازوهای کروموزوم بوسیله سپاراز شکسته شده و اجازه جدا شدن کروموزوم‌های همولوگ را می‌دهد اما کمپلکس‌های کوهسین در سانترومر باقی می‌مانند (شکل ۴۱b-۲۰). حفظ چسبندگی سانترومر در طول میوز I برای جدا شدن درست کروماتیدها در طول میوز II لازم است. مطالعات بر روی اسکیزوساکارومایسیس پمبه جهش یافته نشان داد که زیر واحد کلیسین[1] از کوهسین خاص میوز (شکل ۲۳-۲۰ را ملاحظه کنید) که Rec8 نام دارد اتصال سانترومری را بین کروماتیدهای خواهری در طول میوز I حفظ می‌کند. Rec8 که تنها در میوز بیان می‌شود،

1- Kleisin



▲ شکل تجربی ۴۲-۲۰: جابجایی و پیوستگی کروموزوم‌های میوزی توسط پروتئین‌های اتصال یافته به کروموزوم‌ها تعیین می‌شود. اسپرماتوسیت‌های ملخ در میوز I و II با هم ادغام شده‌اند تا هر دو نوع دوک با کروموزوم‌های اتصال یافته به آنها در یک سلول ادغامی منفرد داشته باشد. سپس از یک سوزن ریز برای حرکت دادن بعضی از کروموزوم‌های میوز I و میوز II، از یک دوک به دوک دیگر استفاده شد و کروموزوم‌های دیگر همچنان دست نخورده به دوک طبیعی خود متصل بودند. بعد از ۷۰ دقیقه هر دو دوک با کروموزوم‌های متصل شده به آن بطور کامل در آنافاز جابجا شدند. کروموزوم‌های جفت شده میوز I بطور طبیعی جدا شدند (یک جفت همولوگ به سمت یک دوک قطبی و جفت همولوگ دیگر به سمت دوک قطبی دیگر) چه آنهایی که به دوک میوز I (چپ) متصل بودند و چه آن‌هایی که به دوک میوز II (راست) متصل بودند. بطور مشابه کروموزوم‌های میوز II بطور طبیعی مستقل از آنکه به کدام دوک متصل بودند از یکدیگر جدا شدند (یک کروماتید به سمت دوک قطبی و دیگری به سمت دوک قطبی دیگر). این نتایج نشان داد که اتصال کینه‌توکورها با میکروتوبول‌های دوک و پایداری کوهسین‌های اتصال یافته به کروموزوم‌ها توسط فاکتورهایی که به کروموزوم‌ها متصل است تعیین می‌شود نه توسط دوک‌ها یا ترکیبات محلول در سلول‌ها در میوز I و II.

مشابه زیرواحدی از کوهسین است که حلقه کوهسین را در کمپلکس کوهسین سلول‌هایی که در میتوز قرار دارند ، می‌بندد. آزمایشات جایابی ایمنی بر روی اسکیزوساکارومایسیس پمبه نشان داد که در طول ابتدای آنافاز میوز I، Rec8 از بازوهای کروموزوم جدا شده ولی همچنان در محل سانترومر باقی می‌ماند. در اوایل آنافاز میوز II؛ Rec8، سانترومری توسط سپاراز تجزیه شده و کروماتیدها (همانطور که در میتوز روی می‌دهد، (شکل ۴۱b-۲۰ پایین)، جدا می‌شوند. Rec8 در ساکارومایسیس سرویزیه نشان داده شده است که جایگاه و عملکرد مشابه‌ای با ساکارومایسیس سرویزیه دارد و همچنین همولوگ‌های Rec8 در موجودات زنده پیشرفته‌تر نیز شناسایی شده‌اند. در نتیجه فهم تنظیم شکست کمپلکس کوهسین Rec8 در فهم جدا شدن کروموزم‌ها در میوز I بسیار مهم می‌باشد.

آزمایشات دستکاری که بر روی اسپرماتوژنز ملخ صورت گرفت، نشان داد فاکتورهای همراه با کروموزوم، Rec8 سانترومری را از شکست در طول میوز I حفاظت می‌کند، اما این حفاظت از شکست در میوز II صورت نمی‌گیرد. این آزمایشات همچنین ثابت کرد که اتصال کینه‌توکورهای خواهری به میکروتوبول‌های حاصل از یک دوک قطبی در طول میوز I در نتیجه فاکتورهای همراه با کروموزوم‌ها است (شکل ۴۲-۲۰). در صورتی که این میکروتوبول‌ها در مرحله میوز II و میتوز از قطب‌های مخالف به کینه‌توکورها اتصال می‌یابند. لذا بنظر

می‌رسد که کراسینگ آور، Rec8 و پروتئین‌های ویژه متصل به کینه‌توکور در تمام یوکاریوت‌ها در مرحله میوز دارای عملکرد می‌باشند.

صفات ویژه‌ای از Rec8 موجب تنظیم شکست آن در میوز I و میوز II می‌شود

مکانیسمی که Rec8 را در ساکارومایسیس سرویزیه از تجزیه شدن در ناحیه سانترومر در طول میوز I محافظت می‌کند مشابه مکانیسمی است که زیر واحد کلیسین در سانترومر را در طول میتوز محافظت می‌کند. به یاد آورید که در طول پروفاز میتوز پروتئین کینازهایی که توسط سیکلین ـ CDK میتوزی فعال می‌شوند، کوهسین‌ها را در بازوهای کروماتیدی فسفریله می‌کنند (این امر باعث جداشدن کروماتید می‌شود) و پیوستگی بازوهای کروماتیدی را در متافاز بسیاری از موجودات زنده کاهش می‌دهند. به هر حال کوهسین در سانترومرها حفظ می‌شوند چراکه یک ایزوفرم از پروتئین فسفاتاز (PP2A)2A در سانترومر کروماتین حضور دارد که کوهسین‌ها را در وضعیت هیپوفسفریله نگه می‌دارد تا از کروماتین جدا نشوند (شکل ۲۰-۲۲ را ملاحظه کنید). در نتیجه وقتی آخرین کینه‌توکور بطور صحیح به میکروتوبول‌های دوک متصل است مهار Cdc20 به APC/C متصل می‌شود که این امر باعث پلی یوبی کوئیتینه شدن سکورین می‌شود. این عمل سبب آزاد شدن سپاراز و در نتیجه فعال شدن آن می‌شود باعث شکسته شدن کلیسین چه در وضعیت فسفریله و غیر فسفریله می‌شود. با شکسته شدن کلیسین چسبندگی در سانترومر حذف می‌شود و این امر موجب جدا شدن کروماتیدها در آنافاز می‌شود (شکل ۲۰-۴۱a را ملاحظه کنید).

این مکانیسم در میوز I متفاوت است زیرا وقتی که Rec8 بجای کلیسین میتوزی در کمپلکس کوهسین قرار می‌گیرد، کمپلکس کوهسین در پروفاز زمانی که بوسیله پروتئین کیناز میتوزی فسفریله می‌شود، جدا نمی‌گردد. همچنین Rec8 با کلیسین میتوزی در این ویژگی متفاوت است که باید توسط پروتئین کیناز میتوزی فسفریله شود تا توسط سپاراز جدا شود. در طول میوز I ایزوفرم مختص سانترومری PP2A توسط یک پروتئین اتصال دهنده که شوگوشین[1] نام دارد (ژاپنی "روح محافظ") به سانترومر کروماتین متصل می‌شود. اما شوگوشین در میوز II بیان نمی‌شود.

این ویژگی‌های Rec8 و شوگوشین برای جداسازی اختصاصی کروموزوم‌ها در میوز I مورد نیاز است. کوهسین که کروماتیدهای دختری را به یکدیگر متصل نگه می‌دارد، در بازوهای کروموزوم به علت حضور Rec8 در کمپلکس کوهسین حفظ می‌شود. حضور Rec8 در این کمپلکس مانع جدا شدن آن در هنگامی می‌شود که توسط پروتئین کیناز میتوزی فسفریله می‌شود. وقتی مهار Cdc20 برداشته می‌شود سپاراز فعال می‌گردد و Rec8 را می‌شکند چرا که فسفریلاسیون مورد نیاز توسط پروتئین‌های کینازهای میتوزی صورت گرفته است. این فرآیند سبب از دست رفتن پیوستگی در بازوهای کروماتیدهای خواهری شده که تنها عامل مورد نیاز برای جدا شدن کروموزوم‌های همولوگ در آنافاز میوز I می‌باشد (شکل ۲۰-۴۰ و شکل ۲۰-۴۱b بالا). با این حال پیوستگی بین سانترومر کروماتیدهای خواهری چون حفظ می‌گردد. شوگوشین در میوز I بیان شده و به PP2A در سانترومر متصل می‌شود. و در آن‌جا PP2A، Rec8 را دفسفریله می‌کند و آن را در مقابل شکست توسط سپاراز، مقاوم می‌کند. در میوز II پیوستگی در بین بازوهای کروماتید وجود ندارد زیرا کمپلکس کوهسین در آنافاز میوز I از بازوها حذف شده است. چون شوگوشین در میوز II بیان نمی‌شود، PP2A در کروماتین سانترومری قرار نمی‌گیرد و کوهسین سانترومری توسط فسفریلاسیون با پروتئین کیناز میتوزی که بوسیله دومین افزایش در فعالیت سیکلین - CDKی میتوزی در طول پروفاز میوز II فعال می‌شود، محافظت نمی‌گردد. در نتیجه وقتی سپاراز در انتهای متافاز میوز II فعال می‌شود، Rec8 موجود در کوهسین سانترومری شکسته می‌شود تا اجازه حرکت و کشیده شدن کروماتیدهای خواهری به سمت دوک‌های قطبی مخالف، داده شود.

کمپلکس مونوپولین کینه‌توکورهای خواهری را در میوز I به یک جهت سوق می‌دهد

همانطور که قبلاً بحث شد در میتوز و میوز II کینه‌توکورهای خواهری به میکروتوبول‌های دوکی که از دوک قطبی مخالف سرچشمه می‌گیرند متصل می‌شوند. این کینه‌توکورها را کینه‌توکورهای دو طرفه گویند. این دو طرفی بودن برای جدا شدن کروماتیدهای خواهری به سمت سلول‌های دختری متفاوت الزامی است. در مقابل در متافاز میوز I، کینه‌توکورهای خواهری به میکروتوبول‌های دوکی که از یک دوک قطبی سرچشمه می‌گیرند، متصل می‌شوند. این کینه‌توکورها را یک طرفه می‌نامند. اتصال کینه‌توکورهای خواهری به میکروتوبول‌های صحیح در میوز I و میوز II برای جداشدن صحیح کروموزوم‌ها در میوز حیاتی می‌باشد.

1- shugoshin

شناسایی یک پروتئین مورد نیاز برای اتصال کینه‌توکورهای خواهری در ساکارومایسیس سرویزیه با تجزیه و تحلیل، میکروآرایه DNA از ساکارومایسیس سرویزیه که بیان ژنهای مشخصی را در میوز و نه در میتوز را نشان داده آغاز شد. از بین بردن هر یک از این ژنها نشان داد که وقتی MAM1[1] (اتصال میکروتوبول تک قطبی در طول میوز I) که پروتئین به نام مونوپولین[2] را رمزدهی می‌کند، غیرفعال شدن کروماتیدهای خواهری در متافاز میوز I با میکروتوبول‌های دوکی که از دوکهای قطبی مخالف سرچشمه گرفته‌اند، اتصال یافتند، چنان که گویی آنها کروماتیدهای میتوزی یا کروماتیدهای میوز II بودند.

شناسایی پروتئین‌هایی که با مونوپولین میانکنش می‌دهند و همچنین مطالعات میکروسکوپ فلورسانس در داخل بدن موجود زنده با پروتئین‌هایی که با GFP نشاندار شده‌اند، نشان داد که دو پروتئین همراه با مونوپولین، کمپلکس مونوپولین را بوجود می‌آورند که این کمپلکس در کینه‌توکورهای سلول‌های میتوزی و سلول‌های میوز II نیز یافت می‌شود. این نتایج منجر به ارائه مدلی شد که در آن کمپلکس مونوپولین جایگاههای اتصال میکروتوبول در کینه‌توکورهای خواهری را در یک جهت می‌فشرد. بطوریکه آنها به انتهای مثبت میکروتوبول‌هایی که از یک دوک قطبی می‌آیند متصل می‌شوند. در غیاب مونوپولین در میوز II و سلول‌های میتوزی زیر واحدهای دیگر کمپلکس مونوپولین که بیان شده‌اند، جایگاههای اتصال میکروتوبول‌های دوکی را در کروماتیدهای خواهری در جهت‌گیری مخالف قرار می‌دهند، در نتیجه آنها تنها می‌توانند به انتهای مثبت میکروتوبول‌هایی که از جهت‌های مخالف می‌آیند، متصل گردند.

فشار موجود بر میکروتوبول‌های دوک در اتصال صحیح دوک نقش دارد

آزمایشات ریزدستکاری و ژنتیکی دیگر بر روی مخمر شواهد قابل توجهی مبنی بر این فراهم آورد که اتصال پایدار میکروتوبول‌های دوک به کینه‌توکور و پایداری خود میکروتوبول‌ها نیازمند آن است که میکروتوبول‌ها در طول متافاز تحت فشار و کشش باشند. اگر میکروتوبول‌هایی که از دوک قطبی نادرست سرچشمه گرفته‌اند در اوایل متافاز به کروماتیدهای خواهری متصل شوند، پروتئین‌های حرکتی و کوتاه شدن میکروتوبول‌ها فشاری را بر روی میکروتوبول‌ها ایجاد نمی‌کنند چراکه هر دو کینه‌توکور در حال کشیده شدن به یک سمت هستند. اما وقتی اتصال به میکروتوبول‌ها از قطب‌های صحیح صورت گیرد فشار بر روی آنها گسترش می‌یابد چراکه کینه‌توکورها در حال کشیده شدن به سمت مخالف می‌باشند. در طول متافاز میوز I، کینه‌توکوری که به میکروتوبول متصل است نیز تحت فشار قرار می‌گیرد (حتی کینه‌توکورهای یک طرف از کروماتیدهای خواهری که به میکروتوبول‌هایی که از یک دوک قطبی می‌آیند) چرا که کیاسماتایی که توسط نوترکیبی بین کروموزوم‌های همولوگ بوجود می‌آید از کشیده شدن آنها به سمت قطب‌ها جلوگیری می‌کند (شکل ۴۰-۲۰). چون کینه‌توکوری که در غیاب فشار و کشش به میکروتوبول‌ها متصل است ناپایدار و متزلزل می‌باشد در نتیجه کینه‌توکورهایی که به فیبرهای دوک نادرست اتصال یافته‌اند میکروتوبول‌های نادرست را رها می‌کنند و این امر فرصت اتصالهای دوباره را به میکروتوبول‌ها می‌دهد تا اینکه در اثر اتصال صحیح فشار بوجود آید. هنگامی که فشار بوجود آمد، اتصال میکروتوبول به کینه‌توکور پایدار می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۸-۲۰

میوز: نوع خاصی از تقسیم سلولی

- میوز شامل یک چرخه همانندسازی کروموزومی است که به دنبال آن دو چرخه از تقسیم سلولی به منظور ایجاد سلول‌های زایای هاپلوئید از سلول پیش میوزی دیپلوئید انجام می‌گیرد.
- در طی میوز I، کروموزوم‌های همولوگ همانندسازی شده در امتداد طولشان در یک فرآیندی به نام سیناپس قرار می‌گیرند. حداقل یک رویداد نوترکیبی بین کروماتیدهای کروموزومی همولوگ به طور ثابت رخ می‌دهد.
- اغلب پروتئین‌های چرخه سلولی که در سلول‌های تقسیم شونده توسط میتوز عمل می‌کنند در سلول‌های تحت میوز نیز عمل می‌کنند ولی برخی پروتئین‌ها منحصر به میوز هستند.
- در ساکارومیسیس سرویزیه بیان سیکلین‌های G_1 در کل میوز مهار می‌شود. Ime2 مختص میوزی، عمل کمپلکس‌های سیکلین - CDK ی G_1 را در شروع همانندسازی DNA در طی میوز I انجام می‌دهد.
- در ساکارومیسیس سرویزیه نوترکیبی (کراسینگ آور) بین کروماتیدهای همولوگ والدینی رخ می‌دهد و کوهسین بین کروماتیدهای دور از کراس آور ارتباط ایجاد می‌کند که مسئول

1- Monopolar Microtubular Attachment During Meionis 1

2- Monopolin

نگهداری کروموزم‌های همولوگ در کنار یکدیگر در طی پروفاز و متافاز میوز I است. یک زیرواحد ویژه کوهسین (Rec8) بازیرواحد کوهسین کلیسین در طی میوز جابجا می‌شود.

■ در شروع آنافاز اولیه میوز I، Rec8 در بازوهای کروموزومی شکسته می‌شود ولی یک پروتئین مختص میوزی مرتبط به کینه توکور Rec8 را از شکست در ناحیه سانترومری حفاظت می‌کند. در نتیجه، کروماتیدهای کروموزوم‌های همولوگ در طی تقسیم در میوز I به صورت متصل به هم باقی می‌مانند. شکست Rec8 سانترومرهای در طی آنافاز میوز II اجازه می‌دهد که کروماتیدهای مجزا به داخل سلول‌های زایا بروند (شکل ۲۰-۴۱b را ملاحظه کنید).

■ مونوپولین (کمپلس پروتئینی مختص میوزی دیگر) برای اینکه هر دو کروماتید کروموزوم‌های همولوگ به میکروتوبول‌های منشاء گرفته از قطب‌های دوکی یکسان در طی میوز I متصل شوند مورد نیاز می‌باشد.

چشم‌اندازی به آینده

گامهای برجسته در تحقیقات چرخه سلولی در ۲۵ سال اخیر منجر به طرح کنترل چرخه سلولی شده است که در شکل ۲۰-۳۴ آورده شده است. یک منطق زیبا، این کنترل‌های مولکولی را تحت سیطره خود دارد. هر رویداد تنظیمی دو عملکرد مهم دارد: فعال‌کردن یک مرحله از چرخه سلولی و آماده کردن سلول برای رویداد بعدی چرخه، این استراتژی تضمین می‌کند که فازهای این چرخه به ترتیب صحیح انجام بگیرد.

گرچه منطق کلی تنظیم سلولی به نظر می‌رسد که بطور خوبی شناخته شده است، بسیاری از جزئیات اساسی کشف نشده است. برای مثال، اگر چه محققان برخی از اجزاء کمپلکس پیش همانندسازی را شناسایی کرده‌اند که می‌بایست توسط کمپلکس‌های سیکلین - CDK فاز S فسفریله شوند تا همانندسازی DNA را شروع کنند، سایر اجزاء کشف نشده‌اند. همچنانکه قبلاً اشاره شد، اخیراً پیشرفت زیادی در شناخت سوبستراهای فسفریله شده توسط کمپلکس‌های سیکلین - CDK میتوزی انجام گرفته است. کار زیادی به منظور فهم اینکه چگونه تغییر این پروتئین‌ها منجر به متراکم‌شدن کروموزوم و دوباره سازمانبندی میکروتوبول‌ها که نتیجه‌اش تجمع دوک میتوزی است، باقی‌مانده که انجام شود. خیلی زیاد مانده که چگونگی کنترل فعالیت‌های Wee1 کیناز و Cde25 فسفاتاز درک شود (پروتئین‌های اخیر فعالیت کینازی زیرواحد CDK را در اغلب کمپلکس‌های سیکلین - CDK تنظیم می‌کنند.

اخیراً درباره عمل نقاط کنترل چرخه سلولی مطالب زیادی کشف شده است ولی مکانیسم‌هایی که ATM و ATR را در نقطه کنترل آسیب DNA فعال می‌کنند کمتر شناخته شده‌اند. همچنین، مطالب زیادی برای یادگیری در مورد کنترل و مکانیسم تنظیم Mad2 در نقطه کنترل تجمع دوک و همچنین نقش Cdc14 در نقطه کنترل تقسیم کروموزومی در سلول‌های عالی باقی مانده است. همچنان ما در فصل بعد یاد می‌گیریم که تقسیم سلولی نامتقارن نقش اساسی را در تکوین طبیعی موجودات زنده پرسلولی بازی می‌کند. بسیاری از سوالات در مورد چگونگی مشخص شدن سیتوکینز و جایگیری کروموزوم‌های دختری در سلول‌هایی که به طور نامتقارن تقسیم می‌شوند، باقی مانده است. همچنین مکانیسم‌هایی که تقسیم منحصر به فرد کروماتیدها را در طی میوز I تحت سیطره خود می‌گیرند، هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌اند.

فهم این مشخصات جزئی از کنترل چرخه سلولی نتایج بارزی مخصوصاً برای درمان سرطانی‌ها خواهد داشت. سلول‌های سرطانی اغلب در نقاط کنترل چرخه سلولی دچار نقص می‌شوند که این امر منجر به تجمع جهش‌های چندگانه و بازآرایی‌های DNA می‌شود که نتیجه‌اش فنوتیپ سرطانی است. به هر حال، غیاب این نقاط کنترلی می‌تواند انواع خاصی از سرطان‌ها را به آسیب شدید DNA تحمل‌پذیر کند که توسط پرتو درمانی و شیمی درمانی القا می‌شود. سلول‌های طبیعی نقاط کنترلی چرخه سلولی را فعال می‌کنند که چرخه سلولی را تا تعمیر آسیب DNA متوقف می‌کند ولی سلول‌های سرطانی این عمل را انجام نداده و نتیجه آن متحمل‌شدن آسیب ژنتیکی کافی برای القای آپوپتوز است. اگر در مورد کنترل چرخه سلولی و نقاط کنترلی بیشتر فهمیده شود، طراحی استراتژی‌های درمانی موثرتر امکان‌پذیر خواهد بود (مخصوصاً بر علیه سرطانی که تا حد زیادی به درمان‌های معمول امروزی مقاوم است). به نظر می‌رسد که درک بهتر از فرآیندهای مولکولی دخیل، اجازه طراحی درمانی‌های موثرتر را در آینده خواهد داد.

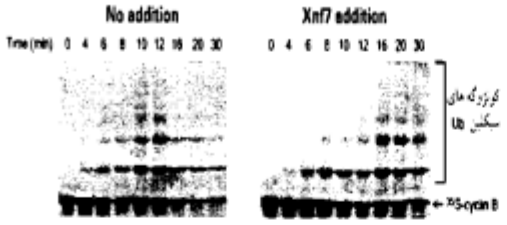
تجزیه و تحلیل داده‌ها

اغلب پروتئین‌های تنظیم‌کننده گذر از چرخه سلولی مشخص شده‌اند. اخیراً پروتئین جدیدی به نام XnF1 در عصاره‌های تخم‌های زنوپوس شناسایی شده است. این پروتئین به کمپلکس

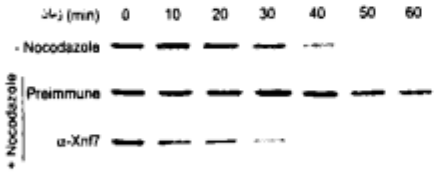
پیشرنده آنافاز /سیکلوزوم متصل می‌شود. برای مشخص نمودن عملکرد این پروتئین مطالعاتی انجام گرفته که در آن Xnf7 به عصاره‌ها مقدار آن افزایش یافت. نتایج گذر از میتوز سپس بررسی شد.

a. عصاره‌های تخم زنوپوس (متوقف شده در متافاز) Xnf1 شان با آنتی‌بادی و یا حذف mork (نمونه‌ها مثل نمونه‌های اول اما بدون آنتی‌بادی Xnf1 تیمار شدند) حذف شده و سپس با افزودن Ca^{2+} از توقف متافازی رها شدند. نمونه‌هایی از عصاره در زمان‌های مختلف بعد از افزودن Ca^{2+} برداشته شد و مقادیر سیکلین B تعیین شد که در پائین لکه‌گذاری وسترن مشاهده می‌شود. چه اطلاعاتی این اطلاعات درباره عملکرد احتمالی Xnf1 فراهم می‌کنند؟

b. در مطالعات دیگر Xnf1 به عصاره‌های تخم زنوپس متوقف شده در متافاز افزوده شد بطوریکه مقدار کلی این پروتئین در عصاره‌ها بیش از حد طبیعی شد. عصاره‌ها با افزودن Ca^{2+} از توقف رهاشده و سپس در زمان‌های مختلف بعد از رهاشدن: یوبی‌کوئیتینه شدن سیکلین B بررسی شد (کونژوگه‌های Ub-سیکلین) .منطق آزمودن یوبی‌کوئیتینه شدن چیست؟ با استفاده از شکل زیر تعیین کنید این مطالعات چه اطلاعات بیشتری نسبت به اطلاعات به دست آمده در قسمت a دارند؟



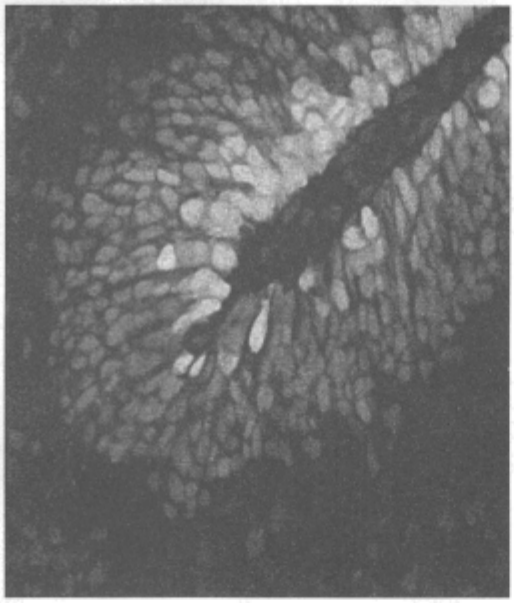
c. نقطه کنترل دوک از پیشروی سلول‌های حاوی کینه‌توکورهای متصل‌شده به آنافاز ممانعت می‌کند. بنابراین در سلول‌هایی که این نقطه کنترل فعال شده است به آنافاز وارد نشده و سیکلین B تجزیه نمی‌گردد. نوکودازول (دارویی که از تجمع میکروتوبول جلوگیری می‌کند) می‌تواند برای فعال نمودن نقطه کنترل در آن استفاده شود. سلول‌ها در نوکودازول در اوایل میتوز مهار می‌شوند چون آنها نمی‌توانند دوک تشکیل دهند و بنابراین همه کینه توکورها متصل نشده باقی می‌مانند. برای تعیین اینکه آیا Xnf7 برای نقطه کنترل در آن عملکرد مورد نیاز است، عصاره‌های تخم زنوپوس متوقف شده در متافاز با روش‌های متفاوتی تحت تأثیر قرار گرفتند (شکل زیر را مطالعه کنید) تیمار نشده (نوکودازول-) یا تیمارشده با نوکودازول و یا حذف Mock (پیش‌ایمن) یا حذف با آنتی بادی Xnf7 (α-Xnf7). عصاره‌ها سپس با Ca^{2+} تیمار شدند تا از توقف رها شوند و سیکلین B نمونه‌هایی از عصاره‌ها همانطوریکه روی لکه‌گذاری وسترن در زیر نشان داده شده در زمان‌های مختلفی بررسی گردید، شما با توجه به این اطلاعات چه نتیجه درباره Xnf7 می‌گیرید؟



فصل

۲۱

تولد، رده‌بندی و مرگ سلولی



(شکل رنگی) سلول‌ها در مغز در حال تکوین به وجود می‌آیند. همه هسته‌ها با رنگ قرمز نشاندار شده است. سلول‌های سبز تقسیم می‌شوند و به لایه‌های داخلی بافت مهاجرت می‌کنند.

رئوس مطالب

۲۱-۱ تولد سلول‌ها: سلول‌های بنیادی، آشیانه‌یابی و رده‌بندی شدن

۲۱-۲ تخصصی شدن نوع سلول در مخمر

۲۱-۳ تخصصی شدن و تمایز ماهیچه

۲۱-۴ تنظیم تقسیم سلولی نامتقارن

۲۱-۵ مرگ سلولی و تنظیم آن

در طی تکامل موجودات زنده پرسلولی، مکانیسم‌های تازه‌ای به منظور تنوع دادن به انواع سلولی، هماهنگ کردن تولید آن‌ها، و همچنین تنظیم اندازه، تعداد و سازماندهی سلول‌ها به بافت‌های عملکردی و حذف سلول‌های خارجی (بیگانه) یا سلول‌های پیر حاصل شده است. پیام‌رسانی بین سلول‌ها خیلی مهمتر از آن برای موجودات زنده تک‌سلولی بود. طرز تولید مثل با تخصصی شدن برخی از سلول‌ها به صورت **سلول‌های زایا** عوض شد (مانند تخمک‌ها و اسپرم که باعث ایجاد موجودات زنده جدید می‌شوند) که از سایر سلول‌های بدن که سلول‌های سوماتیک نامیده می‌شوند، متفاوت هستند. در شرایط طبیعی سلول‌های سوماتیک هرگز به یک فرد جدید منتقل نمی‌شوند.

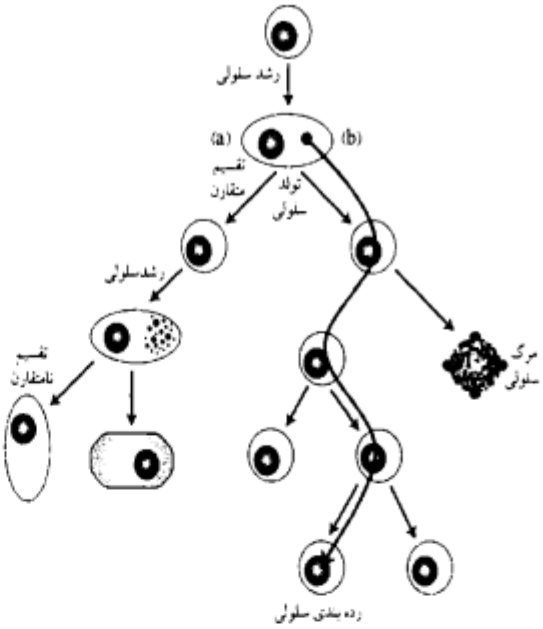
تشکیل بافت‌ها و اندامها در طی **تکوین**[1] موجودات زنده پرسلولی تا حدی به الگوهای خاصی تقسیم سلولی میتوزی بستگی دارد. یک سری از چنین تقسیمات سلولی وابسته به یک خانواده **رده‌بندی**[2] نامیده می‌شود. یک رده سلولی ترتیب تولد سلول‌ها، محدودیت پیش‌رونده توان تکوینی آن‌ها و **تمایز** به انواع سلولی تخصص‌یافته را ردیابی می‌کند

سلول‌های در مغز در حال تکوین به وجود می‌آیند، همه هسته‌ها با رنگ قرمز نشاندار شده است، سلول‌های سبز تقسیم می‌شوند و به لایه‌های داخلی بافت مهاجرت می‌کنند.

(شکل ۱-۲۱). رده‌های سلولی توسط فاکتورهای داخل سلولی (سلول‌هایی که بر اساس پیش‌زمینه و تنظیم‌کننده‌های داخلی‌شان عمل می‌کنند) و همچنین توسط فاکتورهای خارج سلولی مانند پیام‌های سلول به سلول و پیام‌های محیطی، کنترل می‌شوند. یک رده سلولی یا سلول‌های بنیادی (سلول‌های تخصص نیافته‌ای که می‌توانند به طور بالقوه خودشان را تولید کرده و به طور نامحدود، باعث ایجاد سلول‌های تخصص یافته شوند) شروع می‌شود. اسم این سلول‌ها از ساقه گیاه که به طرف بالا رشد می‌کند گرفته شده است و باعث ایجاد بیشتر ساقه می‌شود، در حالیکه شاخه‌ها و برگ‌ها را به اطراف رشد می‌دهد. یک رده سلولی سرانجام باعث ایجاد سلول‌های تمایز یافته نهایی مانند سلول‌های پوستی، نورونها یا سلول‌های ماهیچه‌ای می‌شود. تمایز نهایی عموماً برگشت‌ناپذیر است و باعث ایجاد سلول‌هایی با ویژگی زیاد می‌شود که اغلب نمی‌توانند تقسیم شوند، آنها زنده می‌مانند و عملشان را در زمان‌های مختلف انجام می‌دهند و سپس می‌میرند. بسیاری از رده‌های سلولی دارای سلول‌های بینابینی هستند که سلول‌های پیش‌ساز[3] یا سلول‌های پیش زاد به آنها اطلاق می‌شود و اگر به سرعت تقسیم شوند

1- Development 2- Cell lineage

3- Precursoe cells



▲ **شکل ۱-۲۱ نمایی از تولد، رده‌بندی و مرگ سلول‌ها** به دنبال رشد، سلول‌ها در نتیجه تقسیم سلولی متقارن و نامتقارن حاصل می‌شوند. (a) سلول‌های دختری حاصل از تقسیم متقارن، مشابه همدیگر و سلول والدی هستند. چنین سلول‌های دختری اگر در معرض پیامهای مختلف قرار گیرند می‌توانند سرنوشت‌های مختلفی داشته باشند دو سلول دختری که از تقسیم نامتقارن حاصل شده‌اند از موقع تولدشان متفاوت هستند و در نتیجه سرنوشت‌های مختلفی دارند تقسیم نامتقارن به طور معمول توسط قرارگیری مولکول‌های تنظیمی در یک قسمت از سلول والدی شروع می‌شود. (b) یک سری تقسیمات سلولی متقارن و نامتقارن یک رده‌بندی سلولی نامیده می‌شود که باعث ایجاد هر کدام از انواع سلولی تخصص‌یافته موجود در یک موجود زنده پرسلولی می‌شود. الگوی رده‌بندی سلولی می‌تواند تحت کنترل ژنتیکی باشد. مرگ برنامه دار سلولی در طی تکوین طبیعی (مثلاً در شبکه‌ای که وقتی که انگشت‌ها رشد می‌کنند، تشکیل می‌گردد) و همچنین در پاسخ به عفونت یا سموم اتفاق می‌افتد. توالی‌هایی از حوادث برنامه‌دار خاص، آپوپتوز نامیده می‌شود که در این حالات فعال می‌شود.

سلول‌های تشدیدشونده موقت (TA)[1] نامیده می‌شوند. توانایی چنین سلول‌های بینابینی برای تشکیل انواع مختلف از سلول‌های تمایز یافته محدودتر از سلول‌های بنیادی است که از آنها حاصل می‌شوند اگر چه برخی از محققان بین سلول‌های اولیه[2] و سلول‌های پیش‌ساز تمایز قائل می‌شوند ولی ما از این واژه‌ها به صورت مترادف هم استفاده خواهیم کرد. زمانی که یک نوع سلول پیش‌ساز جدید به وجود می‌آید اغلب **فاکتورهای رونویسی** مشخص سرنوشتش را تعیین می‌کنند. این فاکتورهای رونویسی ژن‌هایی را که فرآیندهای تمایز را به راه می‌اندازند، به طور هماهنگ فعال یا مهار می‌کنند. برای مثال تعدادی از فاکتورهای رونویسی تنظیمی انواع آمیزش متفاوت از مخمر در حال جوانه‌زنی را ایجاد می‌کنند و تعداد کمی از چنین فاکتورهایی که در این توالی تولید می‌شوند مراحل تشکیل سلول‌های ماهیچه تمایز یافته از پیش‌سازها را آغاز می‌کنند. ما این مثال‌ها را در فصل حاضر توضیح می‌دهیم.

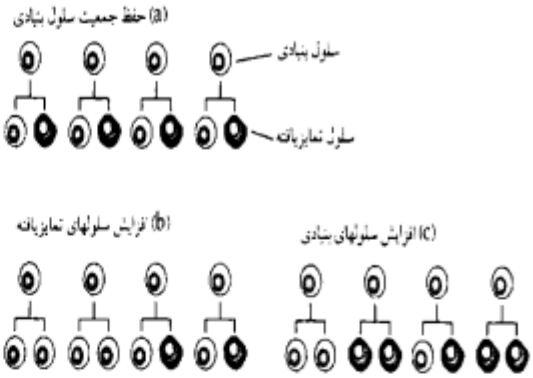
معمولاً فکر می‌کنیم سرنوشت سلولی به انواع سلولی تمایز یافته ختم می‌شود. یک سرنوشت سلول تمایز یافته **مرگ سلولی برنامه‌دار**، در تشکیل و حفظ بیشتر بافت‌ها اساسی است یک سیستم تنظیمی ژنتیکی دقیق (با توازن‌ها و تنظیمات) مرگ سلولی را کنترل می‌کند که جدا از برنامه‌های ژنتیکی است که تمایز سلولی را کنترل می‌کنند. در این فصل، ما چرخه زیست سلول‌ها (تولد آنها، الگوی تقسیم و مرگ آن‌ها) را مورد توجه قرار می‌دهیم. این خصوصیات زیست‌شناسی سلولی با زیست‌شناسی تکوینی تلفیق می‌شود و از مهمترین فرآیندهایی است که توسط مسیرهای پیام‌رسانی توضیح داده شده در فصل‌های قبلی تنظیم می‌شود.

۱-۲۱ تولد سلول‌ها: سلول‌های بنیادی، آشیانه‌یابی و رده‌بندی

بسیاری از توصیفات در مورد تقسیم سلولی بر این امر دلالت دارد که سلول والدی باعث ایجاد دو سلول دختری می‌شود که دقیقاً از لحاظ ظاهر و رفتار شبیه سلول والدی هستند. این تقسیم، تقسیم متقارن است و سلول حاصل همان خصوصیات سلول والدی را کسب می‌کند. ولی اگر این امر همیشه اتفاق می‌افتاد هیچ‌کدام از صدها نوع سلول تمایز یافته که در موجودات پیچیده وجود دارند تشکیل نمی‌شدند. اختلافات در میان سلول‌ها می‌تواند وقتی به وجود آید که دو سلول دختری مشابه براساس دریافت پیامهای تکوینی یا محیطی از هم تنوع حاصل می‌کنند. به عبارتی دو سلول دختری ممکن است از موقع تولدشان فرق کنند و هر کدام قسمت‌های متفاوتی از سلول والدی را به ارث ببرند (شکل ۱-۲۱ را ملاحظه کنید). سلول‌های دختری که توسط چنین تقسیم سلولی نامتقارن ایجاد شده‌اند، ممکن است در اندازه، شکل یا ترکیب متفاوت باشند یا ژن‌هایشان در حالات مختلفی از فعالیت باشند. اختلافات در این پیام‌های داخلی، سرنوشت‌های

1- Transient amplifying (TA) cells

2- Progenitor cells



▲ **شکل ۲-۲۱ الگوی تقسیم سلول بنیادی.** تقسیمات سلول‌های بنیادی بایستی جمعیت آنها را حفظ کند. برخی اوقات افزایش تعداد سلول‌های بنیادی، ایجاد سلول‌های تمایز یافته را خواهد کرد. (a) سلول‌های بنیادی که متحمل تقسیمات نامتقارن می‌شوند یک سلول بنیادی و یک سلول تمایزیافته را ایجاد می‌کنند. این امر جمعیت سلول‌های بنیادی را افزایش نمی‌دهد (b) برخی از سلول‌های بنیادی در یک جمعیت ممکن است به طور متقارن تقسیم شوند و جمعیت‌شان را افزایش دهند و این عمل ممکن است در تکوین طبیعی یا در طی ترمیم آسیب مفید باشد، در حالیکه در همان زمان سایر سلول‌ها مانند سلول‌های (a) به صورت نامتقارن تقسیم می‌شوند. (c) در الگوی سوم برخی از سلول‌های بنیادی ممکن است مانند (b) تقسیم شوند در حالیکه در یک زمان سایر سلول‌ها تولید دو سلول تمایز یافته می‌کنند.

متفاوتی را بر این دو سلول القاء می‌کنند.

در اینجا ما برخی از خصوصیات عمومی و اینکه چگونه انواع سلولی مختلف تولید می‌شوند و باعث ایجاد رده سلولی پیچیده می‌شود را در نماتد حلقوی الگانس توضیح می‌دهیم. در بخش‌های بعدی، ما بر روی مثال‌هایی از مکانیسم‌های مولکولی که انواع سلولی خاص را در مخمر، دروزوفیلا (مگس سرکه) و پستانداران تعیین می‌کنند متمرکز خواهیم شد.

سلول‌های بنیادی هم باعث ایجاد سلول‌های بنیادی و هم سلول‌های تمایز یابنده می‌شود.

سلول‌های بنیادی که باعث ایجاد سلول‌های تخصص یافته می‌شوند و بافت‌های بدن را ایجاد می‌کنند، چندین الگوی تقسیم سلولی را نشان می‌دهند (شکل ۲-۲۱). یک سلول بنیادی ممکن است به منظور ایجاد دو سلول دختری مشابه با خودش تقسیم متقارن حاصل کند و در عوض یک سلول بنیادی ممکن است به منظور ایجاد یک نسخه از خودش و یک سلول بنیادی مشتق از آن که توانایی‌های محدودشده‌ای دارد مانند تقسیم برای دوره زمانی محدود یا ایجاد انواع کمتری از سلول در مقایسه با سلول بنیادی والدی به طور نامتقارن تقسیم شود.

یک سلول بنیادی **پرتوان**[1] توانایی تولید یک عده از انواع سلول‌های مختلف ولی نه همه سلول‌ها را دارد. بعنوان مثال یک سلول بنیادی خونی پرتوان خودش و چندین نوع سلول خونی را تولید خواهد کرد ولی هرگز سلول پوستی را تولید نخواهد کرد. برخلاف آن، سلول بنیادی **تک‌توان**[2] برای تشکیل یک نسخه از خودش و همچنین سلولی که فقط یک نوع سلول را ایجاد خواهد کرد، تقسیم می‌شود. برای مثال سلول‌های بنیادی در روده به طور مداوم خودشان را ایجاد می‌کنند در حالی که سلول دیگر به یک سلول اپی‌تلیال روده‌ای تمایز پیدا می‌کند که در زیر توضیح داده‌ایم. در بیشتر حالات، تقسیم نامتقارن یک سلول بنیادی تولید یک سلول اولیه را می‌کند که به مسیر تمایز وارد شده و حتی به یک سلول تمایز یافته نهایی انتهایی تبدیل می‌شود.

دو مشخصه اصلی سلول‌های بنیادی که باعث می‌شود آنها را از سایر سلول‌ها تشخیص دهیم توانایی تولید خودشان به طور نامحدود است که اغلب خود احیاءگری نامیده می‌شود و توانایی تقسیم نامتقارن به منظور تشکیل یک سلول بنیادی دختری مشابه با خودش و یک سلول دختری با توانایی خیلی محدود شده است. بسیاری از تقسیمات سلول بنیادی متقارن است و دو سلول بنیادی را تولید می‌کند، ولی در برخی نقاط بعضی از سلول‌های حاصل نیاز به تمایز دارند. در این روش تقسیم میتوزی سلول‌های بنیادی می‌تواند هم باعث گسترش جمعیت سلول‌های تمایز نیافته شود و هم جمعیت سلول بنیادی را در حالی که به طور مداوم سلول‌های تمایزیافته ایجاد می‌کنند، را حفظ کند. اگر چه برخی انواع سلول‌های پیش‌ساز می‌توانند به طور متقارن برای تشکیل بیشتر خودشان تقسیم شوند، ولی آن‌ها فقط برای دوره زمانی محدودی تقسیم می‌شوند. بعلاوه، برخلاف سلول‌های بنیادی اگر یک سلول پیش‌ساز به طور نامتقارن تقسیم شود، تولید دو سلول دختری متفاوت را می‌کند که هیچکدام از آنها مشابه سلول والدی پیش‌ساز نیستند.

تخم لقاح یافته یا **زیگوت** سلول پرتوان است، زیرا توانایی ایجاد همه انواع سلول‌های بدن را دارد. اگر چه زیگوت مانند سلول بنیادی نمی‌تواند خودش را تجدید کند، ولی سلول زیگوت می‌تواند

1- Pluripotent

2 - Unipotnt

اکتودرم	مزودرم	آندودرم
سیستم عصبی مرکزی، عدسیه و شبکیه چشم، اعصاب و گره‌های حسی و جمجمه‌ای، سلول‌های پیگمان، بافت پیوندی سر، پوست، مو، غدد پستانی	جمجمه، سر، ماهیچه اسکلتی، اسکلت، درم پوست، بافت پیوندی، سیستم اوروژنیتال، قلب، خونی، سلول‌های لنفی طحال	معده، کولون، کبد، پانکراس، مثانه، قسمت‌های اپیتلیال از تراکه‌ها، ریه‌ها، حلق، تیروئید و روده

▲ **شکل ۳-۲۱ سرنوشت‌های لایه‌های زایا در حیوانات.** برخی از بافت‌های مشتق از سه لایه زایا آورده شده است.

سلول‌هایی با خصوصیات سلول بنیادی ایجاد کند. بعنوان مثال، جنین از مرحله هشت‌سلولی گذر می‌کند و در آن هر سلولی تشکیل هر بافتی را می‌دهد. در این حالت، پرتوان هستند. بنابراین تقسیم قسمت‌های بدن و سرنوشت بافت‌ها در بین سلول‌های جنینی اولیه در مرحله هشت‌سلولی به طور برگشت‌ناپذیر اتفاق نمی‌افتد. در مرحله ۱۶ سلولی، این امر چندان صحیح نیست زیرا برخی از سلول‌ها به مسیرهای تمایزی خاص سوق داده می‌شوند.

سرنوشت‌های سلولی بطور پیشرونده در طی تکوین محدود می‌شوند.

سلول‌های هشت‌تایی حاصل از سه تقسیم اولیه زیگوت پستانداران (تخم لقاح‌یافته) همه شبیه هم به نظر می‌رسند. همانطور که از لحاظ تجربی در گوسفند تأیید شده است، هر کدام از سلول‌ها توانایی ایجاد یک حیوان کامل را دارند. تقسیمات بیشتر تولید توده‌ای متشکل از حدود ۶۴ سلول را می‌کنند که به دو نوع سلولی تقسیم می‌شود. تروفکتودرم[1] که بافت‌های خارج جنینی مانند جفت را تشکیل خواهد داد و توده سلولی درونی باعث ایجاد جنین می‌شود. توده سلولی درونی سرانجام سه لایه زایا، با سلول‌های متفاوت را تشکیل می‌دهد. لایه اکتودرم، سلول‌های عصبی و اپیدرمی را به وجود خواهد آورد. لایه دیگر مزودرم، بافت ماهیچه‌ای و پیوندی را ایجاد خواهد کرد و سومین لایه، آندودرم که اپی‌تلیال گوارشی را به وجود خواهد آورد (شکل ۳-۲۱)

بعد از اینکه لایه‌های زایا به وجود آمدند به جمعیت‌های سلولی با سرنوشت‌های مختلف تقسیم می‌شوند. برای مثال اکتودرم به سلول‌هایی تقسیم می‌شود که پیش‌سازهای اپیتلیوم پوست و پیش‌سازهای سلول‌های سیستم عصبی هستند. همچنان که تکوین به پیش می‌رود، محدودیت در مقدار انواع سلولی که می‌توانند از سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز حاصل شوند ظاهر می‌شود. همچنان که دیده‌ایم یک سلول جنینی اولیه می‌تواند هر نوع سلولی را تشکیل دهد. یک سلول اکتودرمی می‌تواند بین سلول‌های اپیدرمی و عصبی انتخاب کند. در حالیکه یک کراتینوسیت می‌تواند پوست را تشکیل دهد ولی نورونها را تشکیل نمی‌دهد.

یک محدودیت دیگری که در ابتدای تکوین حیوان اتفاق می‌افتد کنارگذاری سلول‌هایی است که ایجاد لایه زایشی[2] را (سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌سازی که سرانجام باعث ایجاد تخمک‌ها در جنس مؤنث و اسپرم در جنس مذکر خواهند شد) خواهند داد. فقط ژنوم لایه زایشی به فرزندان منتقل خواهد شد. ایجاد سلول‌های لایه زایشی در ابتدای تکوین به منظور حمایت کروموزومها از آسیب ایجادشده توسط کاهش تعداد دورهای همانندسازی است که متحمل می‌شوند. به هر حال، تقسیم اولیه لایه زایشی در بین حیوانات گسترده است. برخلاف آن، گیاهان این جدایی را ندارند. مریستم‌ها، انتهای در حال رشد ریشه‌ها و شاخه‌ها هستند و اغلب باعث ایجاد سلول‌های لایه زاینده می‌شوند و رده لایه زایشی در ابتدا کنار گذاری نمی‌شود.

نتیجه تقسیم اولیه سلول‌های لایه زایشی حذف یا بازآرایی ژن‌ها در سلول‌های سوماتیک است که ژنوم به ارث رسیده را تحت تأثیر قرار نخواهد داد. با وجود این، اگر چه قطعات ژنومی بازآرایی شده‌اند و در طی تکوین لنفوسیت‌ها از پیش‌سازهای خونی حذف شده‌اند. ولی اغلب سلول‌های سوماتیک به نظر می‌رسد ژنوم دست‌نخورده و مشابه لایه زایشی را دارند (فصل ۲۴). مدرکی دال بر اینکه حداقل برخی از سلول‌های سوماتیک ژنوم کامل و عملکردی دارند. از تولید موفقیت‌آمیز حیوانات کلون شده توسط کلون سازی با انتقال هسته به دست آمده است. در این روش هستهٔ یک سلول بالغ (سوماتیک) به داخل سلول تخمی که فاقد هسته است، وارد می‌شود. تخمک دستکاری شده (که دارای تعداد دیپلوئید از کروموزوم و مشابه یک زیگوت است) به یک حیوان ماده منتقل می‌شود. تنها منبع اطلاعات ژنتیکی به منظور هدایت تکوین جنین، ژنوم هسته‌ای سلول سوماتیک دهنده است. ناتوانی

1- Trophectoderm 2- Germ line

زیاد در چنین آزمایشات کلون سازی باعث ایجاد سوالاتی در مورد داشتن یک ژنوم عملکردی کامل در سلول‌های سوماتیک به وجود می‌آورد. حتی با وجود موفقیت‌هایی مانند گوسفند مشهور دالی، اغلب مشکلات پزشکی وجود دارد. اینکه سلول‌های تمایزیافته چه مقدار ژنوم عملکردی‌شان را مخفی می‌سازند، هنوز بطور کامل فهمیده نشده است. برای مثال یک سلول می‌تواند ژنوم دست‌نخورده داشته باشد ولی قادر به دوباره فعال‌سازی صحیح ژن‌های خاص به علت حالات کروماتینی‌اش نباشد.

این مشاهدات باعث ایجاد دو سوال مهم شد: چگونه سرنوشت‌های سلولی به طور پیشرونده‌ای در طی تکامل محدود می‌شوند؟ آیا آن محدودیت‌ها برگشت‌ناپذیر هستند؟ برای پاسخ به این سوالات اهمیت دارد به خاطر آوریم که توانایی‌های یک سلول در محل طبیعی‌اش ممکن است متفاوت از توانایی آن وقتی که به طور آزمایشگاهی مورد دستکاری قرار گرفته است، باشد. بنابراین محدودیت‌های که یک سلول به آن برخورد می‌کند ممکن است از مکانیسم‌های تنظیمی حاصل شود یا ممکن است انعکاسی از یافتن شرایطی باشد که توانایی کامل سلولی را آشکار کند.

اگرچه تمرکز فصل بر روی این است که چگونه سلول‌ها از هم متفاوت می‌شوند ولی توانایی آنها برای عملکرد بافت‌ها و کل موجود زنده باقی می‌ماند. سلول‌های تمایز یافته غیر تقسیم شونده با خصوصیات خاص اغلب این خصوصیات را برای چندین دهه حفظ می‌کنند. سلول‌های بنیادی که بطور منظم تقسیم می‌شوند مانند سلول بنیادی پوست، بایستی یک سلول دختری با خصوصیات سلول والدی ایجاد کند تا ترکیب، شکل، رفتار و پاسخ به پیامهای خارجی خاص را حفظ کند. در حالیکه، سلول دختری دیگر با توارث متفاوت که نتیجه تقسیم سلولی نامتقارن است در مسیر تمایز خاصی قرار می‌گیرد و ممکن است هم توسط پیامهایی که دریافت می‌کند و هم توسط خطای درونی درتوانایی سلولی، مانند فعال‌سازی ژن‌های خاص متعهد شود.

رده‌بندی سلولی کامل کرم الگانس شناخته شده است.

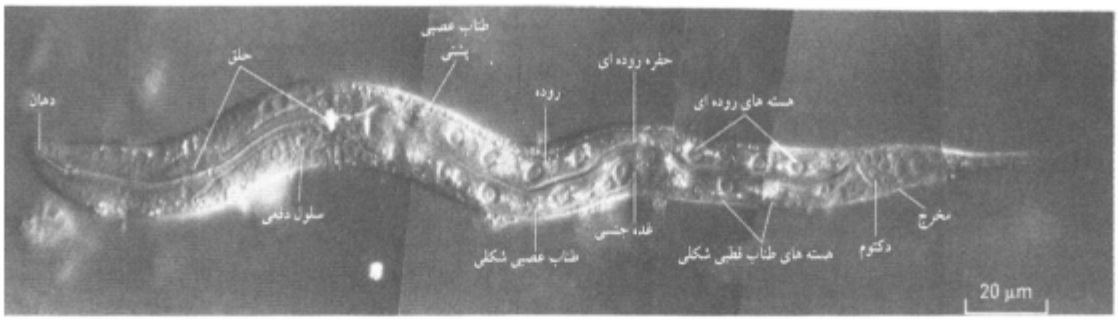
در تکوین برخی موجودات زنده، رده‌بندی سلولی تحت کنترل ژنتیکی شدیدی است و بنابراین در همه افراد یک گونه مشابه است. در سایر موجودات زنده تعداد و آرایش دقیق بین افراد مختلف به طور اساسی تغییر می‌کند. مثال خوب از الگوی تجدیدپذیری تقسیمات سلولی نماتد کرم الگانس است. دانشمندان رده‌بندی همه سلول‌های سوماتیک را در کرم الگانس از تخمک لقاح یافته تا کرم بالغ را به دنبال تکوین کرم زنده با استفاده از میکروسکوپ کنتراست تداخل تمایزی نوماراسکی[1] (DIC) ردیابی کرده‌اند (شکل ۴-۲۱).

حدود ۱۰ بار تقسیم سلولی یا کمتر، کرم بالغ را ایجاد می‌کند که حدود یک میلی‌متر طول و ۷۰ میکرومتر قطر دارد. کرم بالغ ۹۵۹ هسته سلول سوماتیک (نوع هرمافرودیت) یا ۱۰۳۱ هسته سلول سوماتیک (نر) دارد. تعدادسلول‌های سوماتیک تا حدی کمتر از تعداد هسته‌ها است به این دلیل که برخی از سلول‌ها دارای چندین هسته هستند (به عبارت دیگر آنها سین سیتیا هستند). بطور قابل ملاحظه‌ای الگوی تقسیمات سلولی از یک تخم لقاح یافته شروع کرم الگانس می‌شود. همچنانکه بعداً در این فصل توضیح می‌دهیم بسیاری از سلول‌هایی که در طی تکوین تولید شده‌اند، متحمل مرگ سلولی برنامه‌دار می‌شوند و در کرم بالغ از بین می‌روند. تداوم رده‌بندی سلولی کرم الگانس به طور کامل اطلاعات ارثی هر سلول تازه ایجاد شده نیست. سلول‌های ایجادشده الزاماً توسط دستورات ارثی در درون شان به منظور تبعیت از مسیر تمایز به هم مرتبط نیستند. در برخی حالات، چندین پیام، سلول‌های مشابه ابتدایی را به سرنوشت‌های متفاوتی هدایت می‌کنند و نتیجه این پیام‌ها از یک جانور به جانور دیگر ثابت است.

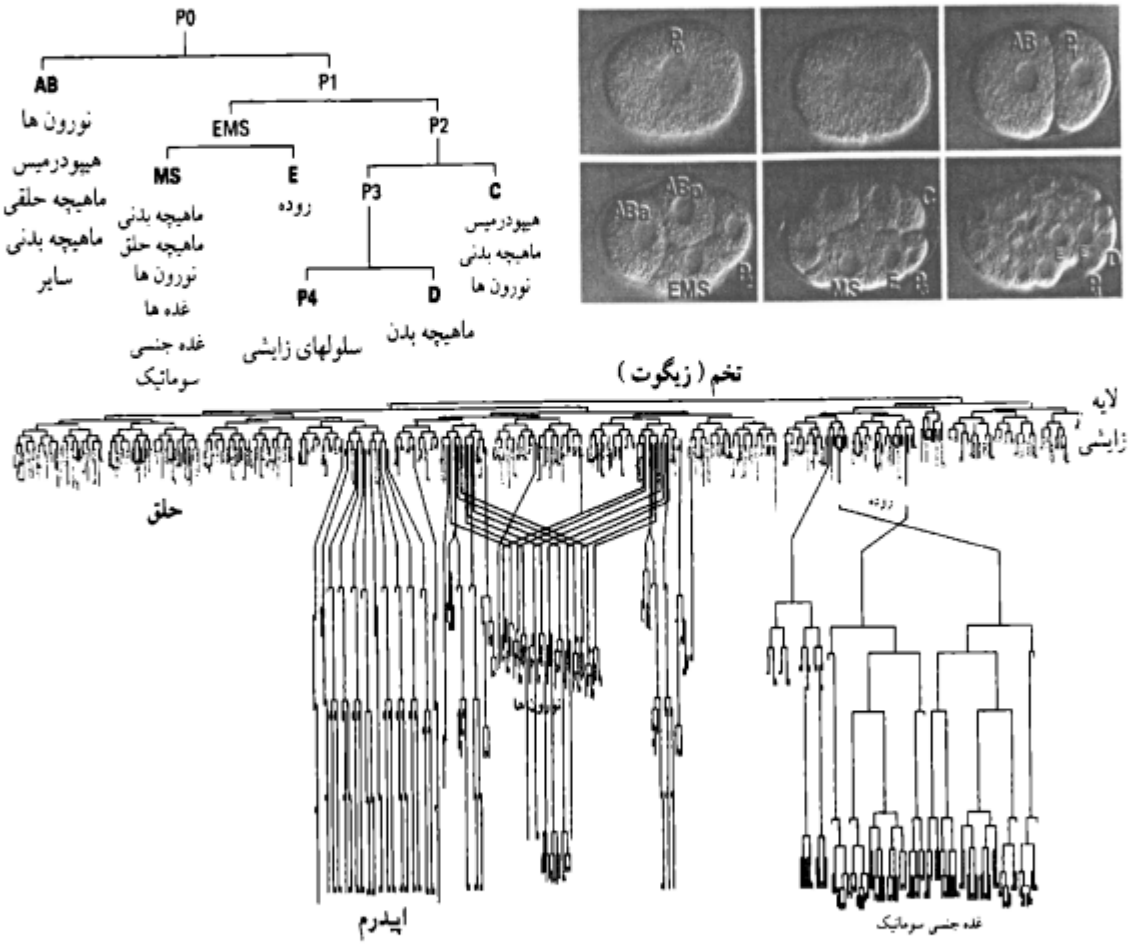
تقسیمات سلولی کم اولیه در کرم الگانس شش سلول پایه‌گذار متفاوت را تولید می‌کند که هر کدام سرنوشت متفاوتی را دارد. همانطور که در شکل ۵-۲۱ نشان داده شده است. تقسیم اوّلیه نامتقارن است و باعث ایجاد سلول پایه‌گذار P1 و AB می‌شود. تقسیمات بیشتر در رده P، پنج سلول پایه‌گذار دیگر را به وجود می‌آورد. برخی از پیام‌های کنترل‌کننده تقسیم و سرنوشت نامتقارن شناخته شده‌اند. برای مثال، پیام‌های Wnt از پیش ساز P2 تقسیم نامتقارن سلول EMS را به سلول‌های پایه‌گذار E و MS کنترل می‌کنند. پیام‌رسانی Wnt (شکل ۳۲-۱۶ را ملاحظه کنید). در سایر تقسیمات نامتقارن در کرم‌ها نیز استفاده می‌شود. برخی از سلول‌های جنینی بعنوان سلول‌های بنیادی عمل می‌کنند و به منظور تشکیل بیشتر خود یا تشکیل نوع دیگر از سلول پیش‌ساز تقسیم می‌شوند. در حالیکه تولید سلول‌های تمایز یافته را نیز می‌کنند و باعث ایجاد یک بافت خاص می‌شوند. رده‌بندی کامل کرم الگانس در شکل ۵-۲۱ نشان داده شده است. این موجود سیستم مدل باارزشی برای مطالعات ژنتیکی به منظور شناسایی تنظیم‌کننده‌هایی است که رده‌بندی سلولی را در زمان و مکان کنترل می‌کنند.

---

1 - Nomaraski differential inter ference contrast (DIC) microscopy



▲ **شکل ۴-۲۱ لارو تازه آماده شده** کرم الگانس برخی از هسته‌های ۹۵۹ سلول سوماتیک در نوع هرمافرودیت در این عکس توسط میکروسکوپ کنتراست تداخلی تفرقی دیده می‌شود. (برخی اوقات میکروسکوپ نومارسکی نامیده می‌شود). هسته‌های روده‌ای بسیار به راحتی دیده می‌شود که به صورت دیسک‌های گرد ظاهر می‌شوند .



▲ **شکل ۵-۲۱ رده‌بندی** کرم الگانس (a) الگوی اولین تقسیمات سلولی با P0 شروع می‌شود و منجر به تشکیل شش سلول پایه‌گذار می‌شود. اولین تقسیم، نامتقارن است که تولید سلول پایه‌گذار P1 و AB را می‌کند. تقسیمات بیشتر در رده P پنج سلول پایه‌گذار دیگر را تولید می‌کند. توجه کنید که بیش از یک رده می‌تواند منجر به ایجاد یک نوع بافت‌شود (مانند ماهیچه یا نورون‌ها). نام سلول EMS به خاطر این است که پیش ساز بخش‌های بیشتر آندودرم و مزودرم است. رده‌بندی با سلول‌های P شروع می‌شود که باعث ایجاد همه سلول‌های سوماتیک می‌شوند. (b) عکس‌های میکروسکوپ نوری از تقسیمات سلولی اولیه جنین که سلول‌های پایه‌گذار یا سلول‌های نشاندار در قسمت (a) را به وجود می‌آوردند. زمینه سلول‌ها وجود اندامک‌ها را نشان می‌دهد. (c) رده‌بندی کامل کل بدن کرم، برخی از بافت‌های تشکیل شده را نشان می‌دهد. توجه کنید که هر سلول خاص متحمل تقسیمات نسبتاً کمتری می‌شود که معمولاً کمتر از ۱۵ بار است.

جهش یافته‌های هتروکرونیک راهنماهایی را در مورد کنترل رده‌بندی سلولی فراهم می‌آورد.

مدرک جالب برای کنترل ژنتیکی رده‌بندی سلولی، از جداسازی و تجزیه تحلیل جهش‌یافته‌های هتروکرونیک حاصل شده است. در این جهش‌یافته‌ها یک رویداد تکوینی مشخص از یک مرحله تکوین زودتر (تکوین زودرس) یا دیرتر (تکوین دیررس) از موعد مقرر اتفاق می‌افتد. یک مثال برای رویداد اول، وقوع زودرس تقسیم سلولی است که باعث ایجاد سلولی می‌شود که تمایز می‌یابد و سلول دیگر می‌میرد. در نتیجه آن، رده سلولی که بایستی از سلول مرده حاصل شود هرگز به وجود نمی‌آید. یک مثال برای رویداد دیررس وقوع همراه با تأخیر رده‌بندی است که باعث می‌شود ساختارهای جوان به طور ناصحیح در جانوران مسن تولید شوند. در هر دو حالت خصوصیت یک سلول والدی به خصوصیت یک سلول در مرحله‌ای متفاوت از تکوین تغییر می‌یابد.

مطالعه ژن‌های هتروکرونیک برای درک مکانیسم‌های تکوین و تنظیم ژنی مهم است. مثالی از تکوین زودرس در کرم الگانس جهش‌های حذف‌کننده عملکرد در ژن **lin-14** است که باعث تشکیل زودرس پیش ساز نورونی خاص (نوروبلاست PDNB) می‌شود (شکل ۶-۲۱). ژن lin-14 و سایر ژن‌ها در کرم‌های جهش‌یافته هتروکرونیک دچار نقص هستند. این ژن‌ها پروتئین‌های اتصال یابنده به DNA و RNA را رمزدار می‌کنند که احتمالاً بیان سایر ژن‌ها را هماهنگ می‌کنند.

دو ژن دیگر (lin-4 , let-7) در جهش‌یافته‌های کرم الگانس هتروکرونیک کشف شده‌اند که در ابتدا کارشان مشخص نبود، زیرا آنها RNAهای کوچکی که پروتئینی را به وجود نمی‌آورند را رمزدار می‌کردند. دانشمندان به منظور کشف محصولات این ژن‌ها در ابتدا قطعات ژنومی راکه می‌توانست عملکرد ژنی و بنابراین رده‌بندی سلولی صحیح را به جهش‌یافته‌های دچار نقص در هر ژن برگرداند، تعیین کردند. سپس آن‌ها همان عمل را با DNA ژنومی از مناطق ژنومی مرتبط از گونه‌های مختلف کرم انجام دادند. مقایسه قطعات حاصل از گونه‌های مختلف آشکار ساخت که آن‌ها دارای توالی کوتاه با توانایی رمزدار کردن پروتئین هستند.

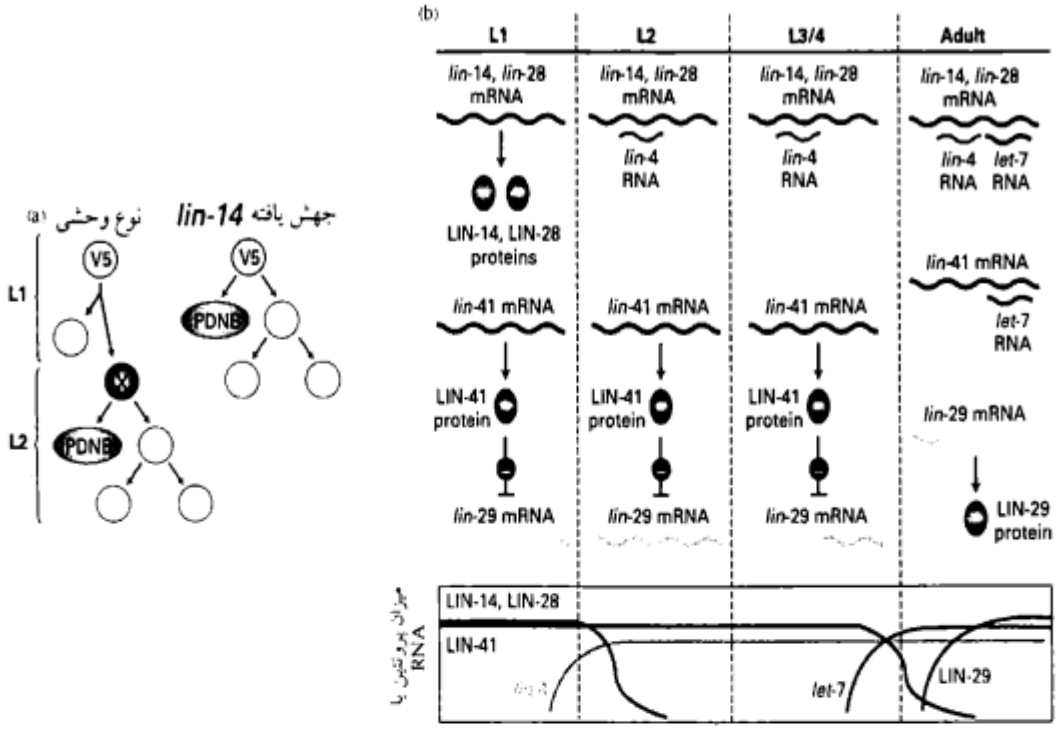
مولکول‌های کوتاه RNAهایی که توسط **lin-4** و **let-7** رمزدار شده بودند نشان داده شد که ترجمه mRNAهای رمزدار شده توسط **lin-14** و سایر ژن‌های هتروکرونیک دیگر را مهار می‌کنند (شکل ۶-۲۱). این RNAهای کوچک، **میکرو RNA (miRNAs)** نامیده شدند که توسط RNA پلیمراز II تولید می‌شوند و مکمل توالی قسمت‌های $3'$ غیرترجمه نشده mRNAهای هدف هستند. میکرو RNAها خاموش شدن بعد از رونویسی mRNAها را توسط دورگه شدن با آنها و مهار ترجمه یا تحریک تجزیه آنها هدایت می‌کنند (شکل ۲۵-۸ را ملاحظه کنید). تغییرات موقت در میکرو RNAهای در ایجاد lin-4 و let-7 و سایر میکرو RNAها در طی چرخه زیست کرم الگانس، بصورت ساعت تنظیمی برای رده‌بندی سلولی عمل می‌کنند.

miRNAها در سایر جانوران مانند مهره‌داران و حشرات شناسایی شده است و بیش از ۳۰۰ عدد در ژنوم انسان (یا شاید بیشتر از یک هزار در ژنوم انسان) رمزدار می‌شوند. از این جهت تولید miRNAها به طور موقتی و فاصله‌دار تنظیم می‌شود. به نظر می‌رسد که آنها مقدار وسیعی از رویدادها را کنترل می‌کنند، (شاید رویدادهای زمان دار در کرم الگانس). چگونه تولید این miRNAهای تنظیمی به طور موقت کنترل می‌شود، هنوز شناخته نشده است ولی آنها نقش‌های زیادی را در تنظیم بیان ژن بازی می‌کنند.

سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شده می‌توانند به انواع سلولی مختلف تمایز یابند.

سلول‌های **بنیادی جنینی** (ES) می‌توانند از جنین‌های اولیه پستانداران جدا شوند و در محیط کشت رشد داده شوند (شکل ۷-۲۱) سلول‌های ES کشت داده شده می‌توانند به تعداد زیادی از انواع سلولی در *In Vitro* و یا بعد از واردشدن در یک جنین میزبان تمایز یابند. وقتی که سلول‌های ES انسانی در محیط کشت سوسپانسیونی کشت داده می‌شوند، در ابتدا به تجمعات چندسلولی تمایز پیدا می‌کنند که **اجسام شبه‌جنینی**[1] نامیده می‌شوند و شبیه جنین‌های اولیه در تعدادی از بافت‌های تشکیل‌دهنده آنها هستند. آنها به محیط کشت جامد منتقل می‌شوند و رشد می‌کنند تا به ورق‌هایی از سلول‌های تمایز یافته مانند سلول‌های نورونی و سلول‌های اپی‌تلیالی پیگمان‌دار و بدون پیگمان تبدیل شوند (شکل ۷-۲۱). در شرایط دیگر سلول‌های ES به منظور تمایز یافتن به پیش‌سازهای چندین نوع سلول خونی تحریک می‌شوند. چه خواصی به سلول‌های ES این خاصیت انعطاف‌پذیری را می‌دهند؟ عده‌ای از عوامل دخیل، پروتئین‌های پیام‌رسان، متیلاسیون DNA، میکرو RNAها، فاکتورهای رونویسی و تنظیم‌کننده‌های کروماتین هستند که فعال شدن ژن‌ها را می‌توانند تحت تأثیر قرار دهند (فصل‌های ۷ و ۸).

1 - Embryoid



▲ **شکل ۶-۲۱ زمانبندی تقسیمات سلولی در طی تکوین کرم الگانس.** (a) الگوی تقسیم سلولی برای سلول V5 در کرم الگانس برای کرم‌های طبیعی (نوع وحشی) و برای جهش‌یافته‌های هتروکرونیک که جهش یافته lin-14 نامیده می‌شوند، نشان داده شده است. در جهش‌یافته‌های lin-14 الگوی تقسیم سلولی که بطور طبیعی فقط در مرحله دوم لاروی اتفاق می‌افتد (L2)، در اولین مرحله لاروی اتفاق می‌افتد (L1) و باعث می‌شود نوروبلاست PDNB به طور نارس تولید شود. در این سلول جهش‌یافته V5 در طی L1 مشابه سلول X به طور طبیعی در L2 رفتار می‌کند. این تداخل باعث می‌شود که پروتئین lin-14 جلوی تقسیمات سلولی نوع L2 را بگیرد. اگر چه به طور دقیق چگونگی این عمل شناخته نشده است. (b) دو RNA تنظیمی کوچک lin-4 و let-7 بعنوان زمان‌سنج هماهنگ‌کننده بیان ژن عمل می‌کنند. اتصال RNAی lin-4 به مناطق ترجمه نشده ۳′ (UTRs) از mRNAهای lin-14 و lin-28 مانع ترجمه این mRNAها به پروتئین می‌شود. این امر به دنبال اولین مرحله لاروی (L1) اتفاق می‌افتد و اجازه تکوین به منظور پیشروی به مراحل لاروی بعدی را می‌دهد. با شروع چهارمین مرحله لاروی (L4) تولید RNAی let-7 شروع می‌شود که با mRNAهای lin-14 و lin-28 و lin-41 دورگه می‌شود و این امر مانع از ترجمه آنها می‌شود. پروتئین LIN-41 یک مهارگر ترجمه lin-29 است چنانچه ظهور RNAی let-7 اجازه تولید پروتئین LIN-29 را می‌دهد و برای تولید رده‌های سلولی بالغ لازم است. LIN-4 ممکن است به RNAی lin-41 در مراحل بعدی نیز متصل شود. فقط UTRهای انتهای ۳′ mRNAها ترسیم شده است.

در طی مراحل اولیه جنین زایی، همچنانچه تخمک لقاح‌یافته شروع به تقسیم می‌کند، هم DNA پدری و هم مادری متیل‌زدایی می‌شوند (توضیح متیلاسیون DNA را در فصل ۷ ملاحظه کنید). این امر اتفاق می‌افتد، زیرا یک متیل ترانسفراز ثابت (Dnmt1) بطور طبیعی در هسته موجود است که بطور موقت از هسته خارج شده است. در طی اولین تقسیمات سلولی الگوی متیلاسیون به حالت اول برمی‌گردد، با پاک کردن نشان اپی‌ژنتیک اولیه DNA و ایجاد موقعیتی که در آن سلول‌ها توانایی بیشتری برای مسیرهای متنوع تکوین را دارند، موش‌هایی مهندسی شده فاقد Dnmt1 وقتی به صورت جنین‌های اولیه هستند با DNAی کم متیله شده، می‌میرند. سلول‌های ES به دست آمده از چنین جنین‌هایی در محیط کشت قادر به تقسیم هستند ولی برخلاف سلول‌های طبیعی ES متحمل تمایز نمی‌شوند.

خصوصیات سلول ES موشی به طور اساسی به فعالیت سه فاکتور رونویسی که به مدت کوتاه بعد از لقاح تولید می‌شوند بستگی (Oct4,Sox2,Nanog) دارد. ژن‌هایی که این فاکتورها به آنها متصل می‌شوند با استفاده از آزمایشات رسوب‌دهی ایمنی شناسایی شده‌اند (شکل ۳۷-۷ را ملاحظه کنید). هر پروتئین در بیش از یک هزار محل کروموزومی یافت شده است. در حدود ۳۵۰ محل، در سه پروتئین ذکر شده یافت شده است. ریزآرایه‌های DNAیی ژن‌هایی فعال در سلول‌های ES را آشکار کرده‌اند. در

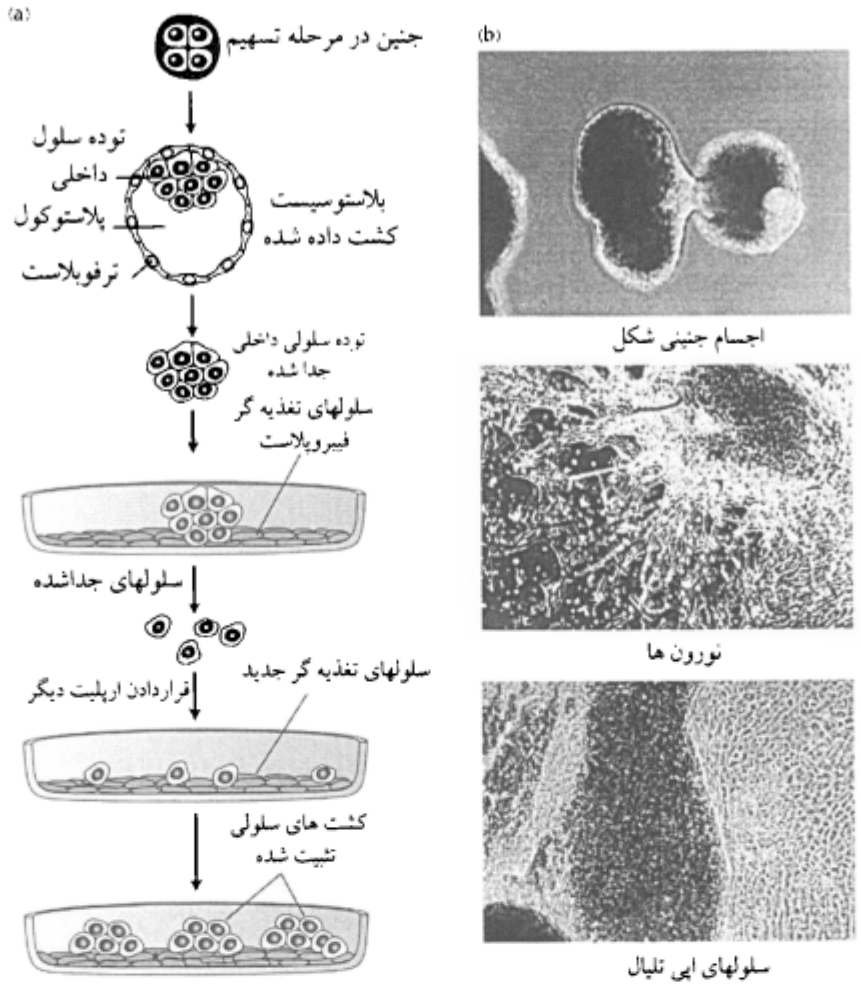
حدود نیمی از ۳۵۰ جایگاهی که هر سه فاکتور رونویسی در آن تجمع می‌کنند در داخل و در کنار ژن‌هایی هستند که در سلول‌های ES رونویسی می‌شوند. ژن‌های هدفی که توسط این فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌شوند تعداد زیادی از پروتئین‌ها شامل خود پروتئین‌های Oct4 و Nanog و Sox2 اجزاء پیام‌رسانی مسیرهای BMP و JAN/STAT و فاکتورهای کروماتینی را رمزدار می‌کنند.

تنظیم‌گرهای کروماتینی که رونویسی ژنی را در سلول‌های ES کنترل می‌کنند نیز حائز اهمیت هستند (فصل ۷). در دروزوفیلا (مگس سرکه) پروتئین‌های گروه polycomb کمپلکس‌هایی را تشکیل می‌دهند که حالات مهار ژنی را که قبلاً توسط فاکتورهای رونویسی متصل شونده به DNA به وجود آمده است را حفظ می‌کنند. دو مجموعه از پروتئین‌های پستاندارانی مرتبط با پروتئین‌های polycomb مگس سرکه (PRC2,PRC1) در سلول‌های ES تولید شده‌اند. جنین‌های اولیه موشی فاقد اجزاء PRC2 دارای تکوین غیرطبیعی توده سلولی داخلی هستند، سلول‌های ES نمی‌توانند از جنین‌های فاقد عملکردهای PRC2 تشکیل شوند. مجموعه پروتئین‌های PRC2 با افزودن گروههای متیل به لیزین ۲۷ هیستون H3 عمل می‌کنند و بنابراین ساختار کروماتین را به منظور مهار ژن‌ها تغییر می‌دهند. به خاطر آورید که این نوع تنظیم متفاوت از متیلاسیون DNA است.

امکان استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی برای بازیابی یا جایگزین کردن بافت آسیب دیده نقطه شروعی برای تحقیقات زیاد بر روی طرز شناسایی و چگونگی کشت این سلول‌ها از منبع جنین و از منبع بافت‌های مختلف در حیوانات بالغ شده است. برای مثال اگر نورونهایی که تولید میانجی عصبی دوپامین را می‌کنند می‌توانستند از سلول‌های بنیادی رشد داده شده در محیط کشت تولید شوند، درمان افراد دارای بیماری پارکینسون که علت آن نقص در چنین نورونهایی است، امکان‌پذیر می‌شد. برای اینکه چنین روشی موفقیت‌آمیز باشد، بایستی روشی به منظور هدایت جمعیتی از سلول‌های جنینی و سایر سلول‌های بنیادی برای تشکیل انواع سالم از نورونهای تولیدکننده دوپامین یافت شود تا از پس‌زنی توسط سیستم ایمنی ممانعت به عمل آید. یک روش برای ممانعت از پس‌زنی ایمنی استفاده از سلول‌های بنیادی از یک بیمار برای تولید سلول‌های درمانی برای همان بیمار است. این عمل دقیقاً در حال حاضر، در برخی از پیوندهای مغز استخوان انجام می‌شود که در پائین خواهید دید به هر حال در حال حاضر جداسازی سلول‌های بنیادی بالغ با توانایی‌های مشابه برای سایر بافت‌ها امکانپذیر نیست. در آزمایشات حیوانی، ثابت شده است که سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های بنیادی بالغ توانایی بیشتری در تشکیل انواع بافت‌ها دارند. یک روش برای استفاده از مزایای سلول‌های ES که باعث کاهش پس‌زنی ایمنی شناختی نیز می‌شود وارد کردن یک هسته سلولی از فرد بیمار به محیط یک سلول جنینی است با جایگزینی هسته با هسته فرد بیمار خصوصیات بیماری به سلول‌های ES القا خواهد شد. سپس رده‌های سلولی که توسط بیماران خاص پذیرفته خواهد شد تایید می‌شود. در این روش سلول‌های بنیادی حاصل از بلاستوسیست‌ها ممکن است گزینه‌ای برای درمان بیماری پارکینسون و شاید سایر شرایط تحلیل‌برنده عصبی مانند بیماری آلزایمر باشند.

کار اخیر در جهت اینکه آیا سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ می‌توانند به انواع سلولی تمایز یافته تبدیل شوند که این عمل در درمان مؤثر خواهد بود، سوق داده شد. برای مثال سلول‌های ES موشی با مهارگرهای فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز که تنظیم‌کننده یکی از مسیرهای پیام‌رسانی فسفواینوزیتید است تیمار شدند (فصل ۱۶) سلول‌های ES تیمار شده به سلول‌های مشابه سلول‌های β پانکراس از لحاظ تولید انسولین، حساسیت آنها به میزان گلوکز و تجمع آنها به صورت ساختارهای مشابه ساختارهای پانکراس، تمایز داده شدند. کشت این سلول‌های تمایزیافته در موش‌های دیابتی، وزن، میزان گلوکز و سرعت رشد آنها را به حالت طبیعی بازگرداند. سوالات بسیار مهمی قبل از امکان‌پذیر بودن استفاده از سلول‌های بنیادی انسانی به منظورچنان اهدافی بایستی پاسخ داده شود.

غیر از استفاده از سلول‌های ES در درمان بیماری، قبلاً ثابت شده است که این سلول‌ها برای تولید موشهای جهش‌یافته به منظور استفاده در مطالعه تعداد زیادی از بیماریها، مکانیسم‌های تکوینی، رفتار و فیزیولوژی مناسب نیستند. با استفاده از تکنیک‌های شرح داده شده در فصل ۵ امکان حذف یا تغییر عملکرد یک ژن خاص در سلول‌های ES وجود دارد (شکل ۴۰-۵ را ملاحظه کنید). پس سلول‌های ES جهش‌یافته می‌توانند به منظور تولید موشهایی با یک ژن ناقص به کار گرفته شوند (شکل ۴۱-۵ را ملاحظه کنید). ارزیابی اثرات ایجادشده توسط حذف یا تغییر یک ژن در این روش اغلب اوقات راهنمایی‌هایی را در مورد عملکرد طبیعی آن ژن و پروتئین رمزدار شده از آن فراهم می‌آورد. ما اکنون خصوصیات و طرز تنظیم برخی از سلول‌های بنیادی بالغ حاصل از سلول‌های ES را که اندام‌ها و بافت‌های مختلف را در حیوانات به وجود می‌آورند، بررسی می‌کنیم.



▲ **شکل تجربی ۷-۲۱ سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند در محیط کشت نگهداری شوند و تشکیل انواع سلول تمایزیافته را بدهند.** (a) بلاستوسیست‌های انسانی از جنین‌های مرحله تسهیم توسط لقاح در *In Vitro* حاصل شده‌اند. توده سلولی داخلی از بافت‌های خارج جنینی احاطه‌کننده جداشده و در یک ظرف بر روی لایه‌ای از سلول‌های فیبروبلاست قرار گرفتند که سلول‌های جنینی را تغذیه می‌کردند. سلول‌های انفرادی در ظرف دیگری کشت داده شد و تشکیل کلونی از سلول‌های ES را دادند که می‌توانند برای تولید نسل‌های بیشتر نگهداری شوند و یا به صورت منجمد ذخیره شوند. (b) در محیط کشت سوسپانسیونی، سلول‌های ES انسانی به تجمعات چندسلولی که اجسام جنینی نامیده می‌شوند (بالا) تمایز پیدا می‌کنند. بعد از اینکه اجسام جنینی به محیط جامد ژلاتینی منتقل شدند، آن‌ها به ورقه‌های سلولی دارای یک عده از انواع سلولی تمایزیافته شامل سلول‌های عصبی (میانی) و سلول‌های اپی‌تلیال پیگمان‌دار و بدون پیگمان تمایز پیدا می‌کنند (زیر).

سلول‌های بنیادی بالغ برای بافت‌های حیوانی مختلف آشیانه‌های[1] بهینه را به وجود می‌آورند.

بسیاری از انواع سلولی تمایزیافته جدا شده از بدن دوره حیاتی کوتاهتری نسبت به زمانی دارند که در داخل بدن موجود زنده هستند. بیماری و تروما می‌تواند منجر به حذف سلول‌های تمایزیافته شود. از آنجا که سلول‌های تمایزیافته بطور کلی تقسیم نمی‌شوند بایستی توسط جمعیت‌های سلول بنیادی که در مجاورشان هستند تجدید شوند. حیوانات بالغ دارای سلول‌های بنیادی برای اغلب بافت‌ها مانند خون، روده، پوست، تخمدان‌ها، بیضه‌ها، ماهیچه و کبد هستند. حتی در برخی قسمت‌های مغز بالغ که تقسیم سلولی به طور طبیعی کم اتفاق می‌افتد جمعیتی از سلول‌های بنیادی وجود دارند. در ماهیچه و کبد، سلول‌های بنیادی در سالم‌سازی اهمیت دارند و تقسیم سلولی در این بافت‌ها نسبتاً کمتر از سایر بافت‌ها اتفاق می‌افتد.

سلول‌های بنیادی نیاز به محیط مناسبی به منظور حفظ و نگهداری خودشان دارند. علاوه بر پیام‌های تنظیمی داخلی (مانند وجود پروتئین‌های تنظیمی خاص)، سلول‌های بنیادی وابسته به پیام‌های تنظیمی خارجی از سلول‌های مجاور به منظور حفظ

1- Niches

حالتشان به صورت سلول بنیادی هستند. محلی که در آن سرنوشت یک سلول بنیادی می‌تواند حفظ شود. آشیانه سلول بنیادی (به جهت مشابهت آن با یک محل بهینه اکولوژیکی) و محلی است که وجود و امتیاز رقابتی یک موجود زنده خاص را حمایت می‌کند نامیده می‌شود. ترکیب درست تنظیم داخلی و خارجی که توسط یک آشیانه تقویت می‌شود، جمعیتی از سلول‌های بنیادی را ایجاد و حفظ خواهد کرد.

به منظور بررسی یا استفاده از سلول‌های بنیادی بایستی آنها کشف و تعیین خصوصیت شوند. اغلب اوقات شناسایی دقیق سلول بنیادی مشکل است زیرا آنها ممکن است فاقد شکلهای متمایزکننده یا بیان ژن خاصی باشند. اغلب اوقات سلول‌های بنیادی به سرعت تقسیم نمی‌شوند و به صورت ذخیره نگه داشته می‌شوند، (یا به طور آهسته تقسیم می‌شوند) تا اینکه توسط پیامهای نیاز برای ایجاد سلول‌های جدید، تحریک شوند. برای مثال اکسیژن ناکافی می‌تواند باعث تحریک سلول‌های بنیادی برای تقسیم شود و آسیب به پوست می‌تواند تقسیم سلولی را که با فعال‌سازی سلول‌های بنیادی شروع می‌شود، تحریک کند. برخی از سلول‌های بنیادی که اپی‌تلیوم پوشش روده را به طور مداوم ایجاد می‌کنند به طور مداوم تقسیم شده و معمولاً در سرعت کم تقسیم می‌شوند.

یک روش برای شناسایی سلول‌های بنیادی در جمعیت مختلطی از سلول‌ها بستگی به سرعت نسبتاً آهسته تقسیم آنها دارد. در این روش (نوعی آزمایش ضربه و تعقیب[1]) سلول‌ها با یک سری از پیش‌سازهای DNAی ایجادکننده (مانند بروموئوکسی یوریدین (Brdu)) پیام آماده می‌شوند و سپس بررسی می‌شوند که کدام نشاندار شده است. بعد از قرارگیری BrdU، سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند نشاندار نخواهند شد و سلول‌هایی که به سرعت تقسیم شوند در آنها BrdU نشاندار با نوکلئوتیدهای غیرنشاندار جایگزین خواهند شد (تعقیب). سلول‌های بنیادی BrdU را در طی تقسیم آهسته وارد DNA یشان خواهند کرد. از اینرو که سایر سلول‌ها نسبتاً به ندرت تقسیم می‌شوند سلول‌های بنیادی BrdU نشاندار را بیشتر از آن‌ها جذب خواهند کرد و بصورت سلول‌های دارای نشان بروز می‌کنند. این نوع از نگهداری نشان، اغلب اوقات روشی مفید به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی است.

سلول‌های بنیادی لایه زایشی، لایه زایشی رده‌ای از سلول‌ها است که تخمک‌ها و اسپرم‌ها را ایجاد می‌کند. این رده متفاوت از سلول‌های سوماتیک است که سایر بافت‌های بدن را تشکیل می‌دهند ولی به زاده‌ها منتقل نمی‌شوند. لایه زایشی نیز مانند رده‌های سلولی سوماتیک سلول‌های بنیادی دارند آشیانه‌های سلول بنیادی به طور اختصاصی در مطالعات سلول‌های بنیادی لایه زایشی از دروزوفیلا (مگس سرکه) و کرم الگانس تعیین شده است. سلول‌های بنیادی لایه زایشی در مگس سرکه بالغ و کرم‌ها وجود دارند و محل سلول‌های بنیادی خوب شناخته شده است. این سلول‌های بنیادی توسط نگهداری نشان BrdU شناخته می‌شوند.

در تخمدان مگس سرکه، محل مناسبی که پیش‌سازهای تخمک تشکیل می‌شوند و شروع به متمایز می‌کنند در کنار انتهای **ژرماریوم**[2] قرار گرفته است (شکل ۲۱-۸). در این محل در ناحیه سلول بنیادی لایه زایشی در کنار تعدادی از سلول‌های کلاهک وجود دارند و محل مناسبی به وجود می‌آورند که دو پروتئین **فاکتور رشدی تغییر شکل دهنده β مجهوک** (TGFβ) (Dpp,Gbb) **پروتئین مجهوک** (Hh) ترشح می‌کنند (شکل ۸-۲۱). این پیام‌های پروتئینی ترشح شده در فصل ۱۶ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. وقتی که سلول‌های بنیادی تقسیم می‌شوند، آنها تولید دو سلول دختری می‌کنند، یکی از آنها نزدیک سلول‌های کلاهکی باقی می‌ماند و بنابراین سلول بنیادی شبیه به سلول مادری است. سلول دختری دیگر به منظور تولید دوسلول سیستوبلاست که به سلول‌های لایه زایشی تمایز خواهند یافت، تقسیم می‌شود. سلول‌های سیستوبلاست به مسیر تمایز وارد می‌شوند، زیرا آنها از سلول‌های کلاهکی و پیام‌هایی که تولید می‌کنند مانند Gbb,DPP,Hh و میانکش‌های سلول - سلول که توسط پروتئین‌های سطح سلول Arm و Zpg که باهمدیگر باعث می‌شوند که یک سلول به حالت سلول بنیادی باقی بماند، فاصله دارند. هم سلول‌های کلاهکی و هم سلول‌های بنیادی لایه زایشی تولید پروتئین‌های piwi را می‌کنند که به میکرو RNAها متصل می‌شوند. پروتئین‌های piwi و miRNAهای متصل شده به آنها، بیان ژن را تنظیم می‌کنند و تکوین سلولی لایه زایشی را در تعداد زیادی از حیوانات و همچنین تکوین سلول بنیادی را در گیاهان کنترل می‌کنند. بنابراین آنها یک مکانیسم قدیمی از تنظیم تکوینی را ایجاد می‌کنند. سلول‌های بنیادی سوماتیکی مجزا در ژرماریوم سلول‌های فولیکولی را تولید می‌کنند که پوسته تخم را ایجاد خواهند کرد. سلول‌های بنیادی سوماتیکی محل مناسبی دارند که توسط سلول‌های غلافی داخلی ایجاد شده است و پروتئین wingless (یک پیام wnt مگس سرکه) و پروتئین Hh را تولید می‌کنند (شکل ۸-۲۱). بنابراین دو جمعیت مختلف از

1- Pulse - chase 2 - Germariam

سلول‌های بنیادی در هماهنگی نزدیک با هم تولید قسمت‌های متفاوت از یک تخم را می‌کنند.

میکرو RNAها خصوصیات تقسیمی سلول‌های بنیادی لایه زایشی مگس سرکه ماده (دروزوفیلا) را کنترل می‌کنند. پروتئین دایسر[1] (یک ریبونوکلئاز RNA دورشته‌ای) میکرو RNAها را تولید می‌کند (شکل ۲۵-۸ را ملاحظه کنید). سلول‌های بنیادی لایه زایشی با جهش در ژن دایسر طی گذر موفقیت‌آمیز از G_1 به S از چرخه سلولی دچار نقص می‌شوند در نتیجه جمعیت سلول‌های بنیادی لایهٔ زایشی و تخمک‌ها کم می‌شود. غیاب عملکرد میکرو RNA به طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث افزایش عملکرد مهارگر کیناز وابسته به سیکلین P21/P27 می‌شود. همچنانکه در فصل ۲۰ شرح داده شده است P21/P27 به طور طبیعی گذر از G_1 به S را توسط تنظیم مجموعه‌های سیکلین E و CDK محدود می‌کند. بنابراین اثر خالص فقدان عملکرد میکرو RNA که باعث افزایش فعالیت P21/P27 می‌شود، محدود کردن تقسیم سلولی است.

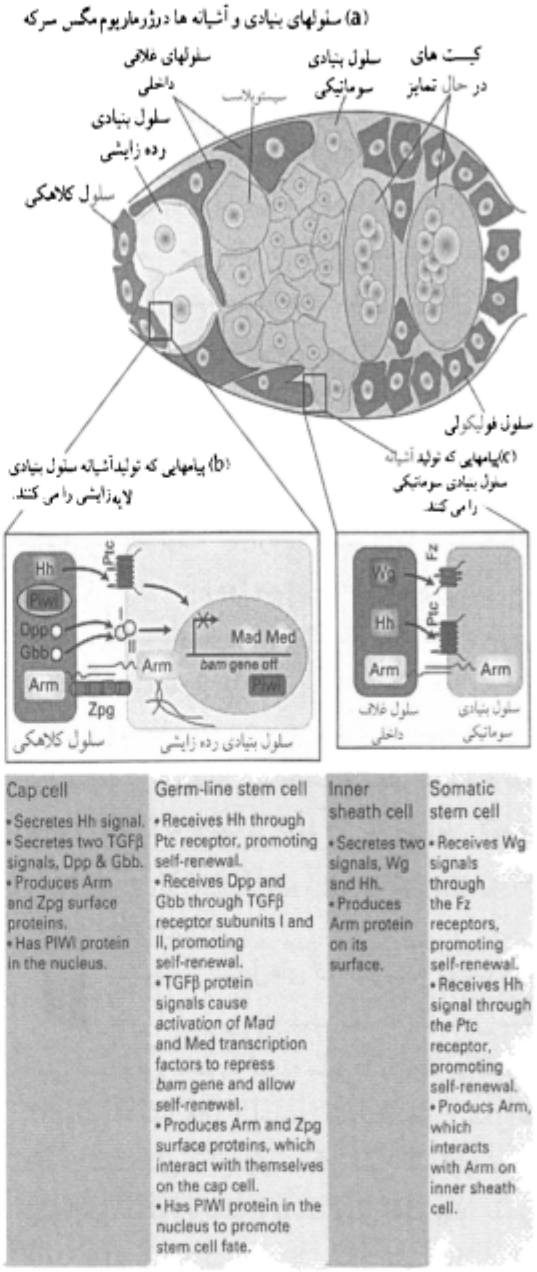
در کرم‌ها، بازوهای شبه لوله‌ای و بزرگ غدد جنسی، نوک‌هایی دارند که در آنجا یک سلولی که سردیستال نامیده می‌شود آشیانه سلول بنیادی را به وجود می‌آورد (شکل ۹-۲۱) پروتئین گذرنده از غشای دلتا توسط سلول سردیستال تولید می‌شود و به گیرنده نوتچ بر روی سلول‌های بنیادی لایه زایشی متصل می‌شود. مسیر پیام‌رسانی دلتا / نوتچ (شکل ۳۶-۱۶) را ملاحظه کنید) تقسیم سلولی سلول‌های بنیادی لایه زایشی را شروع می‌کند، بنابراین باعث ایجاد بیش از یک سلول بنیادی می‌شود. میوز (و همچنین تمایز لایه زایشی) توسط پیام دلتا بلوکه می‌شود تا اینکه سلول‌های بنیادی به بیرون از محدوده پیام سلول سردیستال حرکت کنند. جهش‌هایی که نوتچ را در سلول‌های بنیادی لایه زایشی فعال می‌کنند، حتی در غیاب پیام دلتا، باعث ایجاد تومور گنادی غده جنسی با تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی لایه زایشی اضافی می‌کند که در راستای میتوز اضافی و میوز کم است.

شناسایی و تعیین ویژگی سلول‌های بنیادی لایه زایشی دروزوفیلا (مگس سرکه) و کرم الگانس به این خاطر حائز اهمیت هستند که به طور متقاعد کننده‌ای وجود آشیانه سلول بنیادی را نشان داده‌اند و اجازه آزمایشات برای شناسایی پیامهای ایجاد شده توسط آشیانه را که باعث ایجاد و تداوم سلول‌های بنیادی می‌شود را داده‌اند. بنابراین یک آشیانه سلول بنیادی تعدادی از سلول‌ها و پیامهایی است که آنها تولید می‌کنند و صرفاً یک محل نیست. شناسایی مولکول‌های اختصاصی که حالت سلول بنیادی را در دروزوفیلا و کرم الگانس حفظ می‌کردند باعث کشف غیرمنتظره‌ای شد، برخی از این ملکولها به منظور تشکیل یک آشیانه سلول بنیادی استفاده می‌شوند و سرنوشت‌های سلول بنیادی را در پستانداران کنترل می‌کنند. برای مثال سلول‌های بنیادی لایه زایشی در بیضه‌های موش به پروتئین پیام‌رسان (GDNF) TGFβ مشتق از سلول‌های سوماتیک وابسته‌اند که به طور نامتقارن برای تجدید خودش و ایجاد سلول اسپرماتوگونی تقسیم می‌شود. این سلول تکثیر می‌یابد و زاده حاصل از آن اسپرماتوسیت می‌شود که از فرآیندهای تمایزی غیرمعمول عبور می‌کند و یک اسپرم را می‌سازد. این آشیانه توسط ناحیه تخصصی از سلول سرتولی همراه با یک سلول میوئید و یک غشای پایه ایجادشده توسط سلول میوئید به وجود آمده است. گمان می‌شود که بسیاری از جزئیات پیام‌های مولکولی در ابهام هستند.

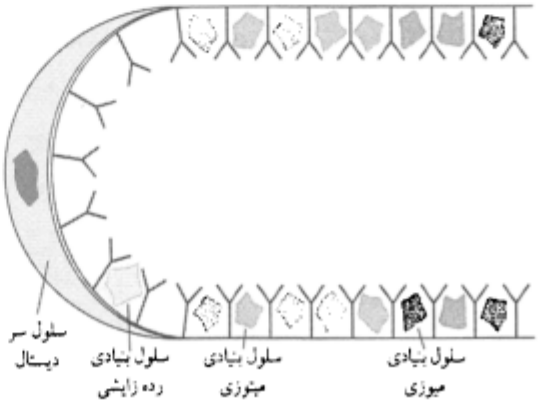
سلول‌های بنیادی پوست و مو در پستانداران . سلول‌های بنیادی اپیتلیال که باعث ایجاد پوست و مو در پستانداران می‌شوند در فولیکول‌های مو و در لایه پایه اپی‌تلیوم بین فولیکول‌ها قرار گرفته‌اند. در فولیکول مو سلول‌های بنیادی یک آشیانه را اشغال می‌کنند که **bulge** نامیده می‌شود (شکل ۱۰-۲۱). این سلول‌های بنیادی به منظور ایجاد سلول‌های بنیادی بیشتر و ایجاد حداقل دو نوع سلول پیش‌ساز، بطور نامتقارن تقسیم می‌شوند و یک نوع سلول پیش‌ساز در سطح پوست به وجود می‌آید که کراتینوسیت‌ها را تشکیل می‌دهد. نوع سلولی اصلی، پوست است که اپی‌تلیوم چندلایه‌ای (اپیدرم) است. سلول‌های دیگری که از سلول‌های بنیادی حاصل می‌شوند پیش‌سازهای ماتریکس مو می‌شوند که به عمق فولیکول مو می‌روند و عده‌ای از ساختارها مانند مو را تشکیل می‌دهند.

تنظیم‌کننده‌های مولکولی در آشیانه سلول بنیادی پوست بطور کامل شناخته شده‌اند. به هر حال مانند مگس سرکه، پیام‌های TGFβ از سلول‌های مزانشیمی که سلول‌های bulge را احاطه کرده‌اند حاصل می‌شوند و یک پیام Wnt از پاپیلای پوستی حاصل می‌شود که در کنترل تجدیدشدن سلول بنیادی و تمایز به پوست و مو اهمیت دارد (شکل ۱۰-۲۱). مدرکی دال بر اهمیت پیام‌رسانی Wnt از دستکاریهای بیان بتا - کاتنین، (پروتئینی که

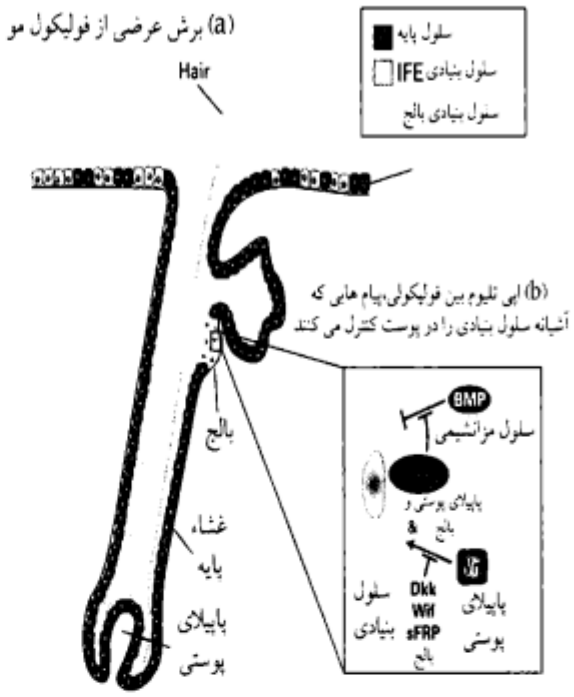
1 - Dicer



◀ شکل ۸-۲۱ (شکل رنگی) ژرماریوم دروزوفیلا و پیامهایی که آشیانه‌های سلول بنیادی آن را ایجاد می‌کنند. (a) مقطع عرضی از ژرماریوم که سلول‌های بنیادی لایه زایشی ماده و برخی سلول‌های بنیادی سوماتیک را در آشیانه‌شان و سلول‌های حاصل از آنها را نشان می‌دهد. سلول‌های بنیادی لایه زایشی تولید سیستوبلاست‌ها (سبز) را می‌کنند که به تخمک‌ها تمایز می‌یابند. سلول‌های بنیادی سوماتیک (تولید سلول‌های فوسیکولی (قهوه‌ای) را می‌کنند که پوسته تخم را ایجاد خواهند کرد. سلول‌های کلاهکی (سبز تیره) آشیانه سلول‌های بنیادی لایه زایشی را تولید و حفظ می‌کنند. این در حالی است که سلول‌های غلافی (آبی) آشیانه سلول‌های بنیادی سوماتیک را ایجاد می‌کنند. (b) مسیرهای پیام رسانی خصوصیات سلول‌های بنیادی لایه زایشی را کنترل می‌کنند. مولکول‌های پیام‌رسان (پروتئین‌های TGFβ، Dpp و Gbb و همچنین Hh) توسط سلول‌های کلاهکی تولید می‌شوند. نتیجه اتصال این لیگاندها به گیرنده‌های موجود در سطح یک سلول بنیادی مهار ژن bam توسط دو فاکتور رونویسی Mad و Med است. مهار bam اجازه می‌دهد که سلول‌های بنیادی لایه زایشی تجدید شوند در صورتیکه فعال‌سازی bam تمایز را شروع می‌کند. دو پروتئین سطحی Arm و Zpg که به طور فیزیکی به سلول‌های کلاهکی و سلول‌های بنیادی متصل می‌شوند در حفظ آشیانه سلول بنیادی مهم هستند. میکروRNAها اغلب به صورت تنظیم‌کننده‌های اساسی تمایز سلولی شناخته می‌شوند (مثلاً در مورد سلول‌های لایه زایشی). برخی از آنها به پروتئین Piwi (تنظیم‌کننده اصلی لایه زایشی هم در سلول‌های بنیادی و هم در سلول‌های کلاهکی) متصل می‌شوند. (c) مسیرهای پیام‌رسانی که خصوصیات سلول‌های بنیادی سوماتیکی راکنترل می‌کنند. پیام Wingless(Wg) از Wnt توسط سلول‌های بنیادی غلافی تولید می‌شود و توسط گیرنده فریزلد (FZ) بر روی یک سلول بنیادی سوماتیکی دریافت می‌گردد. Hh به طور مشابه تولید می‌شود و توسط گیرنده Ptc دریافت می‌گردد. هر دو گیرنده، پیام کنترل رونویسی را می‌دهند. که نتیجه آن خود تجدیدگری سلول‌های بنیادی سوماتیکی است می‌دهند.



◀شکل ۹-۲۱ (شکل رنگی) آشیانه سلول سوماتیک لایه زایشی کرم حلقوی. یک مقطع عرضی از انتهای بازوی گنادی، سلول‌های بنیادی را در آشیانه‌شان و سلول‌های حاصل از آنها را نشان می‌دهد. سلول انتهای دیستال منفرد (سبز) در هر بازوی گنادی آشیانه را تولید و حفظ می‌کند. سلول‌های بنیادی میتوزی خود تجدیدگر توسط سلول‌های بنیادی لایه زایشی تولید می‌شوند و متحمل میوز می‌شوند. این وقتی است که آنها به بیرون از محدوده پیام دلتا از سلول سردیستال حرکت می‌کنند. در طی این مراحل سلول‌ها فقط به طور جزئی توسط غشاءهای سلولی از هم جدا می‌شوند (به شکل Y) و بنابراین یک سینسی تیوم هستند.



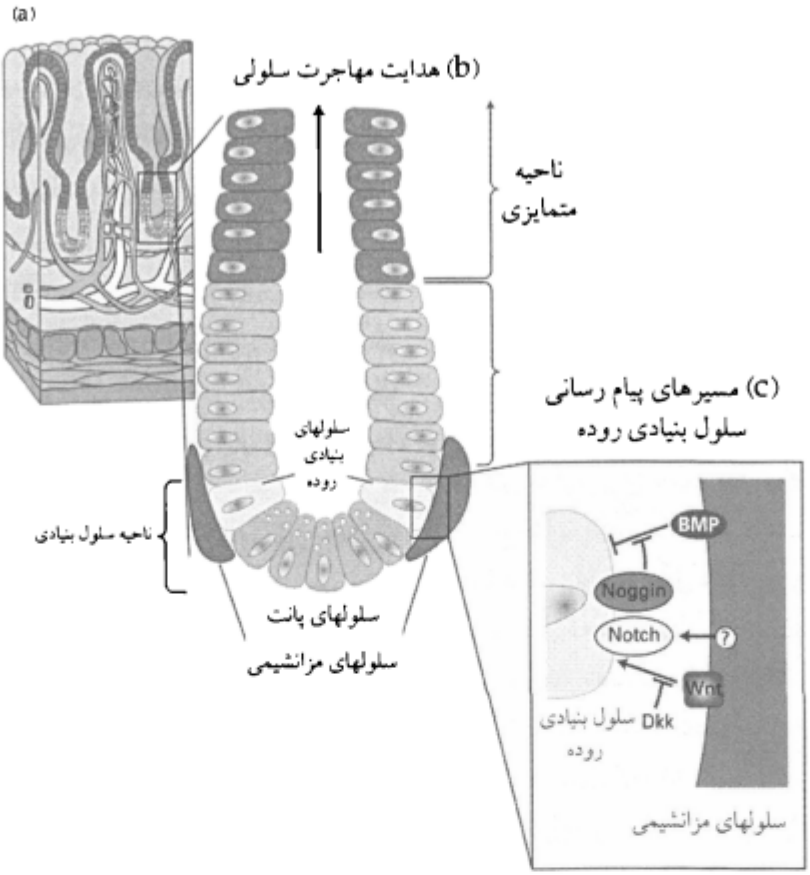
▲ **شکل ۱۰-۲۱ آشیانه سلول بنیادی پوست و مو در پستانداران و پیامهایی که آن را کنترل می‌کنند.** (a) یک فولیکول مو که سلول‌های بنیادی (زرد) را در بالج و سلول‌های بنیادی بین فولیکولی(سبز روشن) را در بین سلول‌های اپی‌تلیال (سبز) در بیرون از فولیکول مویی نشان می‌دهد. سلول حاصل از سلول‌های بنیادی بالج به طرف پایین مهاجرت می‌کنند و در تشکیل مو در نزدیک پاپیلای پوستی شرکت می‌کنند. سلول‌های سبز تیره شروع به تمایز نهایی کرده‌اند و آنها به طور موقت سلول‌هایی را که در حال تقسیم هستند، زیاد می‌کنند ولی نمی‌توانند سلول‌های بنیادی را تولید کنند. توجه کنید که فقط لایه پایه سلول‌های اپی‌تلیال نزدیک به غشاء پایه نشان داده شده است. در بالای این سلول‌های پایه (خارج از فولیکول) چندین لایه از کراتینوسیت‌های در حال تمایز وجود دارد. (b) رویدادهای پیام‌رسانی در یک آشیانه سلول بنیادی. منبع هر پیام در پارانتز نشان داده شده است. پیام Wnt تشکیل سلول‌های مو را شروع می‌کند. ولی در بالج (جایگاه سلول‌های بنیادی) حداقل سه مهارگر Wnt (Wif , Dkk , sFRP) تمایز را مهار می‌کنند و حالت سلول بنیادی را حفظ می‌کنند. به دور از این مهارگرها عدم وجود پیام‌رسانی Wnt اجازه تمایز سلول‌های بنیادی را به سلول‌های پوستی (کراتینوسیت‌ها) می‌دهد. BMP که متعلق به خانواده $TGF\beta$ از پروتئین‌های پیام‌رسان است، توسط سلول‌های مزانشیمی مجاور به بالج ایجاد می‌شود. در طی تکوین وقتی که یک موی تازه رشد می‌کند پاپیلای پوستی نوگین (Noggin) را می‌سازد که پیام BMP را بلوکه می‌کند و Wnt بیشتری که بر مهارکننده‌ها غلبه می‌کند اجازه می‌دهد که سلول‌های بنیادی به سلول‌های مو تمایز یابند و عملکرد آنها با مرحله تکوین تغییر می‌کند.

در ارتباط بین اتصالات سلول به سلول به اسکلت سلولی کمک می‌کند) به دست آمد (شکل ۲۱-۱۹ را ملاحظه کنید) و این پروتئین بعنوان انتقال دهنده پیام در مسیر Wnt عمل می‌کند (شکل ۳۲-۱۶ را ملاحظه کنید).فعال‌سازی بتاکاتنین سرنوشت سلول‌ها را از پوست به مو تغییر می‌دهد. برخلاف آن برداشت بتاکاتنین از پوست موش‌های دستکاری شده تشکیل سلول‌های مو را حذف می‌کند. سپس سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال اپیدرم را تشکیل می‌دهند و سلول‌های مو را تشکیل نمی‌دهند. بنابراین بتاکاتنین بعنوان یک کلیدی عمل می‌کند که این را که چه نوع پیش‌ساز از سلول‌های بنیادی اپتلیال حاصل می‌شود را کنترل می‌کند. پیام‌های Wnt نیز اثرات تحریکی بر روی تقسیم سلولی دارد که می‌تواند توسط مهارگرهای مسیر Wnt مانند DKK و FRP که در bulge موجود هستند ممانعت شود.

کراتینوسیت‌های تازه تشکیل شده به طرف سطوح خارجی‌تر حرکت می‌کنند و پهن‌تر می‌شوند و با فیلامان‌های حدواسط کراتین پر می‌شوند (فصل ۱۸). به طور طبیعی به وجود آمدن یک کراتینوسیت در پائین‌ترین لایه پوست به منظور تمایز و حرکت به طرف بالاترین لایه پوست در حدود ۲۰-۱۵ روز زمان لازم دارد. سلول‌های تشکیل‌دهنده بالاترین لایه در واقع مرده‌اند و بطور مداوم از سطح می‌ریزند.

علاوه بر سلول‌های کراتینوسیت، پوست حاوی سلول‌های T اپیدرمی دندریتیک است که یک سلول سیستم ایمنی است و نوع خاصی از گیرنده سلول T را ایجاد می‌کند (فصل ۲۴). وقتی که سلول‌های T اپیدرمی دندرتیک بطور ژنتیکی تغییر داده می‌شوند چنان که آن‌ها گیرنده‌های سلول T را تولید نمی‌کنند بهبود زخم آهسته و ناکاملتر از پوست نرمال است. بهبود طبیعی با افزودن فاکتور رشد کراتینوسیتی بازمی‌گردد. فرضیه فعلی این است که وقتی که سلول‌های T اپیدرمی دندریتیک آنتی‌ژن‌ها را بر روی سلول‌های آسیب دیده شناسایی می‌کنند، آنها با تولید پروتئین‌های تحریک‌کننده از قبیل فاکتور رشد کراتینوسیتی که تولید کراتینوسیت‌های بیشتر و بهبود زخم را شروع می‌کنند، پاسخ می‌دهند. بسیاری از پیام‌های دیگر (مانند هجهوگ) کلسیم و فاکتور رشد تغییر شکل دهنده α ($TGF\alpha$) تولید سلول‌های پوستی را از سلول‌های بنیادی کنترل می‌کنند. کشف اینکه چگونه این پیامها با هم به منظور کنترل رشد و تحریک بهبود زخم عمل می‌کنند، درک ما را از بیماریهایی مانند پسوریازیس و سرطان پوست بیشتر خواهد کرد و شاید راه را برای درمان مؤثر هموار کند.

سلول‌های بنیادی روده: برخلاف پوست، لایه‌بندی اپی‌تلیوم



▲ **شکل ۱۱-۲۱ آشیانه سلول بنیادی روده کوچک و پیام‌هایی که آن را کنترل می‌کنند.** (a) زائده‌های انگشت مانند از سطح داخلی روده کوچک که ویلی نامیده می‌شود، توسط حفراتی عمیق به نام کریپت، از هم جدا می‌شوند. اپی‌تلیوم به ضخامت یک سلول ما را از عفونت حفاظت می‌کند و اجازه انتقال انتخابی مواد غذایی مفید به جریان خون را می‌دهد. (b) یک کریپت روده که سلول‌های بنیادی و سلول‌های میتوتیک تکثیرشونده آنها و پیش‌سازها را در مراحل نهایی تمایز نشان می‌دهد. سلول‌های مزانشیمی این آشیانه سلول بنیادی را ایجاد می‌کنند. سلول‌های پانت[1] در پایه کریپت قرار گرفته‌اند و پروتئین‌های دفاعی ضد میکروبی که دفنسین نامیده می‌شوند را ترشح می‌کنند. این پروتئین‌ها منافذی را در غشاء سلول‌های باکتری ایجاد می‌کنند که منجر به مرگ باکتریها می‌گردد. (c) پیام رسانی در آشیانه سلول بنیادی اتفاق می‌افتد. پیام‌های Wnt سرنوشت سلول‌های بنیادی را القاء می‌کنند. پیام‌های BMP جبران‌کننده باعث ایجاد تمایز می‌شوند. Noggin (نوگین) مانع از عملکرد پیام‌های BMP می‌شود و بنابراین تکثیر سلول بنیادی را شروع می‌کند. در صورتیکه Dkk وقتی که رشد نیاز نیست، جلوی پیام‌رسانی Wnt را می‌گیرد. گیرنده نوتچ نیز در این امر نقش دارد. اگر چه لیگاند آن در سلول‌های مزانشیمی شناخته نشده است.

روده کوچک یک سلول منفرد ضخیم است (شکل ۸-۹ را ملاحظه کنید). این لایه نازک برای حفظ بدن ما از ورود سموم و عوامل بیماری‌زا اهمیت زیادی دارد و همچنین مواد غذایی مورد نیاز برای‌زیست را از حفره روده کوچک به داخل بدن منتقل می‌کند (شکل ۲۹-۱۱ را ملاحظه کنید). سلول‌های اپی‌تلیوم روده کوچک به طور مداوم از سلول‌های بنیادی قرار گرفته در عمق دیواره روده‌ای در حفراتی که کریپت نامیده می‌شوند، تجدید می‌شوند (شکل ۱۱-۲۱). با شناسایی سلول‌های نگهدارنده برچسب در اپی‌تلیوم روده‌ای، محققان تعیین کردند که سلول‌های بنیادی دقیقاً ۴ الی ۵ سلول بالاتر از یک کریپت قرار گرفته‌اند، این آشیانه توسط سلول‌های مزانشیمی که به کریپت‌ها در سطح سلول‌های بنیادی منتهی می‌شود ساخته شده است. این سلول‌ها تولید پیام Wnt، پیام (TGFβ) BMP و احتمالاً لیگاندی برای رسپتور نوتچ بر روی سلول‌های بنیادی می‌کنند (شکل ۱۱-۲۱). تولید زیاد بتا کاتنین در سلول‌های روده‌ای منجر به افزایش تکثیر می‌شود. همچنین آنها پیام Wnt زیادی را دریافت می‌کنند (که بتاکاتنین را پایدار می‌کند). بلوکه شدن عملکرد بتاکاتنین توسط تداخل با فاکتور رونویسی TCF، از بین رفتن سلول‌های بنیادی را در روده فعال

1- Paneth cells

می‌کند. بنابراین پیام‌رسانی Wnt که از طریق بتاکاتنین فعالیت می‌کند، نقش اساسی را در حفظ جمعیت سلول بنیادی روده‌ای بازی می‌کند. BMP اثری متضاد دارد و تمایز را شروع می‌کند و از اثر Wnt جلوگیری می‌کند.

سلول‌های بنیادی روده سلول‌های پیش‌سازی را تولید می‌کنند که تکثیر یافته و تمایز می‌یابند و همچنین آنها به منظور تشکیل لایه سطحی زائده‌های انگشت مانند روده‌ای که ویلی نامیده می‌شود و از طریق آن‌ها جذب صورت می‌گیرد، به اطراف کریپت‌ها حرکت می‌کنند. آزمایشات نشاندارکردن ضربه و تعقیب با BrdU نشان داده است که زمان تشکیل و از بین رفتن سلول‌ها در ویلی ۲ الی ۳ روز است. بنابراین تعداد زیادی سلول بایستی به منظور اینکه اپی تلیوم روده دست نخورده باقی بماند به طور مداوم تولید شوند. تولید سلول‌های جدید بطور دقیق کنترل می‌شود. تقسیم سلولی کم، ویلی‌ها را حذف خواهد کرد و منجر به شکست سطح روده خواهد شد. تقسیم سلولی زیاد اپی‌تلیوم بزرگ را ایجاد می‌کند و ممکن است مرحله‌ای از سرطان باشد. در حقیقت جهش‌هایی که پیام‌رسانی از طریق Wnt را به طور نامناسب فعال می‌کنند یک عامل اصلی در پیشرفت سرطان کولون (روده بزرگ) است که در فصل ۲۵ خواهیم دید.

سلول‌های بنیادی عصبی. علاقه زیاد در زمینه تشکیل سیستم عصبی و درک راه‌های بهتر به منظور ممانعت یا درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی، شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی را هدفی مهم قرار داده است. مراحل اولیه تکوین عصبی مهره داران شامل گرد شدن اکتودرم به منظور تشکیل لوله عصبی است که در کل طول جنین از سر تا دم امتداد دارد (شکل ۱۲-۲۱). در ابتدا لوله عصبی از لایه‌ای منفرد سلول‌ها تشکیل شده است (سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs)). این سلول‌ها باعث ایجاد کل سیستم عصبی مرکزی (مغز و طناب نخاعی) خواهند شد. آزمایشات نشانگذاری و ردیابی، مکانی را که سلول‌های عصبی در آن به وجود می‌آیند و همچنین مکانی را که بعد از تشکیل به آنجا می‌روند را نشان داده است. بیشترین ناحیه فعال تقسیم سلول ناحیه ساب و نتریکولار[1] است که خصوصیات یک آشیانه سلول بنیادی را دارد و به خاطر نزدیکی‌اش به بطن پر شده با مایع مرکزی به این نام خوانده می‌شود.

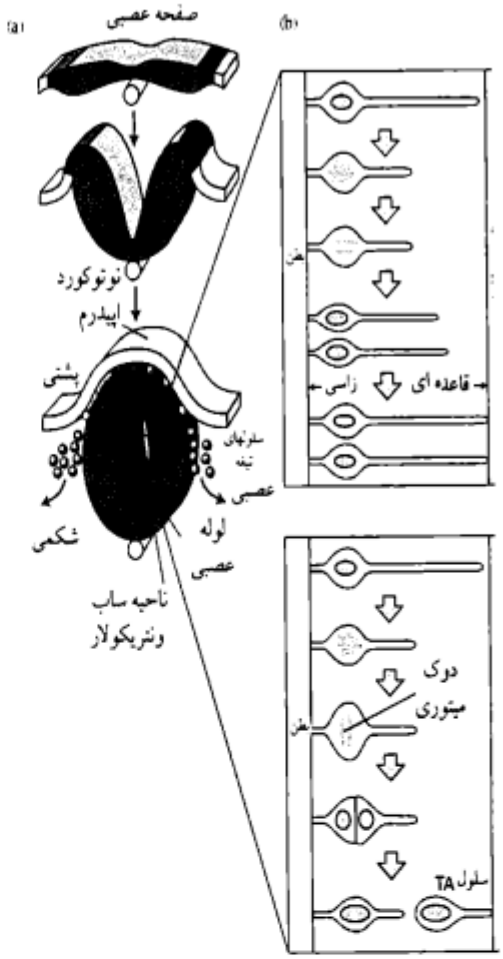
سلول‌های بنیادی عصبی جنینی که به بطن مرتبط می‌شوند، می‌توانند به طور متقارن تقسیم شده و دو سلول بنیادی دختر در کنار هم را تولید بکنند (شکل ۱۲-۲۱) یا اگر به طور نامتقارن تقسیم شوند تولید سلولی را می‌کنند که به صورت سلول بنیادی باقی می‌ماند و سلول دیگر به طرف بیرون مهاجرت می‌کند. سلول‌های مهاجرت کننده اغلب سلول‌های تشدیدشونده موقتی[2] هستند و به منظور تولید پیش‌سازهای عصبی که نوروبلاست‌ها نامیده می‌شوند، تقسیم می‌شوند. وقتی که سلول‌های TA و نوروبلاست تشکیل شدند به طور شعاعی به طرف بیرون مهاجرت می‌کنند و تشکیل لایه‌های متوالی از بافت عصبی به ترتیب از داخل به بیرون را می‌کنند در صورتیکه سلول‌های بنیادی در تماس با بطن باقی می‌مانند (شکل ۱۲-۲۱ را ملاحظه کنید). سلول‌های تازه تشکیل شده قبل از قرار گرفتن در بیرون از بین لایه‌های سلولی از پیش موجود، عبور می‌کنند.

آزمایشات ردیابی با ویروس‌ها نشان داده است که یک نوروبلاست می‌تواند دو سلول دختری را تولید کند (یک نورون و یک سلول گلیال). در این آزمایشات یک کتابخانه از رتروویروس‌های ناقص که هر کدام قادر است فقط یک مرتبه آلوده کند و دارای توالی DNA منحصر به فرد است، آماده شد (شکل ۱۳-۲۱). هر سلول آلوده شده توسط یک ویریون باعث ایجاد کلونی از سلول‌هایی شد که همه توالی DNAی ویروسی خاص را حمل می‌کردند. در این روش، همه سلول‌هایی که از یک سلول بنیادی عصبی یا سلول TA حاصل شده‌اند می‌توانند بصورت یک کلون شناخته شوند (شکل ۱۳-۲۱). نتایج این آزمایشات ردیابی جالب بود. اول اینکه برخی نورون‌ها که مسافت‌های قابل توجهی را بصورت جانبی مهاجرت می‌کنند و مهاجرت شعاعی آنها به طرف لایه قشری بیرونی را نسخ می‌کرد. دوم اینکه در برخی حالات یک نورون و یک سلول گلیال به وجود می‌آیند که همان توالی DNAی ویروسی را دارند. یک پیش‌ساز عصبی عفونی شده است و سپس به منظور ایجاد انواع سلول کاملاً مختلف تقسیم شده بود.

اغلب سلول‌های مغزی پستانداران در بلوغ، تقسیم‌شان را متوقف می‌کنند، ولی برخی سلول‌ها در ناحیه ساب ونتریکولار و حداقل یک قسمت دیگر از مغز عملکرد سلول‌های بنیادی را حفظ کرده و تولید نورون‌های جدید را می‌کنند (شکل ۱۴-۲۱). در ناحیه ساب ونتریکولار افراد بالغ، سلول‌های بنیادی نورونی، آستروسیت‌ها هستند که تا حدی نامگذاری آستروسیت که نوعی از سلول‌های گلیال است گمراه‌کننده است. سلول‌های بنیادی عصبی زیررده‌ای از آستروسیت‌ها هستند که در ابتدا به خاطر

1- Subventricular zone

2- Transient amplifying (TA) cells



شکل ۱۲-۲۱ (شکل رنگی) تشکیل لوله عصبی و تقسیم ل‌های بنیادی عصبی. (a) مرحله اولیه تکوین، قسمتی از اکتودرم پیچ رده و از بقیه سلول‌های جنینی جدا می‌شود، این عمل، اپیدرم ستری) و لوله عصبی (آبی) را تشکیل می‌دهد. در فاصله بین این دو، ل‌های تیغه عصبی تشکیل شده و سپس به منظور شرکت در انتاسیون پوست، تشکیل عصب، اسکلت صورت، جمجمه، حفره‌های ، اعصاب محیطی و سایر ساختارها مهاجرت می‌دهند. نوتوکورد، میله رمی که دلیل نامگذاری‌اش است (کوردات‌ها) پیام‌هایی را ایجاد می‌کند سرنوشت‌های سلولی را در لوله عصبی تحت تاثیر قرار می‌دهد (فصل بخش داخلی لوله عصبی یکسری از اتاقک‌های پر از مایع خواهد بود طن نامیده می‌شود. سلول‌های بنیادی عصبی در کنار بطن‌ها در ناحیه ، ونتریکولار قرار گرفته‌اند و برای تشکل نورونهایی که به صورت ی به طرف بیرون به منظور تشکیل لایه‌های سیستم عصبی مهاجرت نند، تقسیم خواهند شد (b) سلول‌های بنیادی عصبی در ناحیه ساب یکولار می‌توانند به طور متقارن (بالا) در طول محور رأسی - قاعده‌ای، ظور ایجاد سلول‌های بنیادی دختر در کنار هم تقسیم شوند که هر دو در ن با بطن هستند. سلول‌های بنیادی می‌توانند در طول محور دیگر به ر تولید یک سلول دختری که یک سلول بنیادی قادر به تجدید خودش ـ سلول دختری که سلول تشدیدکننده موقت نامیده می‌شود (TA) م شوند و شروع به مهاجرت و تمایز می‌کنند (پائین). اختلاف کلیدی دو الگوی تقسیم جهت‌گیری دوک میتوزی است.

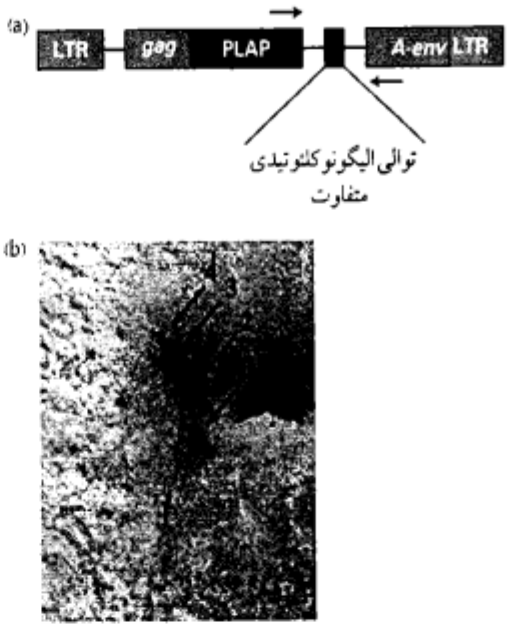
خصوصیت‌های سلول بنیادی خاص‌شان شناخته شدند. سلول‌های بنیادی برخی از خصوصیات آستروسیت‌ها، مانند تولید پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال[1] (GFAP) را دارند و همچنین می‌توانند به طور نامتقارن به منظور تجدید خودشان و به منظور تولید سلول‌های TA تقسیم شوند.

آشیانه سلول بنیادی ساب ونتریکولار توسط پیام‌های ناشناخته‌ای از سلول‌های اپندیمی که یک لایه درون لوله عصبی (خط بطنی) تشکیل می‌دهد و توسط سلول‌های آندوتلیال که تشکیل‌رگ‌های خونی را در همسایگی‌شان می‌دهند، ایجاد شده است (شکل ۱۴-۲۱) سلول‌های آندوتلیال و غشاء پایه‌ای که آنها تشکیل می‌دهند در تماس مستقیم با سلول‌های بنیادی عصبی است، عقیده بر این است که این سلول‌ها برای تشکیل این آشیانه ضروری هستند. هر سلول بنیادی عصبی یک مژک را از طریق لایه سلولی اپندیمی به منظور تماس مستقیم بطن می‌فرستد. اگر چه عملکرد مژک شناخته نشده است. ولیکن ممکن است بعنوان آنتن برای دریافت پیامهایی که غیر قابل دست‌یابی برای سلول بنیادی عصبی است عمل کند. پیامهایی که آشیانه را ایجاد می‌کنند به طور کامل شناخته نشده‌اند ولی شواهدی برای دخالت ترکیبی از عوامل مانند FGFها، BMPها، IGF، VEGF، TGFα و BDNF وجود دارد. BMPها باعث تمایز آستروسیتی نسبت به تمایز عصبی می‌شوند و بیان زیاد IGF (فاکتور رشد شبه انسولین) باعث می‌شود که در موش‌هایی با مغزهای بزرگ غیرطبیعی ایجاد شوند. مراحل بعدی تکوین عصبی در فصل ۲۳ توضیح داده شده است.

سلول‌های بنیادی خون‌ساز. همانند اپی‌تلیوم روده، خون بافتی است که بطور پیوسته جایگزین می‌شود. سلول‌های بنیادی که باعث ایجاد انواع مختلفی از سلول‌های خونی می‌شوند در مغز استخوان حیوانات بالغ قرار دارند. همه انواع سلول‌های خونی از یک نوع سلول بنیادی خون‌ساز که باعث ایجاد سلول‌های بنیادی خیلی تمایز یافته میلوئید و لنفوئید می‌شوند، حاصل می‌گردند. اگر چه سلول‌های بنیادی میلوئید و لنفوئید توانایی خود تجدیدگری دارند، ولی هر کدام توانایی ایجاد فقط یک یا دو نوع رده سلولی اصلی خون‌ساز را دارند. بنابراین این سلول‌ها بعنوان هم سلول‌های بنیادی و هم سلول‌های پیش‌ساز عمل می‌کنند.

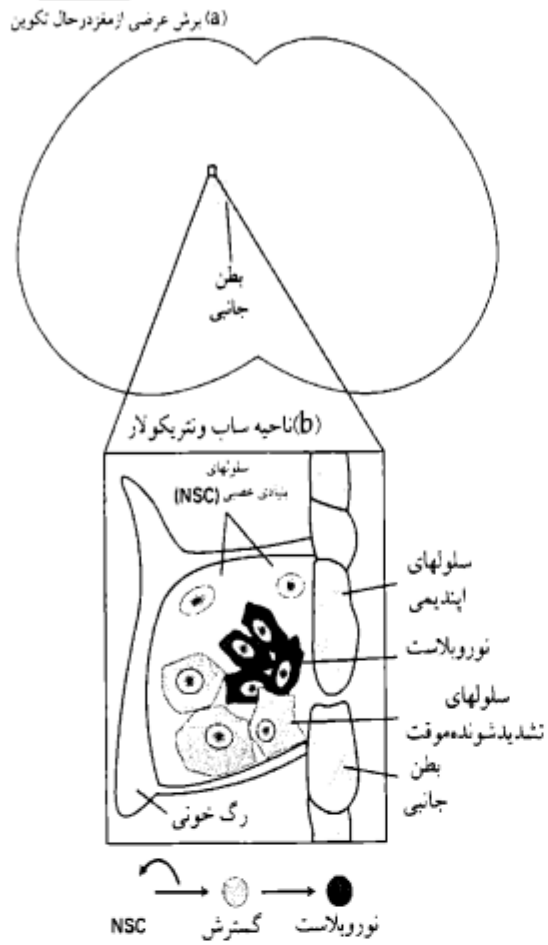
بعد از اینکه سلول‌های بنیادی خون‌ساز تشکیل شدند، چندین فاکتور رشد خارج سلولی که سیتوکین‌ها نامیده می‌شوند

1 - Glial fibrillart acidic protein



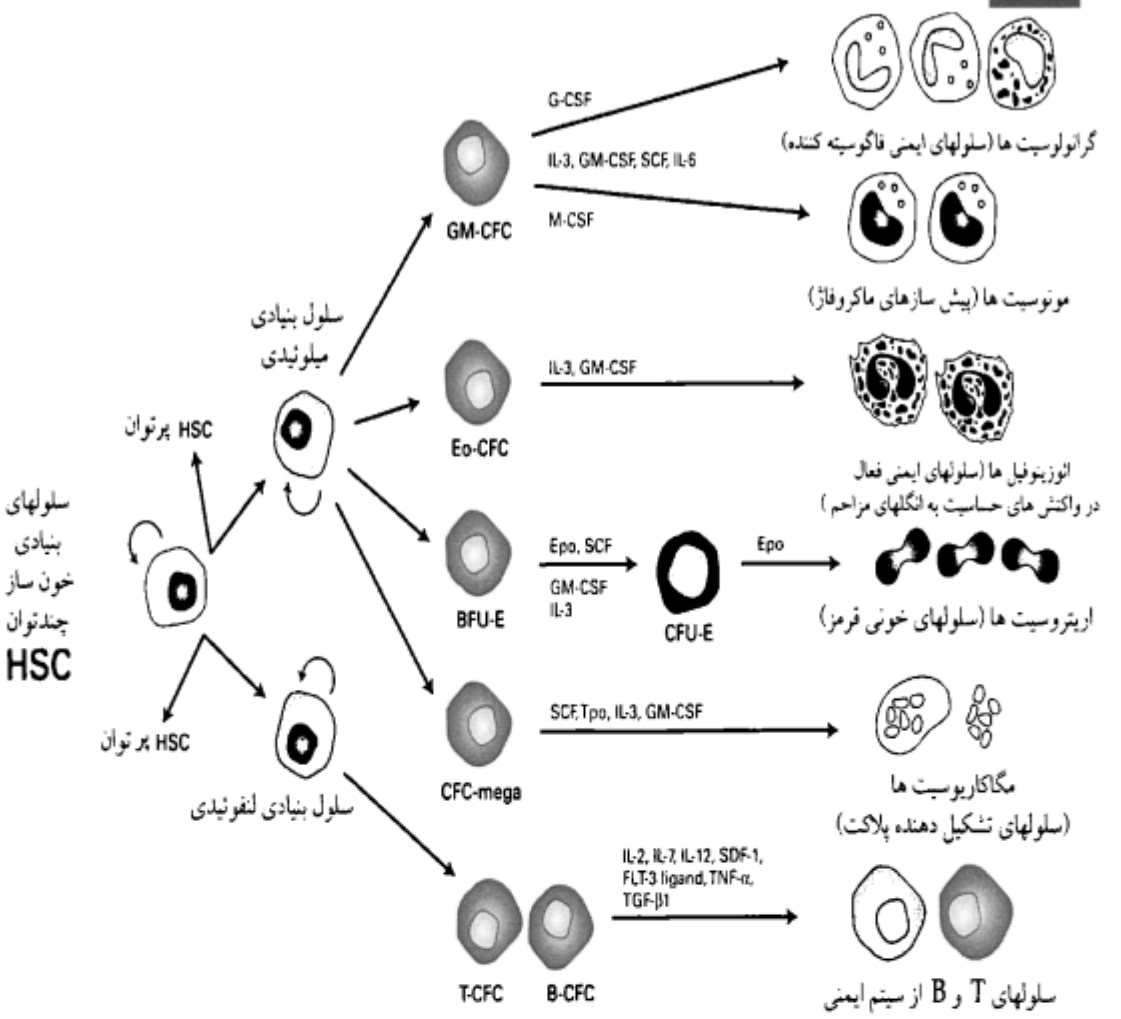
▲ **شکل تجربی ۱۳-۲۱ آلودگی رتروویروسی می‌تواند به منظور ردیابی رده سلولی استفاده شود.** (a) ژنوم ویروسی مهندسی شده. تکرارهای با انتهای طولانی (LTRs) تکرارهای رتروویروسی استاندارد هستند. پروتئین‌های ویروسی که برای عفونی کردن لازم هستند از ژن‌های **gag** و **A-env** رمزدار می‌شوند. PLAP ژن واردشده برای یک فسفاتاز قلیایی است. سنجش این آنزیم توسط رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی به منظور تشخیص سلول‌های حامل ویروس استفاده می‌شود. توالی الیگونوکلئوتیدی (که توسط تأمین نوکلئوتیدهای تصادفی سنتز شده است) در هر ویروس متفاوت است و می‌تواند توسط PCR با استفاده از پرایمرهای توالی‌هایی که در همه ویروس‌ها هستند استفاده شود و سپس تعیین توالی شود. کتابخانه‌ای با بیش از ۱۰۷ ویروس متفاوت ساخته شده است به دلیل اینکه چنین ویروس‌هایی فاقد انرژی لازم برای تولید ویریون‌های جدید در سلول‌های عفونی شده هستند هر ویروس ناقص فقط یک مرتبه توانایی عفونی کردن را دارد. (b) مقطع بافتی نشاندهنده سلول‌های عفونی‌شده با ویروس‌های ناقص. DNAی هر کلون رنگ‌آمیزی شده از سلول‌ها می‌تواند استخراج شده و توسط PCR به منظور تعیین توالی ویروس عفونی‌کننده تشدید شود. سلول‌های به وجود آمده از سلول عفونی شده اولیه همان توالی الیگونوکلئوتیدی را خواهند داشت، در صورتی که عفونت‌های دیگر توالی متفاوت را ایجاد خواهند کرد.

تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز به رده‌های سلول خونی را تنظیم می‌کنند. هر شاخه از درخت رده‌بندی سلول خونی تنظیم‌کننده‌های سیتوکینی متفاوتی دارد که اجازه تولید انواع سلول ویژه را می‌دهد. برای مثال بعد از خون‌ریزی وقتی که همه سلول‌های خونی مورد نیاز هستند، چندین سیتوکین تولید



▲ **شکل ۱۴-۲۱ آشیانه سلول بنیادی عصبی.** (a) برش عرضی از سیستم عصبی در حال تکوین نشان‌دهنده بطن جانبی (یک فضای پرشده با مایع در درون لوله عصبی). ناحیه‌ای که در اطراف بطن است. ناحیه ساب ونتریکولار نامیده می‌شود و جایگاه سلول‌های بنیادی است که از آن‌ها پیش‌سازهای عصبی حاصل می‌شوند. (b) سلول‌های بنیادی عصبی (یک عده از آستروسیت‌ها) در تماس با رگ‌های خونی و نزدیک سلول‌های اپندیمی هستند هر دو این سلول‌ها پیام‌ها و یا تماس‌های مستقیمی را به وجود می‌آورند که جمعیت سلول بنیادی را حفظ می‌کنند. سلول‌های بنیادی عصبی (NSC) به منظور تجدید خودشان و تشکیل جمعیتی تقسیم شونده از سلول‌های تشدیدشونده موقت (TA)، تقسیم می‌شوند. سلول‌های TA برای تشکیل نورویلاست‌ها تقسیم شده و آنها نیز باعث ایجاد نورون‌ها می‌شوند.

می‌شوند. ولی وقتی که کسی به مکانی با ارتفاع زیاد مسافرت می‌کند و اریتروسیت‌های زیادی را لازم دارد اریتروپوئیتین (سیتوکینی که فقط بر روی پیش‌سازهای اریتروسیت عمل می‌کند) تولید می‌شود. اریتروپوئیتین چندین مسیر پیام‌رسانی متفاوت را در داخل سلول فعال می‌کند که منجر به بیان ژن و درنتیجه شروع تشکیل اریتروسیت‌ها می‌شود (شکل ۶-۱۶ را ملاحظه کنید). درعوض GM-CSF یک سیتوکین متفاوت، تولید گرانولوسیت‌ها،



▲ **شکل ۱۵-۲۱ تشکیل سلول‌های خونی از سلول‌های بنیادی خون‌ساز در مغز استخوان.** سلول‌های بنیادی پرتوان ممکن است بطور متقارن به منظور تجدید خودشان تقسیم شوند یا به منظور تشکیل سلول بنیادی میلوئید یا لنفوئید و یک سلول دختری پرتوان مشابه سلول والدی بطور نامتقارن تقسیم شود، اگر چه سلول‌های میلوئید و لنفوئید توانایی خود تجدیدگری دارند هر نوع یکی از دو رده اصلی خون‌ساز را بوجود می‌آورد. بسته به نوع و مقدار سیتوکین‌های موجود، سلول‌های بنیادی میلوئید و لنفوئید سلول‌های پیش‌ساز مختلف را تولید می‌کنند که توانایی خودتجدیدگری را ندارند. سلول‌های پیش‌ساز به خاطر توانائی‌شان برای تشکیل کلونی‌های دارای انواع سلولی تمایز یافته نشان داده شده در سمت راست، سلول‌های تشکیل دهنده کلونی[1] نامیده می‌شوند. این کلونی‌ها در طحال حیواناتی که سلول‌های خونی از آنها برداشته شده است و سلول‌های پیش‌ساز به آنها وارد شده است شناسایی شده‌اند. تکثیر القاء شده توسط سیتوکین، متعهد شدن و تمایز سلول‌های پیش ساز باعث ایجاد انواع مختلف از سلول‌های خونی می‌شود و سیتوکین‌هایی که این فرآیندها را حمایت می‌کنند. مشخص شده‌اند. GM = ماکروفاژ - گرانولوسیت، EO = ائوزینوفیل، E = اریتروسیت، mega = مگاکاریوسیت، T = سلول T، B = سلول B، CFU = واحد تشکیل دهنده کلونی، CSF = فاکتور تحریک کلونی، IL = اینترلوکین، SCF = فاکتور سلول بنیادی، TPO = ترومبوپویتین، TNF = فاکتور نکروزتوموری، TGF = فاکتور رشد تغییر شکل دهنده، SDF = فاکتور مشتق از سلول استرومایی، FLT3 = لیگاند گیرنده تیروزین کینازی ۳ شبه fms.

ماکروفاژها، ائوزینوفیل‌ها و مگاکاریوسیت‌ها را تحریک می‌کند. رده‌های سلولی خون‌ساز با تزریق چندین نوع از سلول‌های پیش‌ساز به موشهایی که سلول‌های پیش‌ساز آنها توسط اشعه از بین رفته بود به وجود آمدند با مشاهده سلول‌های خونی که در این آزمایشات پیوندی بازیابی شدند، محققان توانستند به این نکته پی ببرند که پیش‌سازها (مانند GM-CFC و BFU-E) یا سلول‌های تمایزیافته‌ای مانند اریتروسیت‌ها، مونوسیت‌ها از نوع خاصی پیش‌ساز به وجود می‌آیند. جالب است که یک سلول بنیادی خون‌ساز برای بازیابی کل سیستم خونی یک موش اشعه خورده کافی است. اولین مرحله در این آزمایشات جداسازی انواع

1- Colony - Forming Cells (CFCs)

مختلف از پیش‌سازهای خون ساز بود. این جداسازی امکانپذیر است، زیرا هر نوع پیش‌ساز تولید ترکیبات بی‌نظیری از پروتئین‌های سطح سلولی را می‌کند که می‌توانند بعنوان نشانگرهای خاص آن نوع عمل کنند. اگر عصاره‌های مغز استخوان یا آنتی‌بادی‌های نشاندار با فلوروکروم برای این نشانگرها تیمار شوند، سلول‌های دارای نشانگرهای مختلف می‌توانند در دستگاه جداساز سلولی فعال شده با فلورسانس جداسازی شوند. (شکل ۲۸-۹ را ملاحظه کنید).

فراوانی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در حدود یک سلول به 10^4 سلول مغز استخوان است. فعال‌سازی ژن Hoxb4 در سلول‌های بنیادی جنینی تشکیل سلول‌های بنیادی خون‌ساز را پیش می‌برد. (همانطور که در فصل ۲۲ شرح داده شده است Hoxb4 نقشی را نیز در الگوی تشکیل در طول محور بدنی سر به دم بازی می‌کند). ژن Bmi نیز برای خود تجدیدگری سلول‌های بنیادی خون‌ساز و همچنین سلول‌های بنیادی عصبی مورد نیاز است. این ژن یک پروتئین تنظیم گر کروماتینی از نوع پلی‌کمب را رمزدار می‌کند که ژن‌های خاصی مانند برخی از **ژن‌های** Hox (گروهی از ژن‌های مهم تکوینی شرح داد شده در فصل ۲۲) را مهار می‌کند. Bmi جزئی از مجموعه پروتئینی PRC1 است که در بالا در رابطه با سلول‌های بنیادی جنینی شرح داده‌ایم. بنابراین اعضای گروه پلی کمپ از پروتئین‌ها هم در سلول‌های بنیادی بالغ و هم در سلول‌های بنیادی جنینی حائز اهمیت هستند.

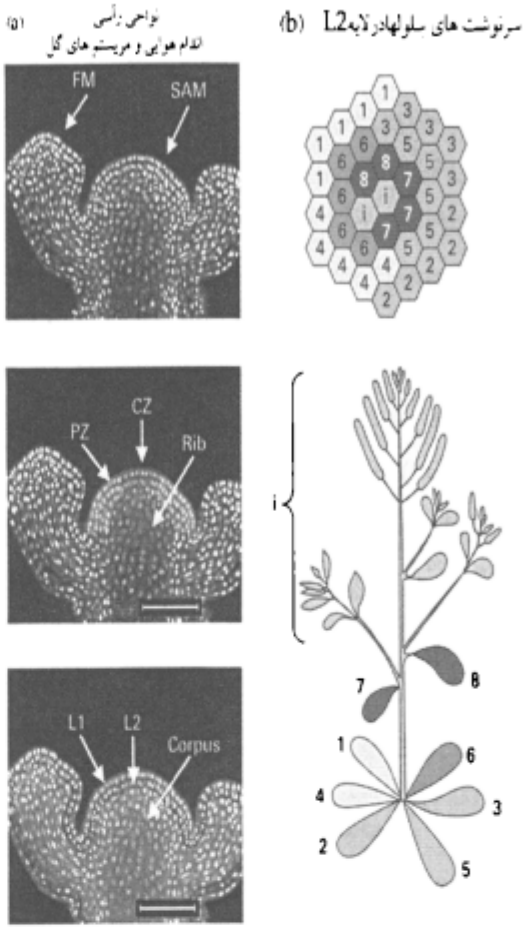
مانند سایر سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی خون‌ساز ساکنین یک آشیانه هستند. این آشیانه‌ها توسط سلول‌های دوکی شکل روی سطح استخوان در مغز استخوان ساخته می‌شود. N-کادهرین، سلول‌های بنیادی را به این سلول‌های آشیانه‌ای می‌چسباند. یک لیگاند شبه دلتا تولیدشده توسط سلول‌های آشیانه‌ای به گیرنده‌های نوتچ بر روی سلول‌های بنیادی پیام می‌دهد و جفت گیرنده فاکتورهای رشد دیگر باعث تحریک خود تجدیدگری و تمایز به سلول‌های بنیادی لنفوتید و میلوئید می‌شوند.

سلول‌های بنیادی می‌توانند سرطانی شوند. مثلاً لوکمیا سرطان سلول‌های سفید خونی است. این نوع سرطان در دو نوع از سلول‌ها بیان می‌شود. سلول‌های توموری لوکمی که از سلول‌های خونی سفید تمایزیافته حاصل شده‌اند و توانایی رشد محدودی دارند و سلول‌های بنیادی توموری لولمی که خطرناک‌تر هستند توانایی رشد نامحدودی دارند. این سلول‌های بنیادی توموری که به تنهایی قادر به ایجاد یک تومور جدید هستند در یک تومور انسانی در حدود یک مرتبه برای هر میلیون سلول‌های لوکمی تقسیم شونده هستند. بنابراین عمده سلول‌های لولمی توانایی ایجاد تومور جدید را ندارند. به منظور درمان موثر بایستی درمان‌هایی که انجام می‌گیرد باعث مرگ یا تقسیم میتوزی محدود شده سلول‌های بنیادی توموری شود. این امر نیز مشکل است زیرا بسیاری از سلول‌های بنیادی سرطانی یا به آهستگی تقسیم می‌شوند و یا اینکه برای یک مدت تقسیم نمی‌شوند و این امر آنها را به داروهای شیمی درمانی و اشعه مقاوم می‌کند، چون هر دو درمان، سلول‌های به سرعت تقسیم شونده را هدف قرار می‌دهند.

تاکنون پیوندهای مغز استخوان (درمانی برای لوکمیا و سایر اختلالات خونی) استفاده وسیع و موفقیت‌آمیز سلول‌های بنیادی را در پزشکی نشان داده است. در سال ۱۹۵۹ یک بیمار با لوکمیا در مرحله آخر به منظور تخریب سلول‌های سرطانی اشعه داده شد. این دختر، سلول‌های مغز استخوان را از دوقلوی همسانش دریافت کرد و بنابراین احتمال پاسخ ایمنی وجود نداشت و بعد از سه ماه درمان شد، این عمل شروعی بود برای درمان‌های امروزی که اغلب می‌تواند منجر به درمان کامل لوکمیا گردد.

این سلول‌های بنیادی در مغز استخوان پیوند زده‌شده می‌توانند سلول‌های خونی جدید و عملکردی در بیماران با بیماریهای خونی ارثی و همچنین بیماران سرطانی که اشعه و شیمی‌درمانی دریافت کرده‌اند، تولید کنند. هم شیمی درمانی و هم اشعه، سلول‌های مغز استخوان و همچنین سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند. پیوندهای مغز استخوان بعد از حذف سلول‌های سرطانی با اشعه انجام می‌شود. در نتیجه حمله ایمنی به سلول‌های لوکمی توسط سلول‌های تزریق شده بیشتر می‌شود. چندین بیماری وجود دارند که امروزه به طور معمول با پیوند مغز استخوان درمان می‌شوند. آنها شامل لوکمیاها و انواع مختلف آنمی‌ها، لنفوماها، نقص ایمنی ترکیبی شدید و اختلالات خودایمنی خاص هستند. موثربودن پیوندهای مغز استخوان در بین این بیماری‌ها و افراد بیمار از بهبود جزئی تا درمان کامل تغییر می‌کند. تحقیقات بیشتر در جریان است تا از سایر سلول‌های بنیادی در درمان بیماریهای بافت‌های غیرخونی استفاده شود.

شاید متوجه شده‌اید که همه تنظیم‌کننده‌های مولکولی سلول‌های بنیادی، هم‌خانواده پروتئین‌های پیام رسان هستند تا اینکه فقط خاص سلول بنیادی باشند. هر نوع پیامی به طور مکرر به منظور کنترل سرنوشت‌های سلولی و تکثیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این‌ها سیستم‌های پیام‌رسانی هستند که حداقل نیم‌میلیون سال قدمت دارند و همچنانکه سلول‌ها، بافت‌ها، اندام‌ها و حیوانات تغییرات جدید یافته‌اند از آنها استفاده جدیدی شده است. ما مثال‌های زیادی از



▲ **شکل ۱۶-۲۱ (شکل رنگی) سرنوشت‌های سلولی در مریستم‌های آرابیدوبسیس.** (a) در این مقاطع طولی، هسته‌های سلولی توسط رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید که به DNA متصل می‌شود، نشان داده شده است. در بالا مریستم انتهایی اندام هوایی (SAM) تولید اندامهای هوایی برگ‌ها و مریستم‌های بیشتر را می‌کند. تولید گل وقتی که مریستم‌ها از تولید اندام هوایی با برگ به طرف تشکیل گل می‌روند اتفاق می‌افتد و همراه با افزایش در تعداد سلول‌های مریستمی به منظور تشکیل مریستم‌های گل (FM) است که در اینجا نشان داده شده است. وسط: سلول‌ها در یک SAM سرنوشت‌های متفاوت و رفتارهای متفاوت را نشان می‌دهند. سلول‌ها به سرعت در ناحیه محیطی (PZ، سبز) به منظور تولید برگ‌ها و در ناحیه (Rib، آبی) به منظور تولید ساختارهای اندام هوایی مرکزی تقسیم می‌شوند، سلول‌های ناحیه مرکزی (CZ، قرمز) آهسته‌تر تقسیم می‌شوند و تولید منبع پیوسته‌ای از مریستم‌ها را می‌کنند و این سلول‌ها درنواحی Rib و PZ شرکت می‌کنند. پائین هر کدام از لایه‌های مریستم یک سلول پیش‌ساز حاصل شده است. خطوط مقیاس ۵۰μm (b) سرنوشت‌های سلولی را در لایه L2 نشان می‌دهد. رنگ هر ناحیه مرتبط با آن در قسمت a نیست.

حفاظت تکاملی را در فصل بعدی بر روی تکوین خواهیم دید.

مریستم‌ها آشیانه‌هایی برای سلول‌های بنیادی در گیاهان هستند

سلول‌های بنیادی در گیاهان در **مریستم‌ها** قرار گرفته‌اند و جمیت‌هایی از سلول‌های تمایزنیافته هستند که در انتهای اندامهای هوایی در حال رشد وجود دارند. مریستم‌های رأسی اندامهای هوایی[1] (SAM) تولید برگ‌ها و اندامهای هوایی و همچنین سلول‌های بنیادی را می‌کنند که مریستم‌های تقریباً نامیرا را ایجاد می‌کنند. مریستم‌ها می‌توانند هزاران سال در گونه‌های با طول عمر طولانی مانند درختان چوب قرمز (red wood) و کاج‌های با مخروط خاردار دوام بیاورند، همچنانکه گیاه رشد می‌کند سلول‌های حاصل از مریستم‌ها در دیواره‌های سفت محصور شده و نمی‌توانند بیشتر رشد کنند. SAMها می‌توانند به منظور تشکیل شاخه‌ها (هر شاخه با SAM خودش) شکافته شوند و یا تبدیل به مریستم‌های گل‌زا شوند (شکل ۱۶-۲۱). مریستم‌های گل‌زا باعث ایجاد چهار اندام گل، کاسبرگ[2]، پرچم[3]، برچه[4] و گلبرگ [5] می‌شود که تشکیل گل را می‌دهند. برخلاف SAMها؛ مریستم‌های گل به تدریج که اندامهای گیاهی را بوجود می‌آورند از بین می‌روند.

یک مریستم آشیانه سلول بنیادی است ولی برای فهم اینکه این آشیانه چگونه به وجود می‌آید و حفظ می‌شود نیاز به تحقیقات بیشتری است. چندین ژن یافت شده است که تشکیل، حفظ و خصوصیات مریستم‌ها را تنظیم می‌کنند. بسیاری از این ژن‌ها فاکتورهای رونویسی را رمز دار می‌کنند و سلول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی را به مسیرهای متفاوت تمایزی هدایت می‌کنند برای مثال یک عده از تنظیم‌کننده‌ها مخصوصاً فاکتورهای رونویسی، جداشدن سلول‌های در حال تمایز را از SAMها همچنانکه برگ‌ها تشکیل می‌شوند، کنترل می‌کنند. همچنین سه نوع از تنظیم‌کننده‌ها تشکیل اندامهای گل را از مریستم‌های گل کنترل می‌کنند (شکل ۳۶-۲۲ را ملاحظه کنید). در هر دو حالت آبشاری از میانکنش‌های ژنی اتفاق می‌افتد که با فاکتورهای رونویسی قبلی باعث تولید اندامهای بعدی می‌شوند. در همان زمان سلول‌ها در حال تقسیم و در حال تمایز و گسترش یافتن از

1 - Shoot apical meristens
2- Sepal
3- Stamen
4- Carpel
5- Pexal

جایگاههای تشکیل اولیه‌شان هستند. پیامی که یک آشیانه گیاهی را ایجاد می‌کند Zwille/Pinhead است که پروتئینی مرتبط با پروتئین Piwi رمزدار می‌کند (که از آشیانه‌های سلول بنیادی در حیوانات حمایت می‌کند) (شکل ۸-۲۱ را ملاحظه کنید) یک خانواده آرگونوت[1] از پروتئین‌ها وجود دارند که ژن‌ها را در پاسخ به مولکول‌های RNAی کوچک مهار می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۱-۲۱

تولد سلول‌ها: سلول‌های بنیادی، آشیانه‌ها و رده‌بندی

■ در تقسیم سلولی نامتقارن دو نوع متفاوت از سلول‌های دختری از یک سلول مادری حاصل می‌شوند. برخلاف آن هر دو سلول دختری ایجادشده در تقسیم متقارن مشابه هستند ولی ممکن است اگر آنها در معرض پیام‌های خارجی متفاوت قرار بگیرند. سرنوشت‌های سلولی متفاوتی داشته باشند (شکل ۱-۲۱ را ملاحظه کنید)

■ سلول‌های بنیادی پرتوان می‌توانند بیش از یک نوع سلول مثلاً در برخی حالات یک سلول بنیادی با توانایی محدودشده بیشتر به منظور ایجاد انواع سلولی تمایز یافته، تولید کنند.

■ تکوین جنینی کرم الگانس با تقسیم نامتقارن تخم لقاح‌یافته شروع می‌شود (زیگوت). دودمان‌های همه سلول‌ها در کرم‌های بالغ شناخته شده است و تا حد زیاد تجدیدپذیر هست (شکل ۵-۲۱ را ملاحظه کنید).

■ mRNAهای تنظیمی کوتاه (میکرو RNAها) زمان تقسیمات سلولی تکوینی را توسط ممانعت از ترجمه mRNAهایی که پروتئین‌های آنها دودمان‌های سلولی را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌کنند (شکل ۶-۲۱ را ملاحظه کنید)

■ سلول‌های بنیادی جنینی کشت داده شده (سلول‌های ES) توانایی ایجاد انواع زیادی از سلول‌های تمایزیافته را دارند. آنها در تولید موشهای تغییریافته ژنتیکی مفید هستند و قابلیت استفاده‌های درمانی را دارند. فاکتورهای رونویسی ویژه و تنظیم‌کننده‌های کروماتینی در ایجاد خصوصیات سلول‌های بنیادی جنینی مهم هستند.

■ سلول‌های بنیادی در آشیانه‌هایی که پیامهایی را به منظور تداوم جمعیت سلول‌های بنیادی غیرتمایزی تولید می‌کنند، ایجاد می‌شوند. این آشیانه‌ها بایستی سلول‌های بنیادی را بدون اینکه اجازه دهد آنها تکثیر اضافی داشته باشند حفظ می‌کنند و بایستی تمایز را بلوکه کنند.

■ سلول‌های لایه زایا، سلول‌های بنیادی مرتبط با غدد جنسی، پوست، اپی‌تلیوم روده‌ای و اغلب بافت هایی که سلول‌های بافت‌های تمایزیافته را ایجاد می‌کنند هستند که آسیب می‌بینند یا جدا می‌شوند یا پیر می‌شوند (اشکال ۸-۲۱ و ۱۱-۲۱ و ۱۴-۲۱ را ملاحظه کنید)

■ در دودمانهای سلولی خونی، انواع پیش‌ساز مختلفی تشکیل شده و تحت کنترل سیتوکین‌های متفاوت تکثیر پیدا می‌کنند (شکل ۱۵-۲۱ را ملاحظه کنید). این امر به بدن اجازه می‌دهد تا به طور اختصاصی تجدید برخی و یا همه انواع سلولی ضروری را القاء کند.

■ سلول‌های بنیادی توسط کنترل‌های ویژه‌ای که در آشیانه عمل می‌کنند از تمایز ممانعت می‌شوند. یک سطح بالایی از بتاکاتنین (جزئی از مسیر پیام رسانی Wnt) در حفظ سلول‌های بنیادی در پوست و روده توسط هدایت سلول‌ها از طرف تقسیم تا به حالات تمایزی نقش دارد.

■ سلول‌های بنیادی گیاهی برای زیست گیاه در مریستم وجود دارند. سلول‌های مریستمی می‌توانند طیف وسیعی از ساختارها و انواع سلولی را ایجاد کنند.

۲-۲۱ تخصصی‌شدن گونه سلولی در مخمر

در قسمت قبلی، ما دیدیم که سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز سلول‌هایی را تولید می‌کنند که مسیرهای تمایزی ویژه‌ای را طی می‌کنند. به این مکانیسم‌های تنظیمی ظریف تمایزی **تخصصی شدن گونه سلولی** اطلاق می‌شود. تخصصی شدن معمولاً شامل ترکیبی از پیام خارجی با مکانیسم‌های انتقال پیام داخلی همانند آنهایی که در فصول ۱۵ و ۱۶ توضیح داده شده است، می‌باشد. گذر از یک سلول تمایز نیافته به سلول در حال تمایز اغلب شامل تولید یک یا تعدادی از فاکتورهای رونویسی است. فاکتورهای رونویسی تازه ایجادشده کلیدهای قدرتمندی هستند که فعال‌سازی (و برخی اوقات مهار) عده زیادی از ژن‌های مفید را آغاز می‌کنند. بنابراین یک تغییر جزئی می‌تواند باعث تغییر زیادی در بیان ژن شود که ویژگی جدیدی را به سلول می‌دهد.

اولین مثال از تخصصی‌شدن گونه سلول، جوانه‌زنی مخمر ساکاروماسیس سرویزیه است. ما با این یوکاریوت تک‌سلولی مفید در فصل ۱ آشنا شدیم و در سایر فصل‌ها با آن برخورد کرده‌ایم. ساکاروماسیس سرویزیه سه گونه سلولی را ایجاد می‌کند: سلول‌های هاپلوئید a و α و سلول‌های دیپلوئید α/a هر گونه، ژن‌های فعال خاص خودش را دارد و سایر ژن‌ها در هر سه نوع

1- Argonaute

سلولی فعال هستند. همانند بسیاری از موجودات زنده و بافت‌ها، تخصصی شدن گونه سلولی در مخمر توسط تعدادی از فاکتورهای رونویسی که فعالیت‌های بسیاری از ژن‌های دیگر را هماهنگ می‌کنند، کنترل می‌شود. خصوصیات تنظیمی مشابه با پاسخ‌های سلول‌های یوکاریوتی عالی‌تر به پیامهای محیطی و در تخصصی شدن و الگودهی سلول‌ها و بافت‌ها در طی تکوین (فصل ۲۲) یافت شده است.

مطالعات آرایه DNA تصویر وسیع ژنومی از نوسانات بیان ژنی در انواع سلولی مختلف و مراحل مختلف چرخه زندگی ساکاروماسیس سرویزیه فراهم کرده است (شکل ۲۹-۵ را برای توضیح تکنیک آرایه DNA را ملاحظه کنید). این مطالعات ۳۲ ژن را شناسایی کرده‌اند که بیشتر از دو مرتبه در سلول‌های α نسبت به سلول‌های a رونویسی می‌شوند. ۵۰ ژن دیگر بیشتر از دو مرتبه در سلول‌های a نسبت به سلول‌های α رونویسی می‌شوند. فرآورده‌های این ۸۲ ژن که در ابتدا توسط تنظیم کننده‌های رونویسی تخصصی کردن نوع سلولی فعال می‌شوند، بسیاری از تفاوت‌های اساسی بین دو گونه سلولی را ایجاد می‌کنند. نتایج، تغییرات را فقط در جز کوچکی از ژنوم تأیید می‌کنند. در این حالت کمتر از ۲ درصد از تقریباً ۶۰۰۰ ژن مخمری به طور بارز می‌توانند رفتار و خصوصیات سلول‌ها را تغییر دهند. رونویسی از تعداد خیلی بیشتر ژن‌ها (در حدود ۲۵ درصد از کل) در سلول‌های دیپلوئید به طور اساسی در مقایسه با سلول‌های هاپلوئید تغییر کرد. این اختلافات در الگوهای بیان باعث ایجاد این احساس می‌شود که سلول‌های a و α خیلی مشابه هستند (از اینرو بیان ژن‌های نسبتاً کمی بین آنها متفاوت است) در صورتیکه سلول‌های هاپلوئید و دیپلوئید کاملاً متفاوت هستند.

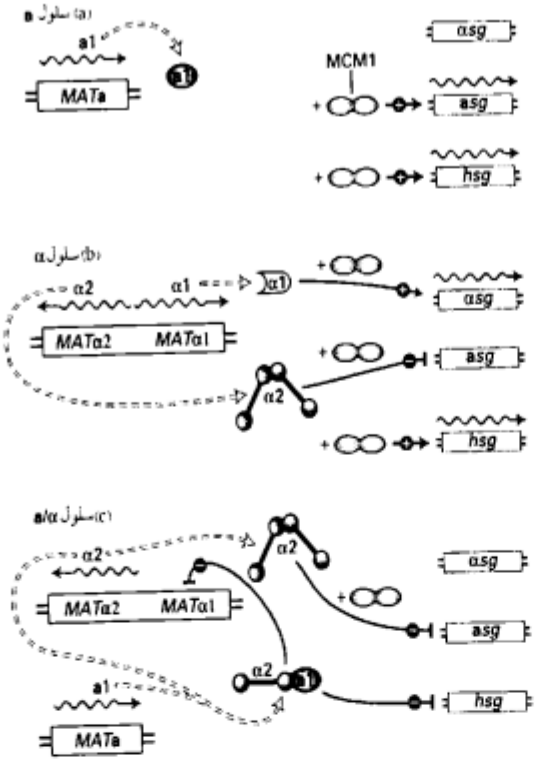
فاکتورهای رونویسی گونه آمیزشی (گونه جفت‌گیرنده) گونه سلولی را تعیین می‌کند

هر سه گونه سلولی ساکاروماسیس سرویزیه تعداد بی‌نظیری از ژن‌های تنظیمی را که مسئول اختلافات بین سه گونه سلولی هستند بیان می‌کنند، همه سلول‌های هاپلوئید ژن‌های خاص هاپلوئید را بیان می‌کنند علاوه بر آن سلول‌های a ژن‌های خاص a و سلول‌های α ژن‌های خاص α را بیان می‌کنند. در سلول‌های α/a دیپلوئید ژن‌های خاص دیپلوئید بیان می‌شوند، در صورتیکه ژن‌های خاص هاپلوئید α و a بیان نمی‌شوند. همانطور که در شکل ۱۷-۲۱ نشان داده شده است سه نوع فاکتورهای رونویسی خاص گونه سلولی a_1 و α_1 α_2 در جایگاه MAT رمزدار می‌شود و در ترکیب با فاکتور رونویسی عمومی که MCM1 نامیده می‌شود و در هر سه گونه سلولی بیان می‌شود، عمل می‌کند تا بیان ژن خاص گونه سلولی را در ساکاروماسیس سرویزیه واسطه‌گری کند. بنابراین عملکرد فقط سه فاکتور رونویسی می‌تواند سلول مخمری را در مسیر تمایزی خاصی که منجر به گونه سلولی خاص می‌شود، قرار دهد. با آزمایشات آرایه DNA ما اثر این بازیگرهای کلیدی را شناختیم که فعال‌سازی یامهار یک عده از ژن‌ها خصوصیات سلولی را کنترل می‌کند.

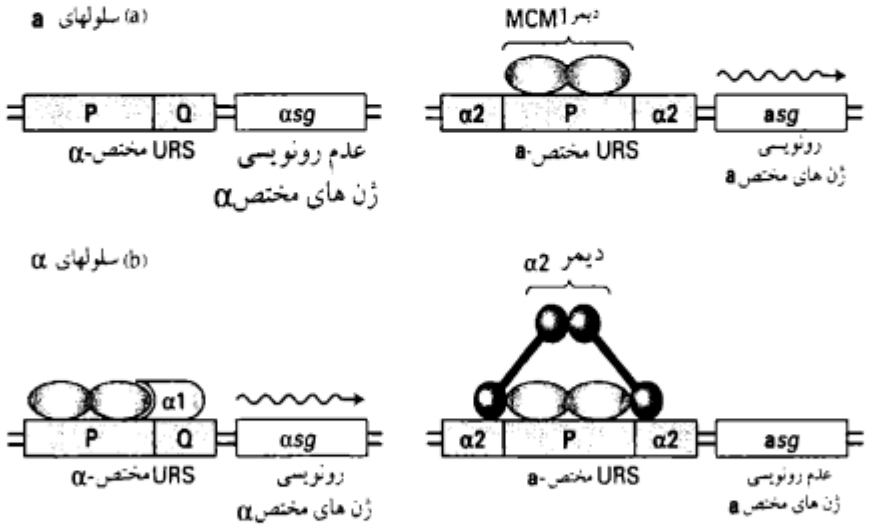
MCM1 اولین عضو خانواده MADS از فاکتورهای رونویسی است (MADS مخففی از چهار فاکتورهای رونویسی شناخته شده در این خانواده است). پروتئین‌های اتصال یابنده به DNA تشکیل دهنده این خانواده دیمر می‌شوند و دارای یک دُمین مشابه با انتهای N از MADS است در قسمت ۲۱.۳ ما با سایر فاکتورهای رونویسی MADS که در تکوین ماهیچه اسکلتی نقش دارند برخورد خواهیم کرد. فاکتورهای رونویسی MADS نیز گونه‌های سلولی را در اندامهای گل (شکل ۳۶-۲۲ را ملاحظه کنید) تعیین می‌کنند. MCM1 به تنهایی رونویسی ژن‌های خاص a را در سلول‌های a و ژن‌های خاص هاپلوئیدی را در هر دو گونه سلولی α و a فعال می‌کند (شکل ۱۷-۲۱ را ملاحظه کنید). در سلول‌های α هاپلوئید، فعالیت MCM1 توسط ارتباط آن با فاکتور رونویسی α_1 یا α_2 نیز تعیین می‌شود. در نتیجه این عمل ترکیبی، MCM1 رونویسی ژن‌های خاص a را شروع می‌کند و رونویسی ژن‌های خاص a را در سلول‌های α مهار می‌کند. اکنون اجازه دهید دید دقیق‌تری در مورد اینکه چگونه MCM1 و پروتئین‌های رمزدار شده توسط MAT اثرات شان را اعمال می‌کنند، داشته باشیم.

MCM1 و کمپلکس MCM1-α_1 رونویسی ژن را فعال می‌کند.

در سلول‌های a، MCM1 هومودیمری، به توالی جعبه P در توالی‌های تنظیمی بالادستی و URS های ژن‌های مختص a متصل می‌شود و رونویسی آنها را تحریک می‌کند (شکل ۱۸-۲۱) رونویسی ژن‌های خاص α توسط دو توالی نزدیک به هم (جعبه P و جعبه Q) که در URS ها مرتبط با این ژن‌ها قرار گرفته است، کنترل می‌شود. اگر چه MCM1 به تنهایی به جعبه P در URS های مختص a متصل می‌شود، ولی به جعبه P در URS های مختص α متصل نمی‌شود. بنابراین سلول‌های a ژن‌های α را رونویسی نمی‌کنند.



◀ **شکل ۱۷-۲۱ کنترل رونویسی ژن‌های خاص گونه سلولی در ساکاروماسیس سرویزیه** توالی‌های رمزدار کننده حمل شده در محل MAT در سلول‌های هاپلوئید α و a با هم تفاوت دارند. سه نوع فاکتورو رونویسی مختص گونه‌ای (a_1 و α_2 و α_1) رمز دار شده در محل MAT با MCM1 عمل می‌کنند، یک فاکتور رونویسی ساختاری تولید شده توسط هر سه گونه سلولی که الگوی متفاوتی از بیان ژن را در هر سه گونه سلولی ایجادمی‌کند. mRNA=αsg ها ژن‌های مختصص a، mRNA=αsg هـــا / ژن‌هـــای مـختص α، mRNA=hsg ها / ژن‌های مختص هاپلوئیدی.



▲ **شکل ۱۸-۲۱ فعالیت MCM1 در سلول‌های مخمری a و α.** MCM1 بصورت یک دیمر به جایگاه P در توالی‌های بالادستی مختص α و a متصل می‌شود (URSها) که به ترتیب رونویسی ژن‌های خاص α و a را کنترل می‌کنند. (a) در سلول‌های a، MCM1 رونویسی ژن‌های مختص a را تحریک می‌کند. MCM1 به طور موثری به جایگاه P در URS های مختص α در غیاب پروتئین α_1 متصل نمی‌شود. (b) در سلول‌های α فعالیت MCM1 توسط اتصال آن با α_1 و α_2 تغییر یافته است. کمپلکس α_1-MCM1 رونویسی ژن‌های مختص α را تحریک می‌کند، در صورتیکه کمپلکس α_1-MCM1 رونویسی ژن‌های مختص a را بلوکه می‌کند. کمپلکس α_2-MCM1 در سلول‌های دیپلوئید نیز تولید می‌شود که در آنجا نیز همان اثر بلوکه کنندگی را بر روی رونویسی ژن‌های مختص a دارد. (شکل ۱۷-۲۱)

در سلول‌های α که تولید فاکتور رونویسی α رمزدار شده توسط MATα را می‌کنند، اتصال خودبخودی MCM1 و α_1 به‌جایگاههای PQ با تمایل بالا اتفاق می‌افتد. در شکل (۱۸-۲۱) این اتصال، رونویسی ژن‌های مختص α را فعال می‌کند. بنابراین رونویسی مختص a نوع ساده‌ای از فاکتور رونویسی منفرد اتصال یابنده به ژن‌های هدف است. در حالیکه رونویسی مختص α نیاز

به ترکیبی از دو فاکتور دارد (هیچکدام از آنها به تنهایی نمی‌توانند ژن‌های هدف را فعال کنند).

کمپلکس‌های MCM1-a_1 و α_2-α_1 رونویسی را مهار می‌کنند.

اتصال خیلی اختصاصی در نتیجه میانکنش α_2 با فاکتورهای رونویسی دیگر در جایگاههای مختلف DNA اتفاق می‌افتد. در اطراف جعبه P در هر URS خاص a دو جایگاه اتصال α_2 وجود دارد. هم MCM1 و هم α_2 می‌توانند به طور مستقل به یک URS مختص a با تمایل نسبتاً کم متصل شوند. در سلول‌های α اتصال خیلی متقارن و همزمان هم α_2 و هم پروتئین MCM1 به این جایگاه‌ها با تمایل بالا اتفاق می‌افتد. این اتصال با تمایل بالا رونویسی ژن‌های خاص a را مهار می‌کند و این امر را که آنها در سلول‌های α_2 و سلول‌های دیپلوئید بیان نمی‌شوند را تضمین می‌کند (شکل ۱۸-۲۱ سمت راست را ملاحظه کنید). MCM1 اتصال α_2 به یک URS مختص a توسط جهت‌دهی دُمین‌های اتصال به DNA از دیمر α_2 به توالی‌های اتصال یابنده α_2 را در این URS آغاز می‌کند. از این جهت مولکول α_2 دیمری به هر دو جایگاه در URS مختص α (هر جایگاه DNA بعنوان یک نیمه جایگاه شناخته می‌شود) متصل می‌شود. موقعیت‌های نسبی هر دو نیمه جایگاه‌ها و جهت‌دهی آن‌ها به طور زیادی در بین URSهای مختص a متفاوت حفظ شده است.

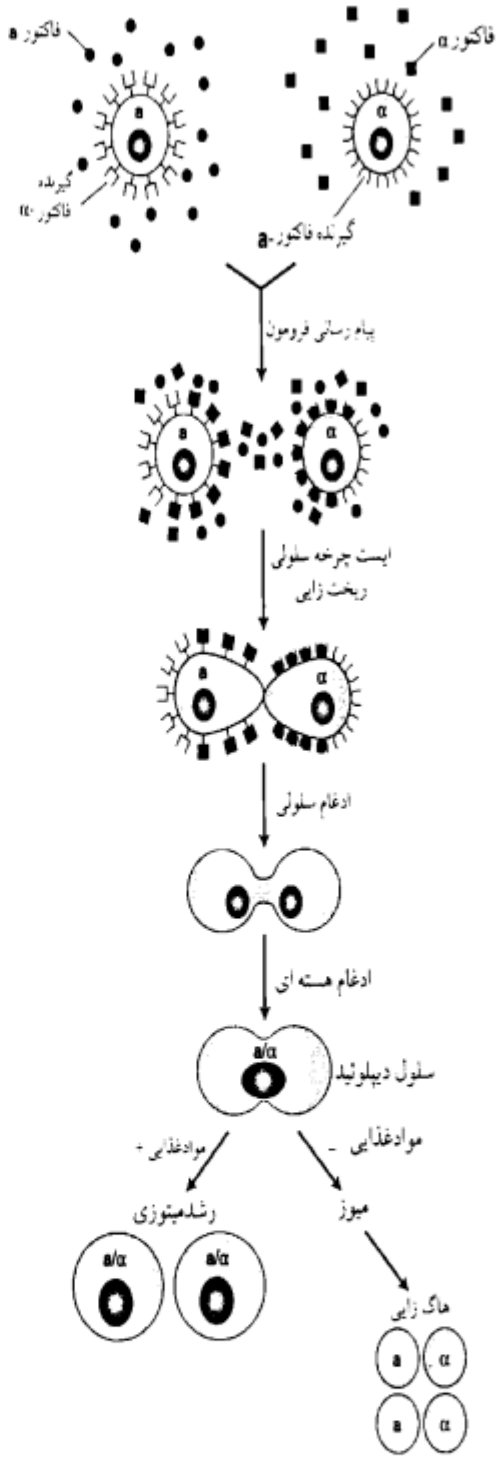
ترکیبات فاکتورهای رونویسی اختصاصیت زیادی را در تنظیم ژن به وجود می‌آورد. وجود چندین جایگاه اتصالی α_2 در ژنوم و خصوصیت "شل بودن" پروتئین α_2 ممکن است تعداد ژن‌هایی را که این پروتئین می‌تواند آنها را تنظیم کند را توسعه می‌دهد. برای مثال، در سلول‌های دیپلوئید α/a و α_2 با α_2 تشکیل هترودیمر می‌دهد که هم ژن‌های مختص هاپلوئیدی و هم ژن رمزدهنده α_1 را مهار می‌کند (شکل ۱۷-۲۱ را ملاحظه کنید) مثالی از α_2 پیشنهاد می‌کند که خصوصیت شل بودن ممکن است استراتژی عمومی برای افزایش محدوده تنظیمی یک فاکتور رونویسی منفرد باشد.

فرومون‌ها آمیزش سلول‌های α و a به منظور تولید گونه سلولی سوم را القاء می‌کنند.

یک ویژگی مهم از چرخه حیاتی مخمر توانایی سلول‌های α و a هاپلوئید برای آمیزش است که به هم متصل شده و با هم برای ایجاد سلول α/a دیپلوئید امتزاج می‌یابند (شکل ۶-۱ را ملاحظه کنید). هر گونه سلولی هاپلوئید فاکتور آمیزشی متفاوتی را ترشح می‌کند (یک پلی‌پپتید کوچک فرومون) و یک G پروتئین جفت شده با گیرنده در سطح سلول را بیان می‌کند که فرومون ترشح‌شده توسط سلول‌های نوع دیگر را می‌شناسد. بنابراین سلول‌های a و α هر دو فرومون‌ها را ترشح می‌کنند و به آن‌ها جواب می‌دهند (شکل ۱۹-۲۱). اتصال فاکتورهای آمیزشی به گیرنده‌هایشان، بیان تعدادی از ژن‌های رمزدار کننده پروتئین‌ها را که توقف چرخه سلولی را در G_1 هدایت می‌کنند القاء می‌کنند و همچنین اتصال و امتزاج سلول‌های هاپلوئیدی را به منظور تشکیل سلول‌های دیپلوئید شروع می‌کنند. در حضور مواد غذایی کافی سلول‌های دیپلوئید به رشد ادامه خواهند داد. فقر غذایی باعث القاء میوز در سلول‌های دیپلوئید می‌گردد که هر کدام چهار هاگ هاپلوئید را به وجود می‌آورد. اگر شرایط آزمایشگاهی برای رشد رویشی مناسب باشد هاگ‌ها جوانه‌زده و متحمل تقسیم میتوزی خواهند شد.

مطالعات با جهش یافته‌های مخمر نگرشی را نسبت به اینکه چگونه فرومون‌های a و α جفت‌گیری را القاء می‌کنند فراهم کرده است. برای مثال سلول‌های مخمری هاپلوئیدی جهش‌هایی را در جایگاه **استریل** 12(STE12) دارند که نمی‌توانند به فرومون‌ها پاسخ دهند و آمیزش نمی‌کنند. ژن‌های STE12 یک فاکتور رونویسی را رمزدار می‌کنند که به توالی DNA یی که به آن عنصر پاسخ به فرومون اطلاق می‌شود متصل می‌شود که در URSهای مختص α a موجود است. اتصال فاکتورهای آمیزشی کننده به گیرنده‌های سطح سلولی، آبشاری از رویدادهای پیام‌رسانی را شروع می‌کنند که نتیجه‌اش فسفریلاسیون چندین پروتئین مانند پروتئین STE12 است (شکل ۲۸-۱۶ را ملاحظه کنید). این فسفریلاسیون سریع مرتبط با افزایش در توانایی Ste12 برای تحریک رونویسی است. اکنون شناخته نشده است که آیا Ste12 بایستی به منظور تحریک رونویسی در پاسخ به فرومون فسفریله شود یا نه.

میانکنش پروتئین Ste12 با DNA در کنترل رونویسی URS از Ste12 مورد بررسی قرار گرفته است (که یک ژن مختص a رمزدار کننده گیرنده فرومون α است). تولید القاء شده توسط فرومون گیرنده α توسط Ste12 بازده فرآیند آمیزش را افزایش می‌دهد. در نزدیکی URS مختص a در ژن Ste12 یک عنصر پاسخ فرومونی وجود دارد که به Ste12 متصل می‌شود. وقتی که سلول‌های a با فرومون α تیمار می‌شوند رونویسی ژن Ste12 در فرآیندی که نیاز به پروتئین Ste12 دارد، افزایش می‌یابد. پروتئین Ste12 به طور موثری به عنصر پاسخ به فرومون در URS از Ste12 وقتی که MCM1 به طور همزمان به جایگاه P مجاور متصل شده است، وصل می‌شود.



▲ **شکل ۱۹-۲۱ آمیزش القاشده توسط فرومون سلول‌های مخمری هاپلوئید.** سلول‌های α تولید فاکتور آمیزشی α و گیرنده فاکتور a را می‌کنند، سلول‌های a تولید فاکتور a و گیرنده فاکتور α را می‌کنند. اتصال فاکتورهای آمیزشی به گیرنده‌هایشان بر روی سلول‌های گونه مخالف منجر به فعال‌سازی ژنی می‌شود که نتیجه‌اش آمیزشی و تولید سلول‌های دیپلوئید است. در حضور مواد غذایی کافی، این سلول‌ها بصورت دیپلوئید رشد خواهند کرد. بدون مواد غذایی کافی، سلول‌ها متحمل میوز خواهند شد و چهار هاگ هاپلوئید را تشکیل خواهند داد.

ما قبلاً دیدیم که MCM1 می‌تواند بعنوان یک فعال‌کننده یا مهارگر در URSهای مختلف بسته به اینکه آیا آن با α_1 یا α_2 تشکیل کمپلکس می‌دهد، عمل کند. در این حالت عملکرد MCM1 بعنوان یک فعال‌کننده توسط اتصال فاکتور رونویسی دیگر (Ste12) که فعالیت آن توسط پیام‌های خارج سلولی تنظیم می‌گردد، تحریک می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۲-۲۱

تخصصی شدن گونه سلولی در مخمر

- تخصصی شدن هر یک از سه گونه سلولی مخمر (سلول‌های هاپلوئید a و α و سلول‌های دیپلوئید a/α) توسط عده‌ای منحصر به فرد از فاکتورهای رونویسی عمل کننده در ترکیبات مختلف در جایگاههای تنظیمی ویژه در ژنوم مخمر، انجام می‌شود (شکل ۱۷-۲۱ را ملاحظه کنید)
- برخی از فاکتورهای رونویسی می‌توانند بسته به جایگاههای تنظیمی که آنها متصل می‌شوند و بسته به حضور یا غیاب سایر فاکتورهای رونویسی متصل‌شده به جایگاه‌های مجاور، به صورت مهارگر یا فعال‌کننده عمل کنند.
- اتصال فرومون‌های گونه آمیزشی توسط سلول‌های مخمری هاپلوئید رونویسی ژن‌های رمزکننده پروتئین‌هایی که آمیزشی را واسطه‌گری می‌کنند و بدان جهت ایجاد گونه سلولی سوم مخمری را می‌کنند (شکل ۱۹-۲۱ را ملاحظه نمائید).

۳-۲۱ اختصاصی شدن و تمایز ماهیچه

آرایش موثری از استراتژی‌های مولکولی (برخی از آنها شبیه فرآیندهایی هستند که در تخصصی شدن گونه سلولی در مخمر وجود دارند)، در انجام مسیرهای تکوینی پیچیده که موجودات پرسلولی را تعیین خصوصیت می‌کند، به کار می‌روند. سلول‌های ماهیچه‌ای برای چنین مطالعاتی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند به این دلیل که تکوین آنها می‌تواند در سلول‌های کشت داده شده و همچنین در حیوانات سالم مطالعه شود. پیشرفت‌های اولیه در فهم تشکیل سلول‌های ماهیچه‌ای (میوژنز) از کشف ژن‌های تنظیمی که می‌توانست سلول‌های کشت داده شده را به سلول‌های ماهیچه‌ای تبدیل کنند، حاصل شد. سپس جهش‌هایی در موش که آن ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دادند ایجاد شدند و به منظور درک عملکردهای پروتئین‌های رمزدارشده توسط این ژن‌ها مطالعه شدند. سپس دانشمندان بررسی کردند که چگونه ژن‌های تنظیمی

سایر ژن‌ها را کنترل می‌کنند.

مطالعات ریزآرایه‌ای اخیر ژن‌هایی را که رونویسی آنها در زیرگونه‌های ماهیچه‌ای موش فرق می‌کرد مورد بررسی قرار دارند. این مطالعات ۴۹ ژن از بیش از ۳۰۰۰ ژن بررسی شده را شناسایی کرد که در سطوح مختلف در ماهیچه قرمز (آهسته) و ماهیچه سفید (سریع) رونویسی می‌شوند. نشانه‌هایی برای پایه مولکولی تفاوت‌های عملکردی بین ماهیچه قرمز و سفید به نظر می‌رسد که از مطالعه این ۴۹ ژن و محصولات‌شان حاصل می‌شود.

در این‌جا ما نقش فاکتورهای رونویسی مشخص را در ایجاد ماهیچه اسکلتی در مهره‌داران بررسی می‌کنیم. این تنظیم گرهای ماهیچه‌ای روشن می‌سازند که چگونه رونویسی هماهنگ‌شده‌ای از ژن‌های هدف می‌تواند انواع سلولی تمایز یافته راتولید کند و چگونه آبشاری از رویدادهای رونویسی و پیام‌ها برای هماهنگ کردن رفتارها و عملکردهای سلول لازم هستند .

سومیت‌های جنینی میوبلاست‌ها را به وجود می‌آورند.

ایجاد ماهیچه اسکلتی مهره‌داران از طریق سه مرحله پیش می‌رود. تعیین سلول‌های ماهیچه‌ای پیش ساز که **میوبلاست** نامیده می‌شود که آنها را به طرف سرنوشت سلول ماهیچه‌ای می‌برد؛ تکثیر و در برخی حالات مهاجرت میوبلاست‌ها و تمایز نهایی آنها به ماهیچه بالغ (شکل ۲۰-۲۱). در اولین مرحله، میوبلاست‌ها از واحدهای سلول‌های مزودرمی که سومیت‌ها[1] نامیده می‌شوند حاصل می‌شوند که در کنار لوله عصبی در جنین قرار گرفته‌اند پیام‌های اختصاصی از بافت‌های اطراف نقش مهمی را در تعیین اینکه کجا میوبلاست‌ها در سومیت درحال توسعه ایجاد خواهند شد، بازی می‌کنند. در سطوح مولکولی تصمیم یک سلول مزودرمی برای قبول سرنوشت سلول ماهیچه‌ای انعکاسی از فعال‌سازی ژن‌های رمزدارکننده فاکتورهای رونویسی خاصی است.

همچنانکه میوبلاست‌ها تکثیر می‌یابند و مهاجرت می‌کنند (در جوانه عضوی در حال تکوین) آنها در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و تقسیم آن‌ها متوقف می‌شود و برای تشکیل سن سی‌تیوم با هم امتزاج حاصل می‌کنند (یک سلول محتوی چندین هسته بدون سیتوپلاسم مجزا). ما به این سلول چندهسته‌ای میوتیوب می‌گوئیم. همراه با امتزاج سلولی، افزایش در بیان ژن‌های لازم برای تکوین بیشتر ماهیچه‌ای و عملکرد آن رخ می‌دهد.

پیام‌های خارج سلولی خاصی که تخصصی شدن هر گروه از میوبلاست‌ها را القاء می‌کنند فقط به طور موقت بیان می‌شوند. این پیام‌های تولید فاکتور داخل سلولی را باعث می‌شوند که برنامه میوژنی را بعد از اینکه پیام‌ها القاء کننده از بین رفتند را حفظ می‌کنند. ما تشخیص و عملکردهای این پروتئین‌های میوژنی و میانکنش آنها را در چندین قسمت بعدی توضیح می‌دهیم.

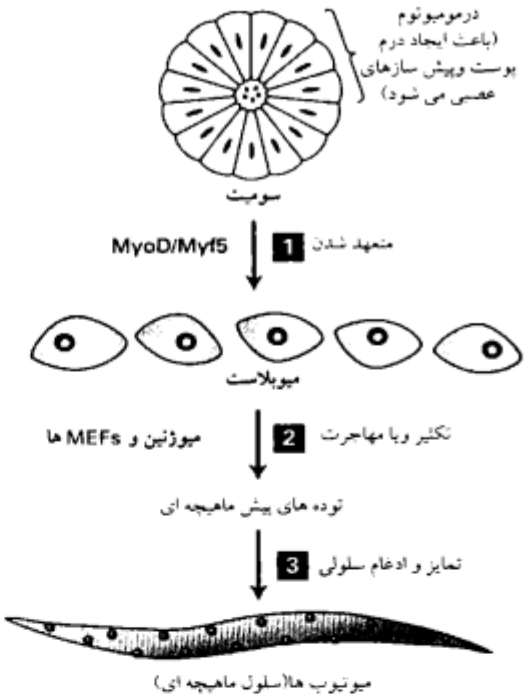
ژن‌های میوژنی اولین بار در مطالعات فیبروبلاست‌های کشت داده شده شناخته شدند.

ژن‌های میوژنی یک مثال خوبی از این است که چگونه فاکتورهای رونویسی تمایز پیش‌رونده را که در رده‌بندی سلول اتفاق می‌افتد کنترل می‌کنند، مطالعات *In Vitro* با رده سلولی فیبروبلاست C3H10T1/2 نقش مهمی را در تشریح مکانیسم‌های کنترلی رونویسی تنظیم‌کننده تشکیل ماهیچه اسکلتی بازی می‌کنند. وقتی که آنها در حضور ۵ - آزاسیتیدین (یک مشتق سیتیدینی که نمی‌تواند متیله شود) انکوبه شدند به میوتیوب‌ها تمایز یافتند. پس از ورود ۵ - آزاسیتیدین به سلول‌ها آن به ۵ - آزادئوکسی سیتیدین سه فسفات تبدیل می‌شود و سپس در داخل DNA به جای دئوکسی سیتیدین قرار می‌گیرد. به دلیل اینکه دئوکسی سیتیدین متیله شده به طور معمول در مناطق DNA غیرفعال از لحاظ رونویسی وجود دارد، جایگزینی رزیدوهای سیتیدین با مشتقی که نمی‌تواند متیله شود ممکن است اجازه فعال‌سازی ژن‌هایی را که قبلاً متیله شده‌اند را بدهد.

فرکانس زیاد تبدیل سلول‌های C3H10T1/2 تیمار شده با آزاسیتیدین به میوتیوپ‌ها این امر را می‌رساند که دوباره فعال‌سازی یک یا تعداد کمی از ژن‌های خیلی مرتبط به هم برای به پیش بردن برنامه میوژنی کافی است. برای آزمایش این فرضیه محققان DNAی سلول‌های C3H10T1/2 کشت داده شده در حضور ۵ - آزاسیتیدین را جداسازی کردند و آن را به سلول‌های تیمارنشده منتقل کردند. مشاهده اینکه یک سلول از 10^4 سلولی که به آن‌ها DNA منتقل شده بود به میوتیوپ تبدیل شدند در راستای فرضیه‌ای بودکه می‌گوید یک یا تعداد کمی از ژن‌های خیلی مرتبط به هم مسئول تبدیل فیبروبلاست‌ها به میوتیوپ‌ها هستند.

مطالعات بعدی منجر به جداسازی و تعیین ویژگی چهار ژن متفاوت ولی مرتبط به هم شد که می‌توانستند سلول‌های C3H10T1/2 رابه ماهیچه تبدیل کنند. شکل ۲۱-۲۱ پروتوکل آزمایشگاهی را برای شناسایی و ارزیابی یکی از این ژن‌ها که تعیین میوژنی (myoD) نامیده می‌شود، آورده است. سلول‌های C3H10T1/2 که به آن‌ها DNAی myoD منتقل شده بود و

1 - Somites



▲ شکل ۲۰-۲۱ سه مرحله در تکوین ماهیچه اسکلتی مهره‌داران
سومیت‌ها اپی‌تلیال کره‌ای شکل از سلول‌های مزودرمی جنینی هستند برخی از آنها (میوتوم) بعد از دریافت پیام‌هایی از سایر بافت‌هابصورت میوبلاست‌ها تبدیل می‌شوند. (1) بعد از اینکه میوبلاست‌ها تکثیر و به جوانه‌های عضوی و یا جای دیگر مهاجرت می‌کنند (2) به سلول‌های ماهیچه‌ای چند هسته‌ای تمایز می‌یابند که میوتیوب نامیده می‌شود (3). فاکتورهای رونویسی کلیدی که به برنامه میوژنی کمک می‌کنند.

یا با آزاسیتیدین تیمار شده بودند هر دو تشکیل میوتیوب را دادند. cDNAی myoD نیز قادر به تبدیل تعدادی از رده‌های سلولی کشت داده شده دیگر به ماهیچه بود. بر اساس این یافته‌ها گفته شد ژن myoD نقش کلیدی را در تکوین ماهیچه بازی می‌کند. یک روش مشابه سه ژن دیگر را شناسایی کرده است، میوژنین، myf5 و mrf4 که در تکوین ماهیچه عمل می‌کنند.

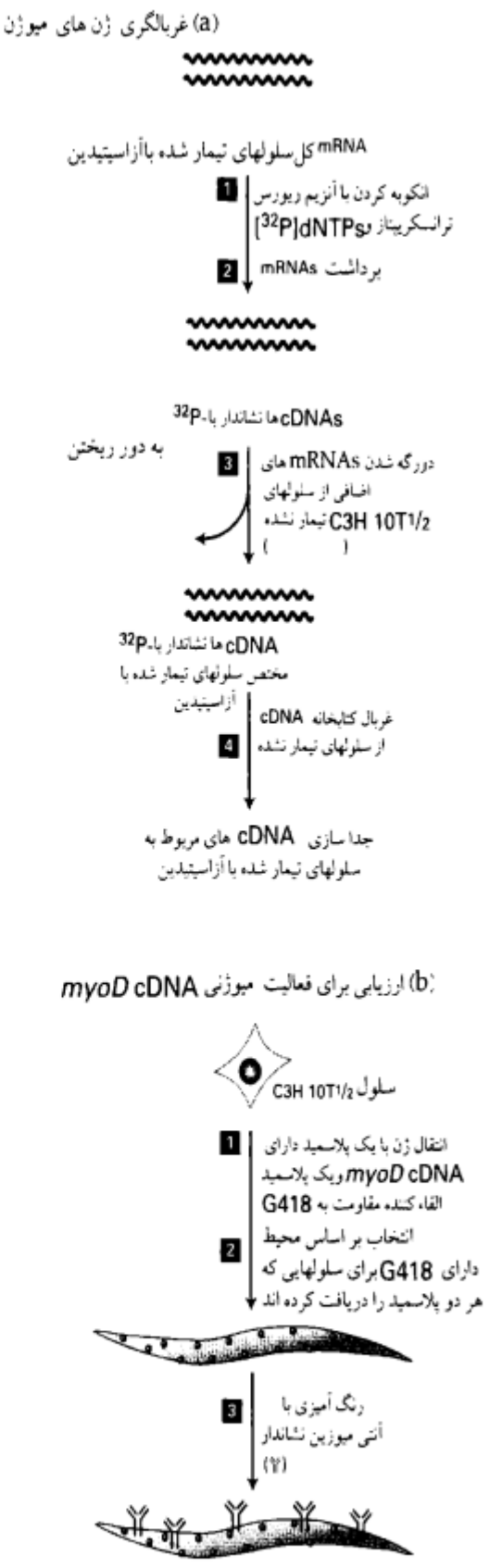
دو دسته از فاکتورهای تنظیمی با هم برای راهنمایی تولید سلول‌های ماهیچه‌ای عمل می‌کنند.

چهار پروتئین میوژنی (MyoD , Myf5، میوژنین و MRF4) از اعضای خانواده مارپیچ - حلقه - مارپیچ بازی (bHLH) از فاکتورهای رونویسی اتصال یابنده به DNA هستند (شکل ۲۶-۷ را ملاحظه کنید). نزدیک به مرکز این پروتئین‌ها یک ناحیه (B) اتصال یابنده به DNA نزدیک به دومین HLH وجود دارد که تشکیل دیمر را واسطه‌گری می‌کند. در اطراف این ناحیه مرکزی دیمری شدن ناحیه اتصالی DNA دو دُمین فعال‌سازی وجود دارد. ما به چهار پروتئین bHLH میوژنی که در مجموع **فاکتورهای تنظیمی ماهیچه**[1] یا MRF ها نامیده می‌شوند، مراجعه می‌کنیم (شکل ۲۲-۲۱).

پروتئین‌های bHIH هومر و هترودیمرهایی را تشکیل می‌دهند که به جایگاه ۶ جفت بازی با توالی مورد توافق CANNTG (N=نوکلئوتید) متصل می‌شوند که به آن جعبه E اطلاق می‌شود. این توالی در بسیاری از محل‌های مختلف در ژنوم وجود دارند (تنها بر اساس تصادف جعبه E هر ۲۵۶ نوکلئوتید یک بار یافت می‌شود)، بنابراین برخی مکانیسم‌ها بایستی این را که MRFها به طور اختصاصی ژن‌های مختص ماهیچه را تنظیم می‌کنند و سایر ژن‌ها در نواحی کنترلی‌شان جعبه E را ندارند، تضمین کند. یک نشانه برای اینکه چگونه این اختصاصیت میوژنی حاصل می‌شود این بود که تمایل اتصال MyoD به DNA وقتی که بصورت هترودیمر با E2A (که یک پروتئین bHLH دیگر است) تشکیل کمپلکس می‌دهد، ده برابر بیشتر از وقتی که آن بصورت یک هومودیمر متصل می‌شود بعلاوه، در سلول‌های C3H10T-½ تیمار شده با آزاسیتیدین، MyoD بصورت یک هترودیمر کمپلکس داده با E2A یافت شده است و هر دو پروتئین برای میوژنز در این سلول‌ها لازم هستند. دُمین‌های اتصال یابنده به DNAی E2A و MyoD توالی‌های اسیدآمینه‌ای مشابه و نه کاملاً یکسان دارند و هر دو پروتئین توالی جعبه E را شناسایی می‌کنند. MRFهای دیگر نیز هترودیمرهایی با E2A را تشکیل می‌دهند که خصوصیات مشابه با کمپلکس‌های MyoD-E2A دارند. این هترودیمری شدن، فعالیت میوژنی فاکتورهای رونویسی را نسبت به ژن‌هایی که حداقل دارای دو جعبه E قرار گرفته نزدیک یکدیگر هستند را محدود می‌کند.

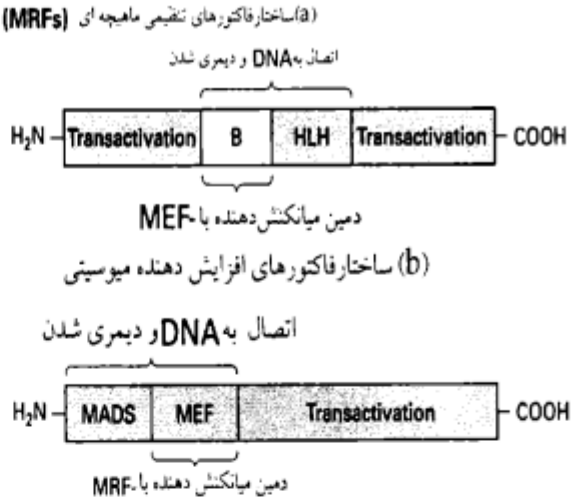
گرچه E2A در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود، ولی وجود E2A برای القای خصوصیت میوژنی کافی نیست. مطالعات بعدی پیشنهاد کرد که اسیدهای‌آمینه اختصاصی در دُمین bHLH همه MRFها خصوصیت میوژنی را توسط اجازه دادن به کمپلکس‌های MRF-E2A برای اتصال اختصاصی به خانواده دیگری از پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA که فاکتورهای‌افزایش‌دهنده میوسیتی یا MEF نامیده می‌شوند، القا می‌کنند. MEFها به دو دلیل نامزدهای بسیار خوبی برای میانکنش با MRFها هستند. اول اینکه بسیاری از ژن‌های مختص ماهیچه‌ای دارای جایگاه‌های

1 - Miscle regulatory factors



◀ شکل تجربی ۲۱-۲۱ (شکل رنگی) ژن‌های میوژن جداشده از سلول‌های تیمارشده با آزاسیتیدین می‌توانند میوژنزرا وقتی که به سایر سلول‌ها منتقل می‌شوند پیش ببرند. (a) وقتی سلول‌های C3H10T1/2 (رده سلولی فیبروبلاست) با آزاسیتیدین تیمار می‌شوند، با فرکانس بالا به میوتیوب تبدیل می‌شوند. به منظور جداسازی ژن‌های مسئول تبدیل سلول‌های تیمارشده با آزاسیتیدین به میوتیوب، همه mRNA های سلول‌های تیمارشده در ابتدا از عصاره‌های سلولی بر روی ستون dT جداسازی شدند. به خاطر دمهای پلی A، mRNAها به طور انتخابی بر روی این ستون می‌مانند. mRNA ها قرمز، از سلول‌های تیمارشده با آزاسیتیدین به دست آمده‌اند. mRNA های صورتی سایر mRNA ها هستند. مراحل ❶ و ❷: mRNA های جداسازی شده به cDNA های نشاندار با رادیواکتیو تبدیل شدند. مرحله ❸: وقتی که cDNA ها با mRNA های به دست آمده از سلول‌های C3H10T1/2 تیمارنشده مخلوط شدند، فقط cDNA های حاصل از mRNA های (قرمز روشن) تولید شده هم توسط سلول‌های تیمارشده با آزاسیتیدین و هم سلول‌های تیمارنشده با هم دورگه شدند. DNA دو رشته‌ای حاصل از cDNA های دورگه نشده (آبی تیره) جداسازی شد که تنها توسط سلول‌های تیماذ نشده توصیه شده بود. مرحله ❹: cDNA ی مختص سلول‌های تیمارشده با آزاسیتیدین بعنوان شناساگرهایی برای غربالگری کتابخانه cDNA ی سلول‌های تیمارشده با آزاستیدین استفاده شد (شکل ۱۶-۵ را ملاحظه کنید). حداقل برخی از کلون‌های شناسایی شده با این شناساگرها مرتبط با ژن‌های مورد نیاز برای میوژنز بودند. (b) هر کدام از کلون‌های cDNA شناسایی شده در قسمت (a) در داخل پلاسمید حامل یک پروموتر قوی قراری گرفتند. مراحل ❶ و ❷: سلول‌های C3H10T1/2 با پلاسمید نوترکیب بعلاوه یک پلاسمید ثانویه حامل ژن القاکننده مقاومت به یک آنتی بیوتیک به نام G418 مورد انتقال ژن قرار گرفتند. فقط سلول‌هایی که پلاسمیدها وارد آنها شده‌اند در محیط دارای G418 رشد خواهند کرد. یکی از کلون‌های انتخاب شده (که با myoD نشان داده شده‌اند) به منظور پیش‌برد تبدیل سلول‌های C3H10T1/2 به سلول‌های ماهیچه‌ای نشان داده شده است که توسط اتصال آنتی بادی‌ها بر علیه میوزین (یک پروتئین مختص ماهیچه) شناخته شدند ❸.

شناسایی برای MEFها و MRFها هستند. دوم اینکه اگر چه MEFها تنها خودشان نمی‌توانند تبدیل میوژنی سلول‌های C3H10T1/2 تیمار شده با آزاسیتیدین را القاء کنند ولی توانایی MRFها را برای این امر افزایش می‌دهند. این افزایش نیاز به میانکنش فیزیکی مابین MEF و هترودیمر MRF-E2A دارد.



▲ **شکل ۲۲-۲۱ ساختارهای عمومی دو دسته از فاکتورهای رونویسی که در میوژنز شرکت می‌کنند.** MRFها (فاکتورهای تنظیمی ماهیچه‌ای) از قبیل میوژنین و myoD پروتئین‌های bHLH هستند که توسط ماهیچه درحال تکوین تولید می‌شوند. MEFها که درچندین بافت علاوه بر ماهیچه در حال تکوین وجود دارند و متعلق به خانواده MADS هستند. فعالیت میوژنی MRFها توسط میانکنش‌شان با MEFها افزایش داده می‌شود. ساختارهای دُمینی پروتئین‌ها نشان داده شده است. شامل دُمین‌های فعال‌کننده همدیگر ، بازی (B)، مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ (HLH) و دُمین‌های MADS و MEF است.

MEFها به خانواده فاکتورهای رونویسی MADS تعلق دارند و دارای یک دُمین MEF نزدیک به دُمین MADS هستند که میانکنش بامیوژنین را واسطه‌گری می‌کند (شکل ۲۲-۲۱) عمل‌گمان می‌شود تقویتی هومودیمر MEF و هترودیمر MRF-E2A بیان با میزان زیاد ژن‌های مختص ماهیچه‌ای را پیش می‌برد. موش‌های دچار تخریب ژنی و جهش‌یافته‌های دروزوفیلا برای بررسی نقش پروتئین‌های MRF و MEF در القای خصوصیت میوژنی در حیوانات سالم و بسط آن به کشت سلولی استفاده شده است. این آزمایشات اهمیت سه پروتئین MRF (myoD، myf5 و میوژنین) و اهمیت پروتئین MEF رابرای مراحل متفاوت در تکوین ماهیچه ثابت کرده است (شکل ۲۰-۲۱ را ملاحظه کنید). عملکرد پروتئین میوژنی چهارم، Mrf4 به طور کامل روشن نشده است.

تمایز میوبلاست‌ها تحت کنترل مثبت و منفی است

تنظیم‌کننده‌های تکوینی قدرتمندی مانند MRFها نمی‌توانند در همه جا عمل کنند. در حقیقت عمل‌های آنها در چندین سطح محدود می‌شود. اول اینکه تولید تنظیم‌کننده‌های ماهیچه‌ای فقط در سلول‌های مزودرم در پاسخ به پیام‌های عمل‌کننده محلی فعال می‌شود، مثلاً هجهوگ، Wnt و BMP که در زمان و مکان صحیح در جنین تولید می‌شوند. پروتئین‌های دیگر مکانیسم‌های بیشتری را برای تضمین کنترل دقیق در میوژنز واسطه‌گری می‌کنند: پروتئین‌های تغییر شکل کروماتینی برای در دسترس قرار دادن ژن‌های هدف به MRFها مورد نیاز هستند. پروتئین‌های مهاری وقتی که MRFها عمل می‌کنند، محدود می‌شوند و روابط آنتاگونیستی بین تنظیم‌گرهای چرخه سلولی و فاکتورهای تمایزی (شبه MRFها) تمایز سلول‌های در حال تمایز را که تقسیم نخواهند شد تضمین خواهند کرد. همه این فاکتورها زمان و مکان تشکیل ماهیچه را کنترل می‌کنند.

فعال‌سازی پروتئین‌های تغییر شکل کروماتینی. پروتئین‌های MRF ژن‌های مختص ماهیچه‌ای را کنترل می‌کنند ولی فقط اگر فاکتورهای اجازه دسترسی را بدهند، این امر انجام می‌گیرد. تغییر شکل کروماتین که معمولاً برای فعال‌سازی ژنی لازم است توسط کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ انجام می‌شود (مانند کمپلکس SWI/SNF) که فعالیت ATPaseی و شاید هلیکازی دارند. این کمپلکس‌ها، هیستون استیلازها را فرا می‌خوانند که کروماتین را به منظور دسترس‌پذیرکردن آن برای فاکتورهای رونویسی تغییر می‌دهند (فصل ۷). این فرضیه که کمپلکس‌های تغییر شکل به فاکتورهای میوژنی کمک می‌کنند با استفاده از گونه‌های غالب منفی از پروتئین‌های ATPase که تشکیل هسته‌های این کمپلکس‌ها را می‌دهند، آزمایش شده است. (از فصل ۵ به خاطر آورید که جهش منفی غالب یک فنوتیپ جهش‌یافته‌ای را وقتی که یک آلل طبیعی از ژن موجود است ایجاد می‌کند). وقتی که ژن‌ها حاصل این جهش‌های غالب منفی به سلول‌های C3H10T1/2 منتقل شدند، ورود ژن‌های میوژنی این سلول‌ها را کمتر به میوتیوب‌های تبدیل می‌کرد. بعلاوه، ژن مختص ماهیچه‌ای که به طور طبیعی فعال شده است الگوی معمول تغییرات کروماتینی را در سلول‌های C3H10T$\frac{1}{2}$ که دو بار مورد انتقال ژن قرار گرفته‌اند، نشان نمی‌دهد. این نتایج حاکی از این امر است که فعال‌سازی رونویسی توسط پروتئین‌های میوژنی بستگی به یک ساختار کروماتینی مناسب در نواحی ژن‌های مختص ماهیچه‌ای دارد. MEF2 هیستون استیلازهایی از قبیل p300/CBP را از طریق یک پروتئین دیگر که به صورت واسطه عمل می‌کند، فرا می‌خواند.

بنابراین رونویسی ژن‌های هدف را فعال می‌کند. آزمایشات رسوب ایمنی کروماتین با آنتی‌بادی‌هایی بر علیه هیستون استیله شده H4 نشان داده است میزان هیستون استیله شده با ژن‌های تنظیم شده با MEF2 مرتبط است که در میوتیوب‌های تمایز یافته بیشتر از میوبلاست‌ها است (شکل ۳۷-۷ را ملاحظه کنید).

پروتئین‌های مهاری: غربالگری برای ژن‌های مرتبط با myoD منجر به شناسایی یک پروتئین مرتبط شد که دارای ناحیهٔ دیمری شدن HLH بود ولی فاقد ناحیه بازی اتصال‌یابنده به DNA بود و از اینجهت قادر به اتصال به توالی جعبه E در DNA نبود. این پروتئین با اتصال به myoD یا E2A، تشکیل هترودایمرهای myoD-E2A را مهار می‌کند و از این رو تمایل بالای اتصال آنها را به DNA مهار می‌کند. این پروتئین به خاطر مهار اتصال به DNA، Id نامیده می‌شود. Id مانع می‌شود سلول‌ها myoD و E2A را از طریق فعال‌سازی ژن مختص ماهیچه‌ای رمزکننده کرآتین کیناز تولیدکنند. در نتیجه، سلول‌های در حالت رشد تکثیری باقی می‌مانند. وقتی که این سلول‌ها برای تمایز به ماهیچه القا می‌شوند (برای مثال با برداشت سرم که دارای فاکتورهای رشدلازم برای رشد تکثیری است) غلظت Id کاهش می‌یابد. دیمرهای myoD-E2A اکنون می‌توانند تشکیل شوند و به نواحی تنظیمی ژن‌های هدف متصل شوند که تمایز سلول‌های C3H10T1/2 را به سلول‌های شبه میوبلاست پیش می‌برند.

نقش هیستون داستیلازها (که رونویسی را مهار می‌کنند) در تکوین ماهیچه در آزمایشاتی که در آن دانشمندان ابتدا ژن‌های myoD را به سلول‌های C3H10T1/2 به منظور افزایش میزان myoD وارد کردند، آشکار شد. به هر حال، وقتی که ژن‌های رمزدارکننده هیستون داستیلازها نیز به داخل سلول‌های C3H101/2 وارد شده‌اند اثر القاکنندگی ماهیچه‌ای myoD بلوکه شد و سلول‌ها به میوتیوب‌ها تمایز نیافتند. توضیح اینکه چگونه هیستون داستیلازها تمایز ماهیچه‌ای القاشده توسط myoD را مهار می‌کنند از این یافته جالب حاصل می‌شود که در آن فعال سازی ژن ماهیچه‌ای MEF2 می‌تواند از طریق دُمین MADS به یک هیستون داستیلاز متصل شود. این میانکنش که می‌تواند مانع عملکرد MEF2 و تمایز ماهیچه‌ای شود بطور نرمال در طی تمایز بلوکه می‌شود، زیرا هیستون داستیلاز توسط پروتئین کیناز وابسته به کالمودولین / Ca^{+2} فسفریله می‌شود. داستیلازهای فسفریله شده پس از هسته به سیتوپلاسم حرکت می‌کنند. در مجموع، این نتایج حاکی از آن است که فعال‌سازی ژن‌های ماهیچه‌ای توسط MEF1,myoD در رقابت با غیرفعال‌سازی ژن‌های ماهیچه‌ای توسط ساختارهای کروماتینی مهارکننده است.

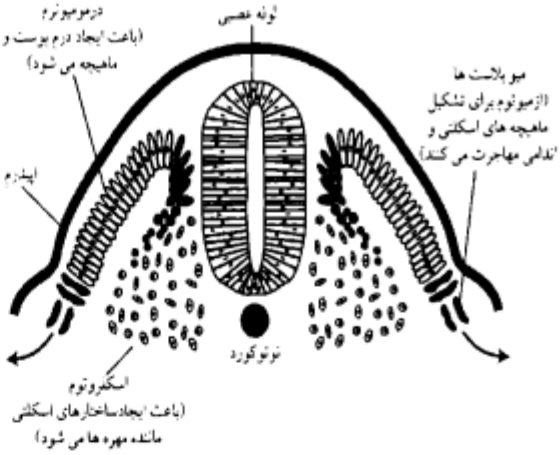
پروتئین‌های چرخه سلولی. شروع تمایز نهایی در بسیاری از گونه‌های سلولی مرتبط با ایست چرخه سلولی معمولاً در G_1 است و این را می‌سازند که گذر از حالت تعمد به حالت تمایزیافته ممکن است توسط پروتئین‌های چرخه سلولی شامل سیکلین‌ها[1] و کینازهای وابسته به سیکلین[2] تحت تأثیر قرار گیرد (فصل ۲۰) برای مثال مهارگرهای کینازهای وابسته به سیکلین می‌توانند تمایز ماهیچه‌ای را در کشت سلولی القا می‌کنند و مقادیر این مهارگرها بطور بارزی در سلول‌های ماهیچه‌ای در حال تمایز بیشتر از سلول‌های تمایزنیافته در محیط *In Vivo* است. برخلاف آن تمایز میوبلاست‌های کشت‌داده شده می‌تواند توسط انتقال DNAی رمزدار کننده سیکلین D1 تحت کنترل پروموتر فعال مهار شود. بیان سیکلین D1 که به طور طبیعی فقط در طی G1 اتفاق می‌افتد توسط فاکتورهای میتوژنی در بسیاری از گونه‌های سلولی القا می‌شود (شکل ۳۲-۳۰ را ملاحظه کنید). توانایی سیکلین D1 برای جلوگیری از تمایز میوبلاستی در *In Vitro* ممکن است از خصوصیات پیام‌های *In Vivo* تقلید کند که مسیر تمایز را مانع می‌شوند. به نظر می‌رسد آنتاگونیسم بین تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی در پیشرفت G_1 نقش مهمی را در کنترل میوژنز در *In Vivo* بازی می‌کند.

پیام‌های سلول به سلول برای تمایز و مهاجرت میوبلاست‌ها اساسی است

همچنانکه قبلاً مورد توجه واقع شده است بعد از اینکه میوبلاست‌ها از سومیت‌ها حاصل شدند، آنها بایستی به مکانهای مورد نظرشان حرکت کنند و تشکیل اتصالات صحیح را همچنانکه به سلول‌های ماهیچه‌ای تمایز می‌یابند، بدهند (شکل ۲۳-۲۱). بیان ژن‌های میوژنی اغلب بعد از رویدادهای پیچیده‌ای اتفاق می‌افتد که سلول‌های سومیتی مشخص از اپی‌تلیوم سومیتی به صورت ورقه درمی آیند و حرکات بعدی خودشان را به جایگاههای تجمع ماهیچه‌ای راهنمایی می‌کنند.

یک فاکتور رونویسی، (Pax3) در یک عده از سلول‌های سومیتی تشکیل خواهد شد که تشکیل ماهیچه را می‌دهند. به نظر می‌رسد Pax3 در رأس رویدادهای تنظیمی کنترل کننده تشکیل ماهیچه در تنه و اندام‌ها است. میوبلاست‌هایی که مهاجرت می‌کنند تولید فاکتور

1- Cyclins 2- Cyclins



▲ **شکل ۲۳-۲۱ تعهد جنینی و مهاجرت میوبلاست‌ها در پستانداران.** بعد از تشکیل لوله عصبی هر سومیت اسکروتوم را تشکیل می‌دهد که به ساختارهای اسکلتی تبدیل می‌شود، درمومیوتوم که باعث ایجاد درم پوست و ماهیچه‌ها می‌شود. میوبلاست‌های جانبی از درمومیوتوم به جوانه اندامی مهاجرت می‌کنند. میوبلاست‌های میانی به ماهیچه‌های تنه تبدیل می‌شوند. بقیه درمومیوتوم‌ها باعث ایجاد بافت پیوندی پوست می‌شوند.

رونویسی را می‌کنند که Lbx1 نامیده می‌شود. اگر Pax3 عملکردی نباشد. رونوشت‌های Lbx1 تولید نمی‌شوند و میوبلاست‌ها مهاجرت نمی‌کنند. هر دو فاکتور Pax3 و Lbx1 می‌توانند بیان myoD را تحت تأثیر قرار دهند. جدا شدن میوبلاست‌ها از سومیت‌ها بستگی به دریافت یک پیام پروتئینی ترشح شده، دارد که فاکتور توزیع[1] یا فاکتور رشد هپاتوسیتی[2] (SF/HGF) نامیده می‌شود. این پیام که توسط سلول‌های بافت پیوندی جنینی، تولید می‌شود (مزانشیم) در جوانه‌های اندامی، میوبلاست‌های مهاجرت کننده را جذب می‌کند، بنابراین آنها را به سرنوشت صحیح‌شان هدایت می‌کند.

تولید SF/HGF قبلاً توسط سایر پیام‌های ترشح شده القا شده است. اگر پیام SF/HGF یا گیرنده‌اش بر روی میوبلاست‌ها عملکردی نباشد، سلول‌های میوسیتی Lbx1 را تولید خواهند کرد ولی مهاجرت نخواهند کرد، بنابراین ماهیچه‌ای در اندامها تشکیل نخواهد شد. بیان ژن‌های میوژنین و mrf4 شروع نمی‌شود تا میوبلاست‌های مهاجرت کننده به جوانه‌های اندامی بروند (شکل ۲۰-۲۱ را ملاحظه کنید).

ما با تعدادی از پیامهای خارجی و فاکتورهای رونویسی که در تکوین صحیح ماهیچه نقش دارند برخورد کرده‌ایم. عملکرد همه این ملکولهای تنظیمی بایستی هم در فضا و هم در زمان در طی میوژنز هماهنگ شود.

پروتئین‌های تنظیمی bHLH در ایجاد سایر بافت‌ها نیز عمل می‌کنند.

چهار فاکتور رونویسی bHLH که به طور بارزی مشابه پروتئین‌های bHlH میوژنی هستند نوروژنز را در دروزوفیلا کنترل می‌کنند. پروتئین‌های مشابه با این پروتئین‌ها در نوروژنز در مهره‌داران و شاید در تعمد و تمایز سلول‌های خون‌ساز عمل می‌کنند.

پروتئین‌های bHLH دروزوفیلای عصب‌زا توسط یک توالی حدود ۱۰۰ کیلو بازی از DNA ژنومی که کمپلکس آکاته[3] - اسکوته[4] (AS-C) به آنها اطلاق می‌شود و حاوی چهارژن آکاته (ac)، اسکوته (sc)، (L'sc)[5] و آسنز[6] (a) است. تجزیه تحلیل اثرات جهش‌های فقدان عملکردی حاکی از این امر است که پروتئین‌های آکاته (AC) و اسکوته (Sc) در تعهد سلول‌های بنیادی عصبی شرکت می‌کنند که در مگس سرکه نوروبلاست نامیده می‌شوند، در حالی که پروتئین آسنز (AS) برای تمایز سلول حاصل از این سلول‌ها به نورون‌ها لازم است (توجه کنید که واژه نوروبلاست‌ها به سلول‌های بنیادی در مگس‌های سرکه اطلاق می‌شود ولی به سلول‌های پیش‌ساز در پستانداران اطلاق می‌شود). این عملکردها مشابه نقش‌های myoD و myf5 در تعهد ماهیچه‌ای و میوژنین در تمایز هستند. دو پروتئین دروزوفیلایی دیگر که با Da و Emc نشان داده می‌شوند از لحاظ ساختار و عملکرد شبیه به E2A و Id هستند. برای مثال کمپلکس‌های هترودیمری Da با Ac یا Sc به DNA بهتر از اشکال هومودیمری Ac یا Sc متصل می‌شوند. Emc مانند Id فاقد دُمین اتصال به DNA بوده و به پروتئین‌های Ac و Sc متصل می‌شود و بنابراین ارتباط آنها با Da و اتصال آنها را به DNA را مهار می‌کنند. عملکردهای این پروتئین‌ها مشابه با پروتئین‌های میوژن و نوروژن است که در شکل ۲۴-۲۱ ترسیم شده است.

یک خانواده از پروتئین‌های bHLH مرتبط با پروتئین‌های آکاته و اسکوته دروزوفیلا در مهره‌داران شناخته شده است. یکی از این پروتئین‌ها که نوروژنین نامیده می‌شود تشکیل نوروبلاست‌ها را کنترل می‌کند. آزمایشات دورگه سازی در جا، نشان داده است که نوروژنین در مرحله اولیه تکوین سیستم عصبی تولید می‌شود.

1- Scatter factor

2 - Scatter factor / hepatocyte growth factoe

3 - Achaete 4 - Scute

5 - Lethal of scute 6 - Asense

نوروژنین تولید نورو D را که یک پروتئین bHLH دیگر بوده و بعداً عمل می‌کند را القا می‌کند (شکل ۲۵-۲۱). تزریق مقادیر زیاد mRNA ی نوروژنین به جنین‌های گزنوپوس توانایی نوروژنین را برای القا عصب‌زایی بیشتر ثابت می‌نماید (شکل ۲۵-۲۱). این عملکرد نوروژنین مشابه آکاته و اسکوته در دروزوفیلا است. همچنین نورو D و آسنز ممکن است عملکردهای مشابهی در مهره‌داران و دروزوفیلا داشته باشند.

نکات کلیدی بخش ۳-۲۱

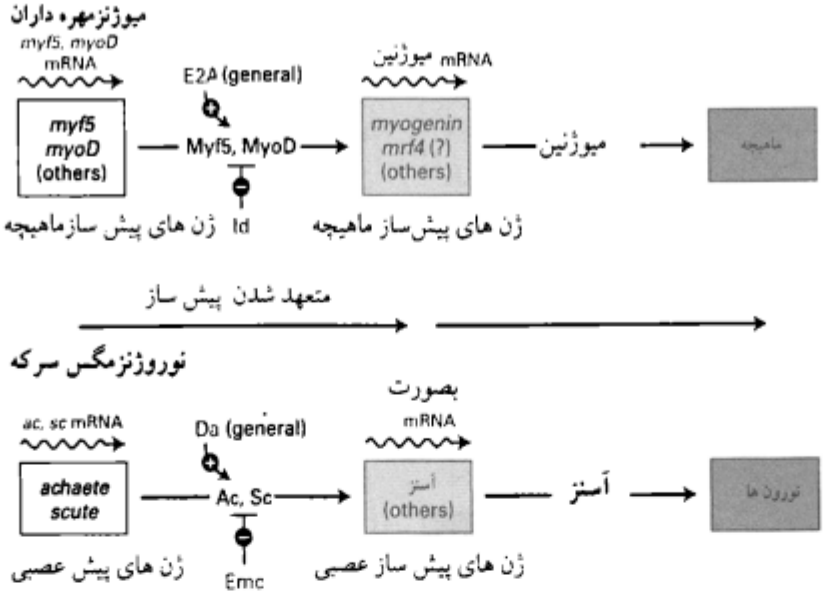
تخصصی شدن و تمایز ماهیچه

- تکوین ماهیچه اسکلتی باتعهد القاء شده توسط پیام سلول‌های مزودرمی معین در سومیت‌ها که میوبلاست‌ها هستند، شروع می‌شود. به دنبال تکثیر و مهاجرت میوبلاست‌ها ایست تقسیم در آنها ایجاد می‌شود و میوبلاست‌ها به سلول‌های ماهیچه‌ای چندهسته‌ای (میوتیوب‌ها) که پروتئین‌های مختص ماهیچه‌ای را بیان می‌کنند، تمایز می‌یابند (شکل ۲۰-۲۱ را ملاحظه کنید)
- چهار فاکتور رونویسی bHlH میوژنی (MyoD، میوژنین، Myf5 و MRF4) که مجموعاً فاکتورهای تنظیمی ماهیچه‌ای (MRFها) نامیده می‌شوند با E2A و MEFها به منظور تشکیل کمپلکس‌های رونویسی بزرگ که میوژنز و بیان ژن‌های مختص ماهیچه‌ای را پیش می‌برند متصل می‌شوند.
- دیمرشدن فاکتورهای رونویسی bHLH با شریک‌های متفاوت، ویژگی یا تمایل اتصالی آنها را به جایگاه‌های تنظیمی DNA تنظیم می‌کند و همچنین ممکن است مانع اتصال کامل آنها شود.
- برنامه میوژنی پیش برده شده توسط MRFها به کمپلکس تغییر شکل کروماتینی SWI/SNF بستگی دارد که ژن‌های هدف را دسترس‌پذیر می‌کند.
- برنامه میوژنی توسط اتصال پروتئین Id به MyoD که اتصال MyoD به DNA را بلوکه می‌کند و توسط هیستون داستیلازها که فعال‌سازی ژن‌های هدف توسط MRFها را سرکوب می‌کنند، مهار می‌شود.
- مهاجرت میوبلاست‌ها به جوانه‌های عضوی توسط فاکتور توزیع / فاکتور رشد هپاتوسیت (SF/HGF) (یک پیام ترشح شده از سلول‌های مزانشیمی) القاء می‌شود (شکل ۲۳-۲۱ را ملاحظه کنید) میوبلاست‌ها بایستی برای مهاجرت هر دو فاکتور رونویسی Pax3 و Lbx1 را بیان کنند.
- تمایز نهایی میوبلاست‌ها و القاء پروتئین‌های مختص ماهیچه تا زمانیکه میوبلاست‌ها ایست تقسیم و مهاجرت نیافته‌اند، اتفاق نمی‌افتد.
- نوروژنز در مگس سرکه به یک عده از چهار پروتئین bHLH نوروژنی بستگی دارد که از لحاظ ساختاری مشابه با پروتئین‌های میوژنی مهره‌داران هستند (شکل ۲۴-۲۱ را ملاحظه کنید).
- یک پروتئین مهره‌داری مرتبط (نوروژنین) برای تشکیل پیش‌سازهای عصبی لازم است و همچنین سرنوشت آنها را به صورت سلول‌های گلیال یا عصبی تعیین می‌کند.

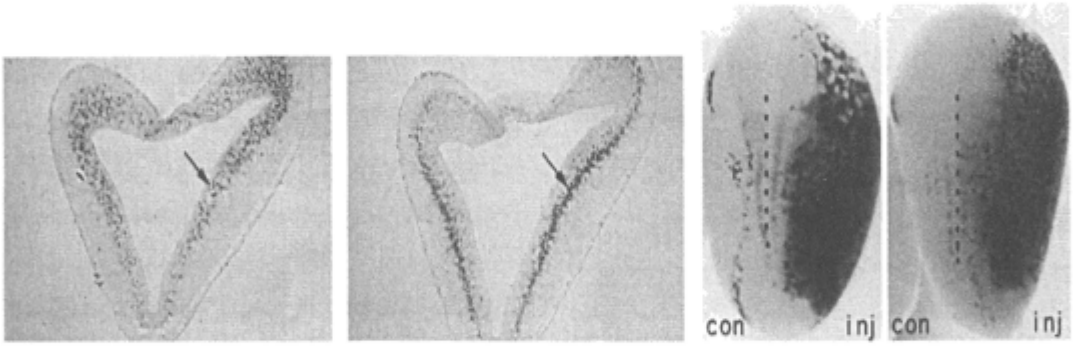
۴-۲۱ تنظیم تقسیم‌سلولی نامتقارن

در طی جنین‌زایی (اولین مرحله در تکوین جانور)، تقسیم سلولی نامتقارن اغلب تنوع اولیه‌ای را ایجاد می‌کند که سرانجام منجر به تشکیل انواع سلولی تمایزیافته می‌شود. هم سلول‌های بنیادی و هم سلول‌های پیش‌ساز می‌توانند به طور نامتقارن با مکانیسم‌های مشابه اگر چه جزئیات آن‌ها در بافت فرق می‌کند، تقسیم شوند. حتی در باکتری‌ها تقسیم سلولی ممکن است سلول‌های دختری نامتقارن را ایجاد کند، برای مثال باکتری که متصل به یک پایه باقی می‌ماند و باکتری که تاژک مورد استفاده برای شنا را ایجاد می‌کند.

اساس تقسیم سلولی نامتقارن، قطبی شدن سلول والدی و سپس تقسیم متفاوت قسمت‌های سلول والدی به دو سلول دختری است (شکل ۲۶-۲۱). یک عده از مکانیسم‌های مولکولی برای ایجاد و ازدیاد نامتقارنی اولیه که سلول والدی را قطبی می‌کنند، به کار می‌روند. علاوه بر متقارن شدن، سلول‌های دختری بایستی اغلب در یک جهت اختصاصی با توجه به ساختارهای اطراف جاگذاری شوند. وقتی که سلول‌های بنیادی به طور نامتقارن تقسیم می‌شوند سلولی که در ارتباط با پیام‌های آشیانه‌ای می‌ماند بصورت یک سلول بنیادی خواهد ماند. بنابراین دوک‌های میتوزی و قطبیت سلول بایستی با کل بافت هماهنگ شوند، همچنانکه سلول‌های در حال تمایز به طرف صحیح حرکت می‌کند و حداقل یک سلول دختری در یک آشیانه سلول بنیادی به منظور تداوم جمعیت سلول بنیادی باقی بماند. این پدیده به صورت مثال در تقسیم سلول‌های بنیادی عصبی در طی تکوین جنینی آورده شده است (شکل ۱۲-۲۱ را ملاحظه کنید). ما با یک مثال خوب درک شده از تقسیم سلولی نامتقارن (جوانه‌زنی سلول‌های مخمری) و از کمپلکس‌های پروتئین‌های که اخیراً کشف شده‌اند و برای تقسیمات سلولی نامتقارن در موجودات زنده پرسلولی



▲ **شکل تجربی ۲۴-۲۱ مقایسه ژن‌هایی که میوژنز مهره‌داران و نوروژنز مگس سرکه را تنظیم می‌کنند.** فاکتورهای رونویسی bHLH، عملکردهای مشابهی در تعهد سلول‌های پیش ساز عصبی و ماهیچه‌ای و تمایز آن‌ها به سلول‌های ماهیچه‌ای و عصبی بالغ دارند. در هر دو حالت، پروتئین‌های رمزدار شده توسط ژن‌های عمل کننده اولیه (چپ) تحت کنترل مثبت و منفی توسط پروتئین‌های مرتبط دیگر (نوع آبی) هستند.



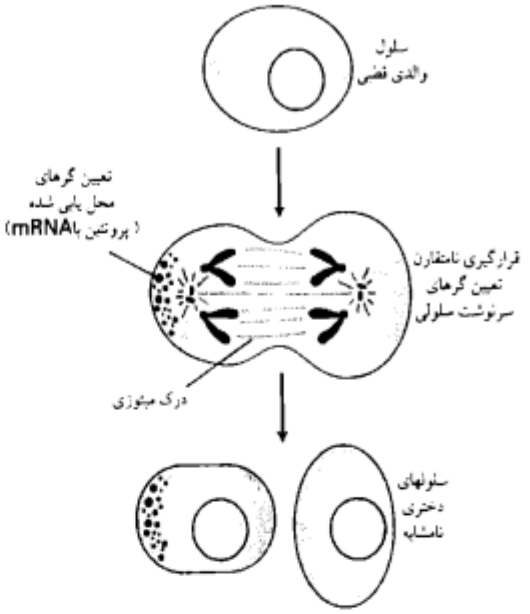
mRNA نوروژنین — mRNA نورو D — β-mRNA توبولین — mRNA نوروژنین

▲ **شکل تجربی ۲۵-۲۱ آزمایش‌های دورگه‌سازی در جا و تزریقی ثابت می‌کند که نوروژین قبل از نورو D در عصب‌زایی مهره‌داران عمل می‌کنند.** (a) قسمت‌هایی از لوله عصبی تیمارشده با یک شناساگر خاص برای mRNA ی نوروژنین (سمت چپ) یا mRNA نورو D (سمت راست). فضای باز در مرکز بطن است و سلول‌های قرار گرفته در این حفره لایه ساب ونتریکولار را ایجاد می‌کنند، همه سلول‌های عصبی درلایه ساب ونتریکولار به وجود آمده و به بیرون مهاجرت می‌کنند (شکل ۱۲-۲۱ را ملاحظه کنید). همچنانکه در این عکس‌ها نشان داده شده است، mRNA ی نوروژنین در نوروبلاست‌های در حال تکثیر در لایه ساب ونتریکولار دیده می‌شوند در صورتی که mRNAی نورو D در نوروبلاست‌های مهاجرت‌کننده‌ای که ناحیه بطن را ترک کرده‌اند وجود دارد. (b) یکی از دو سلول در جنین‌های اولیه گزنوپوس که به آنها mRNA ی نوروژنین تزریق شده است (inj) با یک شناساگر خاص mRNA های مختص نورون رمزدارکننده b – توبولین (سمت چپ) یا نورو D (سمت راست) رنگ‌آمیزی شد. ناحیه‌ای از جنین که از سلول‌های تزریق نشده حاصل شده است بعنوان کنترل عمل می‌کند (con). mRNA ی نوروژنین افزایش زیادی را در تعداد نوروبلاست‌های بیان‌کننده mRNAی نورو D و نورون‌های بیان‌کننده b– توبولین در ناحیه لوله عصبی حاصل از سلول تزریق شده را القا کرد.

مهم هستند، شروع می‌کنیم. در مخمر یک سیستم دقیقی که تقسیم نامتقارن را به فرآیندهای کنترل‌کننده گونه سلولی مرتبط می‌کند را ملاحظه می‌کنیم.

تبدیل به‌گونه آمیزشی مخمری به تقسیم نامتقارن بستگی دارد

سلول‌های ساکارومایسس سرویزیه مکانیسم قابل‌ملاحظه‌ای برای کنترل تمایز سلولی همچنانکه رده‌بندی سلولی پیشرفت



▲ **شکل ۲۶-۲۱ خصوصیات عمومی تقسیم سلولی نامتقارن.** چندین مکانیسم می‌تواند منجر به توزیع نامتقارن ترکیبات سیتوپلاسمی مانند پروتئین‌های خاص یا mRNAها شود، بدانجهت تشکیل سلول والدی قطبی شده را می‌کنند. تقسیم سلول قطبی‌شده، اگر دوک میتوتیک در جهتی باشد که ترکیبات سیتوپلاسمی به طور نامساوی به دو سلول دختری توزیع شود، نامتقارن خواهد بود که در اینجا نشان داده شده است. به هر حال اگر دوک به طور متفاوت نسبت به ترکیبات سیتوپلاسمی قرار گیرد تقسیم سلول قطبی شده ممکن است سلول‌های دختری مشابه ایجاد کند.

می‌کند، استفاده می‌کنند. اینکه آیا یک سلول مخمری هاپلوئیدی نوع آمیزشی α یا a باشد توسط این ژن‌ها تعیین می‌شود که در جایگاه MAT موجود هستند (شکل ۱۷-۲۱ را ملاحظه کنید). همچنانکه در فصل ۷ شرح داده شده است در اطراف جایگاه MAT در ژنوم ساکارومایسس سرویزیه دو جایگاه غیرفعال از لحاظ رونویسی (خاموش) دارای توالی‌های متوالی a و α قرار گرفته است (شکل ۲۳-۷ را ملاحظه کنید). یک بازآرایی DNA یی ویژه این ژن‌ها را که فاکتورهای رونویسی مختص a یا مختص α رمزدار می‌کنند را از این جایگاههای خاموش به جایگاه MAT که آنها در آنجا می‌توانند رونویسی شوند، می‌آورد.

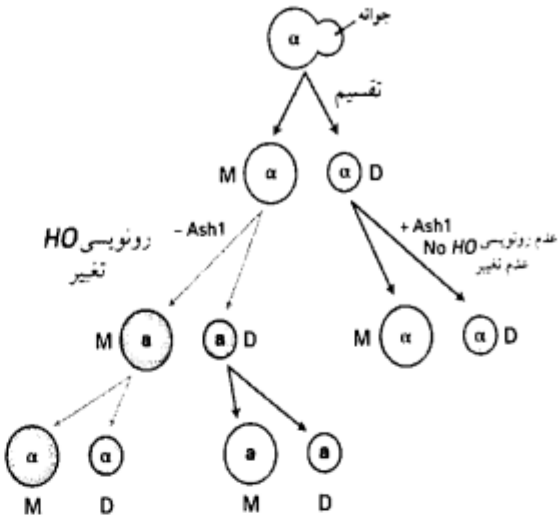
به طور جالبی برخی از سلول‌های مخمری هاپلوئید می‌توانند مکرراً بین گونه‌های α و a تغییر حالت دهند. تغییر گونه آمیزشی وقتی اتفاق می‌افتد که آلل α اشغال‌کننده جایگاه MAT با آلل a جایگزین شود. اولین مرحله این فرآیند توسط آندونوکلئاز HO که در سلول‌های مادری بیان می‌شود ولی در سلول‌های دختری بیان نمی‌شود، کاتالیز می‌شود بنابراین تغییرگونه آمیزشی فقط در سلول‌های مادری اتفاق می‌افتد (شکل ۲۷-۲۱). رونویسی ژن HO وابسته به کمپلکس تغییر شکل کروماتین است (شکل ۴۳-۷ را ملاحظه کنید)، همان کمپلکسی که ما قبلاً در بحث‌مان در میوژنز با آن برخورد کردیم. سلول‌های مخمر دختری با جوانه‌زنی از سلول‌های مادری دارای پروتئینی که Ash1p نامیده می‌شود (برای سنتز نامتقارن HO) و جلوی فراخوانی کمپلکس SwI/SNF را می‌گیرد، حاصل می‌شوند. بدانجهت مانع از رونویسی‌اش می‌شود. غیاب Ash1 در سلول‌های مادری اجازه رونویسی ژن HO را به آنها می‌دهد.

آزمایشات اخیر آشکار کرده است که چگونگی نامتقارنی در توزیع Ash1 بین سلول‌های دختری و مادری تأیید نشده است. mRNAی ASH1 در جوانهٔ در حال رشد تجمع می‌یابد که تشکیل یک سلول دختری را همگام باعمل پروتئین حرکتی میوزین خواهد داد. (فصل ۱۷). این پروتئین موتوری که MYo4p نامیده می‌شود mRNAی ASH1 را بصورت کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین در طول فیلامانهای اکتین فقط در یک جهت به طرف جوانه حرکت می‌دهد (شکل ۲۸-۲۱). دو پروتئین رابط به نامهای she2p و she3p (بیان HO وابسته به SWI5p) mRNAی ASH1 را به پروتئین حرکتی MYo4P متصل می‌کنند. با گذشت زمان جوانه از سلول مادری جدا می‌شود، سلول مادری عاری از mRNAی ASH1 می‌شود و بنابراین می‌تواند گونه آمیزشی را به دنبال G1 قبل از اینکه mRNAی اضافی تولید می‌شود و قبل از همانندسازی DNA در فاز S، تغییر دهد.

مخمرهای در حال جوانه‌زنی یک مکانیسم نسبتاً ساده‌ای را به منظور ایجاد اختلافات مولکولی بین دو سلول تشکیل شده توسط تقسیم استفاده می‌کنند. در موجودات زنده عالی‌تر، مانند مخمر، دوک میتوزی بایستی در جهتی باشد که هر سلول دختری ترکیبات سیتوپلاسمی مختص خودش را دریافت کند. مطالعات ژنتیکی در کرم الگانس و دروزوفیلا عوامل کلیدی را آشکار کرده است اولین مرحله درک سطوح مولکولی این است که چگونه تقسیم سلولی نامتقارن در موجودات پرسلولی تنظیم می‌شود. به منظور توضیح این موارد پیچیده، ما بر روی تقسیم نامتقارن نوروبلاست‌ها در دروزوفیلا تمرکز می‌کنیم.

پروتئین‌هایی که نامتقارنی را تنظیم می‌کنند در انتهاهای مخالف نوروبلاست‌های در حال تقسیم در دروزوفیلا قرار گرفته‌اند.

نوروبلاست‌های مگس سرکه که سلول‌های بنیادی هستند از



▲ **شکل ۲۷-۲۱ تغییر گونه جفت‌گیرنده در سلول‌های مخمری هاپلوئید.** تقسیم توسط جوانه‌زنی، یک سلول مادری بزرگتر (HO) و سلول دختری کوچکتر (D) را تشکیل می‌دهد. هر دو آنها همان گونه جفت‌گیرنده را بصورت سلول اصلی (α در این مثال) دارند. سلول مادری می‌تواند در طی C1 از چرخه سلولی دیگر به گونه جفت‌گیرنده تغییر یابد و دوباره تقسیم شود و تولید دو سلول از گونه متفاوت a را بکند. این تغییر به رونویسی ژن HO بستگی دارد که تنها در غیاب پروتئین Ash1 اتفاق می‌افتد سلول‌های دختری کوچکتر که پروتئین Ash1 را تولید می‌کند نمی‌تواند به گونه دیگر تغییر یابد. این سلول‌ها بعد از رشد در اندازه در طی اینترفاز این سلول‌ها به منظور تشکیل یک سلول مادری و سلول دختری تقسیم شوند. پیکانها نشان‌دهنده رویدادهای تغییر هستند.

ورقه‌ای از سلول‌های اکتودرمی حاصل می‌شوند که ضخامت آن به اندازه یک سلول است. همانند مهره‌داران، اکتودرم دروزوفیلا هم اپیدرم و هم سیستم عصبی را تشکیل می‌دهد و بسیاری از سلول‌های اکتودرمی توانایی تبدیل به عصب و اپیدرم را دارند. برخی از سلول‌ها تحت کنترل برخی ژن‌ها که فقط در سلول‌های خاص فعال می‌شوند، افزایش می‌یابد و شروع به جداشدن از لایه اکتودرمی می‌کنند. در این نقطه در حال ورقه‌شدن، از مسیر پیام رسانی دلتا / نوتچ به منظور واسطه‌گری **مهار جانبی** سلول‌های همسایه‌شان استفاده می‌کنند و باعث می‌شوند که آنها سرنوشت اپیدرمی حاصل کنند (اشکال ۳۶-۱۶ و ۴۲-۲۲ را ملاحظه کنید). سلول‌های در حال ورقه‌شدن به درون حرکت می‌کنند و نوروبلاست‌های کره‌ای شکل را ایجاد می‌کنند، در حالی که سلول‌های اپیدرمی باقی می‌مانند و تشکیل یک ورقه محکم را می‌دهند. این فرآیند ۶۰ نوروبلاست را در هر قطعه‌بدنی تولید می‌کند که باعث ایجاد حدود ۷۰۰ نورون در هر قطعه می‌شود.

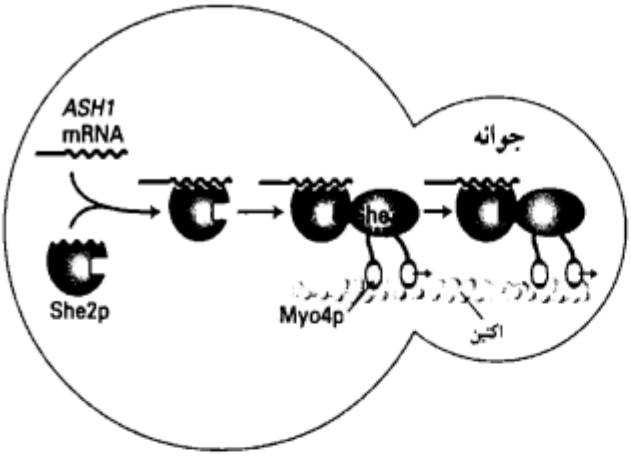
وقتی که نوروبلاست‌ها تشکیل شدند متحمل تقسیمات نامتقارن می‌شوند و در هر تقسیم این سلول‌ها هم خودشان را تجدید می‌کنند و هم تولید سلول مادری گانگلیون (GMC) در روی طرف پایه نوروبلاست را می‌کنند (شکل ۲۹-۲۱). یک سلول نوروبلاست تولید چندین GMC را خواهد کرد، در عوض هر GMC دوسلول نورون را تشکیل می‌دهند. بسته به اینکه در کجای جنین آنها تشکیل می‌شوند و چه رویدادهای تنظیمی دارند، نوروبلاست‌ها ممکن است تشکیل GMCهای بیشتر یا کمتر را بدهند. نوروبلاست‌ها و GMCها در محل‌های متفاوت، الگوهای متفاوتی از بیان ژن را نشان می‌دهند که نشان‌دهنده سرنوشت‌شان است. تجزیه و تحلیل جهش‌یافته‌های مگس سرکه منجر به کشف پروتئین‌های کلیدی شد که (۱) قطبیت قاعده‌ای رأسی در نوروبلاست‌ها را تعیین می‌کند (۲) دوک میتوزی نوروبلاست‌های در حال تقسیم با قطبیت‌شان را هماهنگ می‌کنند و (۳) تشکیل مستقیم سلول‌های دختری که سرنوشت و اندازه آنها از نوروبلاست‌ها متفاوت است. مطالعات ژنتیکی تقسیمات سلولی نامتقارن در جنین کرم الگانس به طور جداگانه منجر به کشف پروتئین‌های مهم تقسیم نامتقارن سلولی شد. سیستم کنترل‌کننده تقسیم سلولی نامتقارن به طور زیادی حفظ شده است و به راحتی از کرم‌ها به طرف حشرات و پستانداران شناخته می‌شود و حاکی از حفظ عملکردهای پروتئینی برای بیش از نیم میلیون سال است.

کمپلکس‌های پروتئینی رأسی و قاعده‌ای در طی تقسیم هر نوروبلاست تجمع حاصل کرده و توزیع می‌شوند و سپس دوباره در دور بعدی تقسیم، درجای خود قرار می‌گیرند. چهار کمپلکس پروتئینی که ما آنها را MPSB، BPP، DSL و IPLG می‌شناسیم کل فرآیندها را رهبری می‌کنند (شکل ۳۰-۲۱):

BPP: یک کمپلکس رأسی است که بصورت کمپلکس PAR نیز شناخته می‌شود، مسئول تعیین هدف سلول است که یک نوروبلاست خواهد ماند. این کمپلکس پروتئینی دارای **Bazooka** و **Par6** (هر کدام شامل دُمین‌های PDZ است) و یک PKC (یک ایزوفرم معمول از پروتئین کیناز C) است.

IPLG: دُمین کمپلکس رأسی متشکل از اینسکوتی‌بل[1] (Insc) و شریک اینسکوتی‌بل (Pins) است. پروتئین نقص حرکتی (Loco) و G_i (یک G پروتئین هترودیمری (فصل ۱۵)

1 - Inscuteable Insc



◀ **شکل ۲۸-۲۱ مدلی برای محدودیت تبدیل گونه آمیزشی به سلول‌های مادری ساکارومایسس سرویزیه.** پروتئین Ash1 مانع از این می‌شود که سلولی که از ژن HO نسخه‌برداری می‌کند که پروتئین رمزدار شده آن نوآرایی DNAیی را که نتیجه‌اش تغییر گونه آمیزشی از a به α یا از α به a است را شروع کند. تغییر فقط در سلول مادری (بعد از اینکه آن از سلول دختری تازه جوانه زده جدا می‌شود) به دلیل وجود پروتئین Ash1 فقط در سلول دختری اتفاق می‌افتد. اساس مولکولی برای این جایگیری متفاوت Ash1 انتقال یک جهتی mRNAی Ash1 به طرف جوانه است. یک پروتئین رابط (She2p) به توالی‌های ترجمه نشده $3'$ خاص در mRNAی Ash1 متصل می‌شود و همچنین به پروتئین She3p متصل می‌شود. این پروتئین به یک موتور میوزینی (Myo4P) متصل می‌شود که در طول رشته‌های اکتینی در داخل جوانه حرکت می‌کند.

است. این کمپلکس برای جهت‌گیری دوک در طی تقسیم نامتقارن اساسی است.

DSL کمپلکسی است که بطور مساوی در اطراف سلول توزیع شده است و از پروتئین‌های دیسک بزرگ[1] (Dlg) اسکریبل[2] (scrib) و لارو بزرگ[3] کشنده (Lgl) تشکیل شده است. Lgl به طور برگشت‌پذیر به اسکلت سلولی متصل می‌شود. کمپلکس DSL اغلب در قرارگیری پروتئین‌های قاعده‌ای به کار می‌رود.

MPSB: یک کمپلکس قاعده‌ای که سرنوشت سلولی GMC را القا می‌کند. دارای پروتئین اسکافولد مارپیچ‌دار میراندا[4] است، فاکتور رونویسی رده هومئو دُمین به نام پروسپرو[5] پروتئین متصل‌شونده به RNA و پروتئین مهارگر ترجمه که تومور مغزی (Brat)[6] نامیده می‌شود.

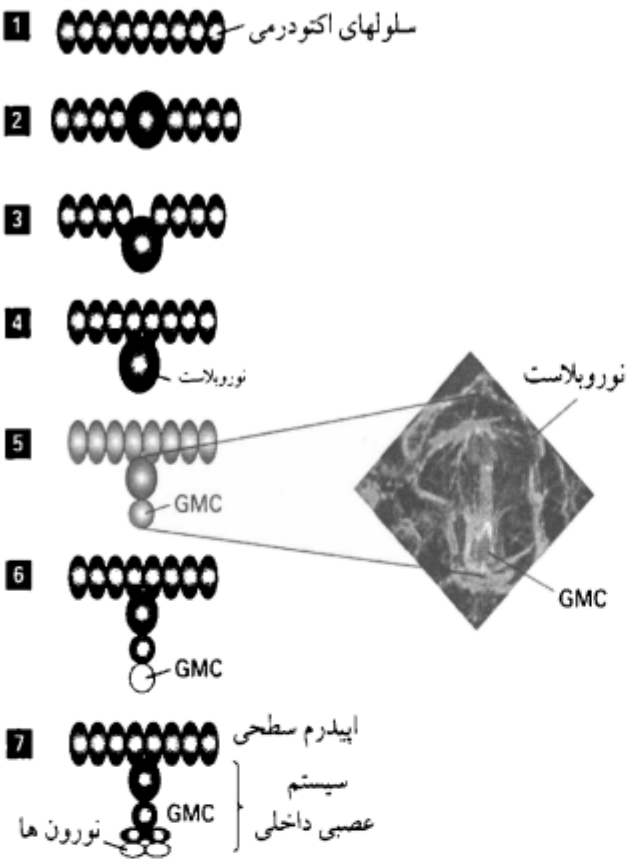
با بازیگرهای کلیدی در تقسیم سلولی نامتقارن نوروبلاست آشنا شدید. اجازه بدهید عملکردهای آنها را بررسی کنیم.

کمپلکس‌های رأسی و جهت‌گیری دوک تقسیم. برای اینکه کمپلکس‌های پروتئینی به طور متفاوت به داخل سلول‌های دختری منتقل شوند بایستی صفحه تقسیم سلولی به طور مناسبی جهت‌گیری شود. در نوروبلاست‌های در حال تقسیم، دوک میتوزی در ابتدا به صورت عمود به محور رأسی - قاعده‌ای قرار می‌گیرد و سپس ۹۰ درجه به منظور موازی شدن با آن محور در زمانی که کمپلکس‌های قاعده‌ای به طرف قاعده قرار گرفته‌اند، می‌چرخد (شکل ۳۱-۲۱). کمپلکس‌های IPLG و BPP که قبل از چرخش دوک تقسیم موجود بودند جهت‌گیری نهایی دوک را کنترل می‌کنند. این نکته با یافتن جهش‌هایی در برخی از اجزاء این کمپلکس‌ها تأیید شد، زیرا این جهش‌ها هماهنگی بین دوک و قطبیت رأسی - قاعده‌ای را حذف می‌کنند و باعث تصادفی شدن جهت‌گیری دوک می‌شوند.

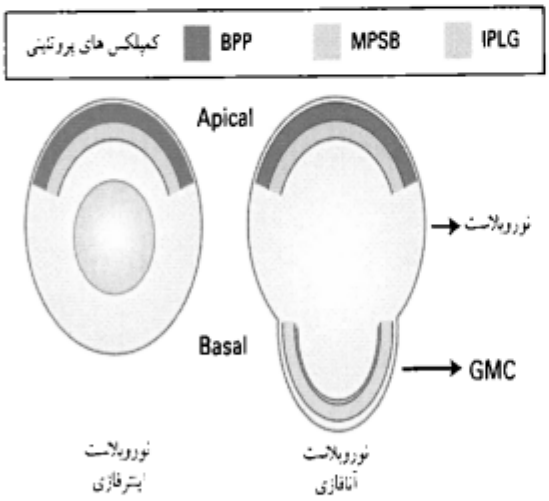
دو کمپلکس پروتئینی رأسی نقش‌های مختلفی در جهت‌گیری دوک دارند. اول اینکه کمپلکس‌های BPP به علامت‌های خارج از اکتودرم به منظور تشکیل یک هلال رأسی در اینترفاز تأخیری پاسخ می‌دهند. در این روش کمپلکس BPP قطبیت نوروبلاست را همسو با بافت اطراف می‌کند طوریکه طرف رأسی نوروبلاست همیشه به طرف اکتودرم است. دوم اینکه کمپلکس BPP، کمپلکس IPLG را به کورتکس فرا می‌خواند. بنابراین دوک را همسو با محور قاعده‌ای رأسی می‌کند. ارتباط مستقیم با دوک توسط پروتئین NuMA واسطه‌گری می‌شود که پروتئین Pins را از کمپلکس IPLG به میکروتوبول‌ها متصل می‌کند. کمپلکس IPLG برای لنگر شدن دوک و شروع تقسیم نامتقارن کافی است.

---

1 - Partner of inscuteable (Pins)
2 - Discs - large
3 - Scribble
4- Miranda
5- prospero
6 - Brain tumor giant larvae (Lgl)



◀ شکل ۲۹-۲۱ تقسیم سلولی نامتقارن در طی عصب‌زایی دروزوفیلا. ورقه اکتودرمی ❶ از یک جنین باعث ایجاد سلول‌های اپیدرمی و سلول‌های عصبی می‌شود. نوروبلاست‌ها (سلول‌های بنیادی برای سیستم عصبی مگس سرکه) وقتی تشکیل می‌شون که سلول‌های اکتودرمی بزرگ شده و از اپی‌تلیوم اکتودرمی جدا می‌شوند و به طرف بخش داخلی جنین می‌روند (❹-❷). هر نوروبلاست که حاصل می‌شود به طور نامتقارن به منظور تجدید خود و تولید یک سلول مادری گانگلیون یا GMC تقسیم می‌شود ❺. تقسیمات بعدی یک نوروبلاست، تولید GMCهای بیشتری را می‌کند و یک توده‌ای از سلول‌های پیش‌ساز را ایجاد می‌کند ❻. هر GMC به منظور ایجاد دو نورون یک مرتبه تقسیم می‌شود ❼. نوروبلاست‌ها و سلول‌های عصبی حاصل از آنها می‌توانند بسته به محلشان سرنوشت‌های متفاوتی داشته باشند. این میکروگراف تقسیم نامتقارن نوروبلاست دروزوفیلا را نشان می‌دهد. انتهای رأسی تشکیل یک نوروبلاست جدید و انتهای قاعده‌ای تشکیل یک GMC را خواهد داد. میکروتوبول‌ها نیز مشخص هستند.



◀ شکل ۳۰-۲۱ کمپلکس‌های پروتئینی جایابی شده که تقسیم سلولی نامتقارن را کنترل می‌کنند. (a) در نوروبلاست دروزوفیلا کمپلکس BPP به طوررأسی در سلول‌های اکتودرمی و در نوروبلاست‌های در حال ورقه‌شدن قرار گرفته است (مراحل (1)-(3) در شکل ۲۹-۲۱). کمپلکس IPLG نیز به طور رأسی قرار گرفته است. کمپلکس DSL (نشان داده نشده است) به طور مساوی اطراف سلول توزیع شده است و در پاسخ به تنظیم توسط BPP کمپلکس MPSB به طرف پایه قرار می‌گیرد، در آنجا این کمپلکس وارد سلول مادری گانگلیون می‌شود (GMC)، جهش در ژن‌هایی که پروتئین‌های قطبی‌شده را رمزدار می‌کنند تقسیم سلولی را از بین می‌برد و بنابراین کشنده است. انتقال واسطه‌شده توسط پروتئین حرکتی در طول رشته‌های سیتواسکلتی، کمپلکس قاعده‌ای MPSB را جابایی می‌کند.

کمپلکس قاعده‌ای و تعیین سرنوشت GMC. در طی تقسیمات نوروبلاست مگس سرکه، قبل از تقسیم کمپلکس MPSB به طرف کورتکس پایه قرار می‌گیرد و در آنجا باقی می‌ماند، در حالیکه قسمت قاعده‌ای نوروبلاست یک GMC جدید می‌شود (شکل ۳۰-۲۱ را ملاحظه کنید). پروتئین میراندا چارچوبی را برای سه پروتئین دیگر در این کمپلکس ایجاد می‌کند (پروسپرو، استوفن[1] و برات) و برای‌فراخواندن آنها به ترکیب غشای پلاسمایی قاعده‌ای لازم است. پس از هر تقسیم، پروتئین‌های MPSB که در قاعده سلول دختری قرار گرفته‌اند، خصوصیات نوروبلاستی را مهار می‌کنند و خصوصیات GMC را القا می‌کنند. پروسپرو به طور منفی رونویسی ژن‌های چرخه سلولی را تنظیم می‌کند که در نوروبلاست در حال تقسیم فعال

1- Staufen

باقی می‌ماند. برات (Brat) فاکتور رونویسی MYc را که یک تنظیم گر مثبت تقسیم سلولی و تنظیم‌گر منفی اندازه سلولی است را بعد از ترجمه مهار می‌کند. به این طریق برات GMC را کوچک نگه می‌دارد و جلوی تقسیم آن را می‌گیرد. مطالعات ژنتیکی نقش پروسپرو و برات را در تعیین GMCها حمایت می‌کند. برای مثال جهش‌های brat باعث می‌شود که GMCها به نوروبلاست‌ها تبدیل و تقسیم شوند. در صورتیکه حذف پروسپرو باعث می‌شود که GMCها کوچک باقی بمانند، ولی بیان ژن و تکثیر همانند نوروبلاست را حفظ کنند.

چگونه کمپلکس MPSB قبل از هر تقسیم نوروبلاستی در قاعده قرار می‌گیرد؟ پاسخ بسیار پیچیده‌تر از قرارگیری Ash1p در مخمر است. هر دو کمپلکس BPP رأسی و DSL کورتکسی واحد در این امر دخالت دارند. کمپلکس BPP قرارگیری MPSB را کنترل می‌کند. پروتئین کینازی غیرمعمول[1] یک جزء از کمپلکس BPP و پروتئین Lgl را که جزئی از کمپلکس DSL است فسفریله و غیرفعال می‌کند. Lgl برای آوردن پروتئین‌های MPSB به کورتکس قاعده‌ای ضروری است. از این رو aPKC در انتهای رأسی سلول‌ها قرار گرفته است و Lgl فقط در نواحی قاعده‌ای فعال است. محدودشدن Lgl فعال به کورتکس قاعده‌ای این امر را توجیه می‌کند که چگونه پروتئین‌های MPSB را به کورتکس قاعده‌ای جایی که آنها باعث می‌شوند که سلول دختری یک GMC بشود، می‌آورد.

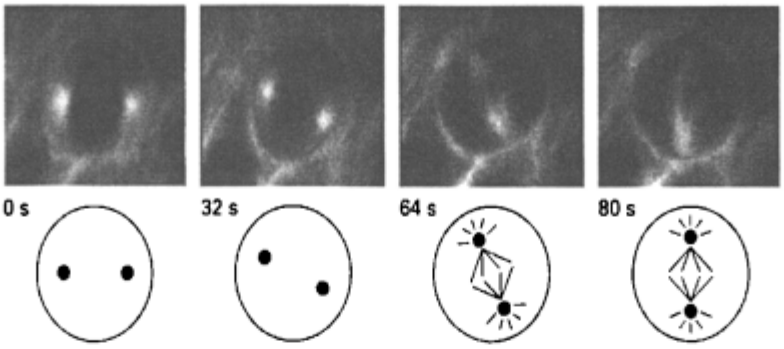
چگونه Lgl قاعده‌ای که قرارگیری MPSB را کنترل می‌کند فعال می‌شود؟ اگر چه کل ماجرا هنوز ناشناخته است مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی نشان داده‌اند که اکتین، میوزین II و میوزین VI در این عمل نقش دارند، برای مثال تخریب القاشده توسط دارو در مورد رشته‌های اکتینی هدف‌یابی MPSB را به کورتکس نوروبلاست بلوکه می‌کند. میوزین VI به طور مستقیم به میراندا (M از واژه MPSB) متصل می‌شود و برای هدف‌یابی قاعده‌ای کمپلکس MPSB ضروری است.

نامتقارنی اندازه سلول دختری. یک خصوصیت قابل توجه تقسیم نامتقارن نوروبلاست، اختلاف بارز در اندازه نوروبلاست‌ها و GMCها است. این اختلاف در اندازه سلولی توسط Pins و اجزای Gαi کمپلکس IPLG تنظیم می‌شود. کمپلکس IPLG به طرف کورتکس رأسی توسط اتصالش با اجزا Insc با اجزاء Baz کمپلکس BPP آورده می‌شود. زمانیکه یک نوروبلاست به منظور ایجاد یک GMC و یک نوروبلاست تقسیم می‌شود، GMC معمولاً کوچکتر است. همچنانکه توضیح دادیم دوک در جهت قاعده‌ای - رأسی قرار می‌گیرد و در متافاز تقسیم نوروبلاستی اندازه‌اش دو نیمه دوک تقریباً مساوی است. به هر حال از دو سانتروزوم رفتارش یکی در قطب دوک متفاوت می‌شود. سانتروزوم قاعده‌ای نشان‌دهنده قطبی است که GMC تشکیل خواهد شد و میکروتوبولهای آستری کمتری دارد، این در حالی است که سانتروزوم رأسی امتداد می‌یابد و بصورت توده‌ای از میکروتوبولهای آستری رشد می‌کند و نوروبلاست را که بزرگتر است ایجاد می‌کند (شکل ۳۲ـ۲۱).

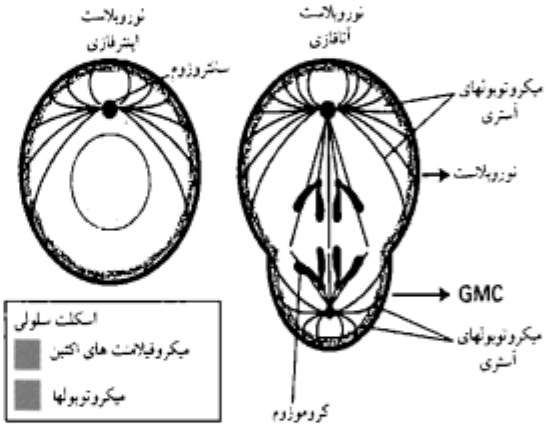
آزمایش‌های ژنتیکی کنترل نامتقارنی اندازه سلولی را بین دو سلول دختر نشان داده است. اگر هم کمپلکس رأسی BPP و هم کمپلکس رأسی IPLG دارای عملکرد باشند سلول‌های تشکیل یافته، GMC کوچک و نوروبلاست بزرگ خواهند داشت. برخلاف آن یک جهش‌یافته، با نقص در کمپلکس‌های BPP و IPLG (مانند جهش‌یافته دوگانه در **pins , baz**) دو سلول دختری را که اندازه‌شان مساوی است ایجاد خواهند کرد. جهش‌های دوگانه‌ای که زیرواحدهای G_β و G_γ را غیرفعال می‌سازند ولی بر روی زیرواحد $G_{\alpha i}$ از اجزای G_i پروتئین کمپلکس IPLG تأثیری ندارند باعث می‌شوند که میکروتوبول‌های آستری زیادی در هر دو سانتروزوم تولید گردند. تولید زیاد پروتئین G_β اثر مخالفی دارد (توبول‌های آستری روی سانتروزومها دیده نمی‌شوند). از این ارزیابی‌های ژنتیکی ممکن است نتیجه بگیریم که عملکرد طبیعی پروتئین G_β به طور انتخابی مانع از تجمع میکروتوبولهای آستری در سانتروزوم قاعده‌ای می‌شود. این تنظیم شامل عملکرد زیرواحدهای G_β/G_γ خواهد بود که قسمتی از کمپلکس‌های IPLG رأسی نیستند. در حقیقت G_β به طور یک دست در اطراف کورتکس نوروبلاست توزیع می‌گردد.

G پروتئین‌های هتروتریمری مانند آنهایی که در کمپلکس IPLG هستند، اغلب توسط گیرنده جفت‌شده با G پروتئین کنترل می‌شود. (وقتی که فعال می‌شوند) که تریمر توسط اتصال G_α و رهایی زیرواحدهای G_β/G_α فعال تجزیه می‌شود (فصل ۱۵). در جستجو برای پروتئین‌های کنترل‌کننده نامتقارنی نوروبلاست هیچ نشانی از گیرنده جفت شده با G پروتئین یافت نشده است. اجزای کمپلکس IPLG، Pins و LOCO به جای گیرنده در شروع جداشدن G پروتئین هتروتریمری جایگزین می‌شوند. Pins و

1- Atypical protein kinase C (aPKC)



▲ **شکل تجربی ۳۱-۲۱ تصویربرداری فلورسانس تایم لاپس چرخش دوک میتوزی را در تقسیم نامتقارن نوروبلاست‌ها را آشکار می‌سازد.** به جنین‌های اولیه دروزوفیلا یک ژن هیبرید (دورگه) متشکل از ژن رمزدار کننده پروتئین فلورسانس سبز الحاق شده به ژن رمزدار کننده پروتئین Tau که به میکروتوبولها متصل می‌شود، تزریق شد. در قسمت بالا تصاویر تایم لاپس از یک نوروبلاست در حال تقسیم در یک جنین زنده هستند. طرف قاعده‌ای در بالا و طرف رأسی در زیر است. در زمان صفر (پروفاز) دو سانتروزوم در سمت‌های مخالف سلول قابل مشاهده هستند. این‌ها بعنوان قطب‌های دوک عمل می‌کنند، همچنانکه میتوز پیش می‌رود میکروتوبولهایی که دوک میتوزی را تشکیل می‌دهند از آن قطب‌ها تجمع حاصل می‌کنند (شکل ۳۴-۱۸ را ملاحظه کنید). در تصاویر پی‌درپی (در ثانیه‌های ۳۲، ۶۴ و ۸۰) دوک دوقطبی می‌تواند به نظر میرسد که تشکیل شده و ۹۰ درجه به منظور همراستاشدن با محور قاعده‌ای - رأسی چرخش می‌کند. همچنانکه به طور شماتیک در زیر تصاویر میکروسکوپی ترسیم شده است.



▲ **شکل ۳۲-۲۱ جهت‌گیری دوک میتوزی و اختلاف در اندازه سلول دختری در تقسیم نامتقارن نوروبلاست‌ها.** میانکنش‌های بین میکروتوبولهای دوکی و کمپلکس‌های رأسی IPLG به دوک جهت می‌دهند. میکروفیلامانهای اکتین اغلب اوقات در زیر سطح سلول قرار می‌گیرند، میکروتوبول‌ها از سانتروزوم در طی اینترفاز شعاعی می‌شوند و سپس به منظور تشکیل دوک میتوزی تجمع حاصل می‌کنند و در طی تقسیم سلولی به سانتروزومهای مضاعف‌شده متصل می‌شوند. به محل سانتروزوم در طی اینترفاز درانتهای رأسی سلول توجه کنید. نامتقارنی دراندازه سلول دختری با تجمع متفاوت میکروتوبولهای آستری شروع می‌شود که به طور بارزی کوتاه‌تر یا دارای مقدار کمتری درانتهای قاعده‌ای سلول در حال تقسیم هستند و سلول مادری گانگلیون (GMC) را تشکیل می‌دهند.

LOCO تا حدی اضافی هستند و جهش هر دوی آنها باعث نقایصی مشابه با جهش زیرواحدهای G_β یا G_γ می‌شود. Pins و Loco به $G_{\alpha i}$.GDP متصل می‌شوند و مانند مهارگرهای جداشدن نوکلئوتید گوانین عمل می‌کنند، به این ترتیب $G_{\alpha i}$ را متصل با GDP نگه می‌دارند و تشکیل $G_{\alpha i}$.GDP را می‌دهند و G_β/G_γ بر روی هدف‌هایشان عمل می‌کنند. همانطور که از یک چرخه G پروتئین انتظار می‌رود یک پروتئین فعال‌کننده GTPase (GAP)[1] و یک فاکتور تبادل GDP (GEF)[2] نیز یافت شده است که تقسیم نامتقارن نوروبلاست را تنظیم می‌کند. واکنش G GAP پروتئین را توسط شکست GTP به GDP غیرفعال می‌کند، در حالیکه واکنش GEF فعالیت G پروتئین را با آوردن یک GTP جدید تجدید می‌کند. مکانیسمی که توسط آن جزء G پروتئین از کمپلکس IPLG فعالیت سانتروزوم را تنظیم می‌کند ناشناخته باقی می‌ماند.

خلاصه‌ای از کمپلکس‌های پروتئینی تعیین‌کننده نامتقارنی

وقایع اولیه در قطبی‌شدن و سازماندهی تقسیم سلولی نامتقارن در سه فاز می‌تواند خلاصه شود: (۱) تعیین قطبیت سلولی، (۲) همردیف شدن دوک میتوزی با قطبیت سلول، (۳) تعیین سرنوشت‌های متفاوت.

برای فاز ۱، کمپلکس BPP قبلاً در رأس سلول‌های اکتودرمی قرار گرفته است. زمانیکه برخی از آن سلول‌ها به زیر

1- GTPase activating protein (GAP)

2- GDP exchange factor (GEF)

سطح به منظور تبدیل شدن به نوروبلاست می‌روند محل رأسی BPP ثابت می‌شود (کمپلکس IPLG در رأس بعد از کمپلکس BPP قرار گرفته است). همراه با کمپلکس DSL ، این دو کمپلکس رأسی، قرارگیری قاعده‌ای MPSB را هدایت می‌کنند.

برای فاز ۲، جهت‌گیری دوک نسبت به اکتودرم نتیجه غیرمستقیم کمپلکس BPP قرار گرفته به صورت رأسی است که اکتودرم جهت دهی شده را با کمپلکس IPLG مرتبط می‌کند. میکروتوبول‌های دوک میتوزی توسط پروتئین NuMA مگس سرکه به کمپلکس IPLG رأسی متصل می‌شوند. بنابراین دوک را جهت‌دهی می‌کنند.

برای فاز ۳، همچنانکه تقسیمات سلولی نامتقارن شروع می‌شود هر نوروبلاست در حالی که یک سلول GMC کوچکتر را در جهت داخلی (قاعده) ایجاد می‌کند، خودش را تجدید می‌کند. سرنوشت‌های متفاوت توسط پروتئین‌های قرار گرفته در سلول‌های دختری تعیین می‌شوند. نوروبلاست‌ها خصوصیات سلول بنیادی را دارند و سرنوشت سلول بنیادی را توسط aPKC که قسمتی از کمپلکس BPP است و تجدیدشدن نوروبلاست را شروع می‌کند، کسب می‌کند. برات و پروسپرو اجزاء کمپلکس MPSB هستند که در سلول دختری کوچک‌تر داخلی (قاعده‌ای) قرار گرفته‌اند و تمایز GMC را شروع می‌کند. اجزاء G پروتئین از کمپلکس IPLG تجمع میکروتوبول آستری را در نوروبلاست درحال تقسیم فعال می‌کند و اندازه دو قطب و در نتیجه اندازه سلول‌های دختری را تعیین می‌کند. از این رو IPLG در رأس قرار گرفته است و سلول دختری رأسی (یک نوروبلاست) بزرگتر از سلول دختری قاعده‌ای (یک GMC) است.

از این خلاصه ما می‌توانیم ببینیم که چگونه یک عده از کمپلکس‌های پروتئینی رویدادهای اساسی را در طی تقسیم سلولی نامتقارن، قرارگیری و فعال‌سازی تنظیم کننده‌های نامتقارنی تقسیم متفاوت پروتئین‌های تنظیمی تعیین‌کننده سرنوشت سلولی، جهت‌دهی دوک و تولید سلول‌های دختری با اندازه‌های متفاوت را هماهنگ می‌کنند.

نکات کلیدی بخش ۴-۲۱

تنظیم تقسیم سلولی نامتقارن

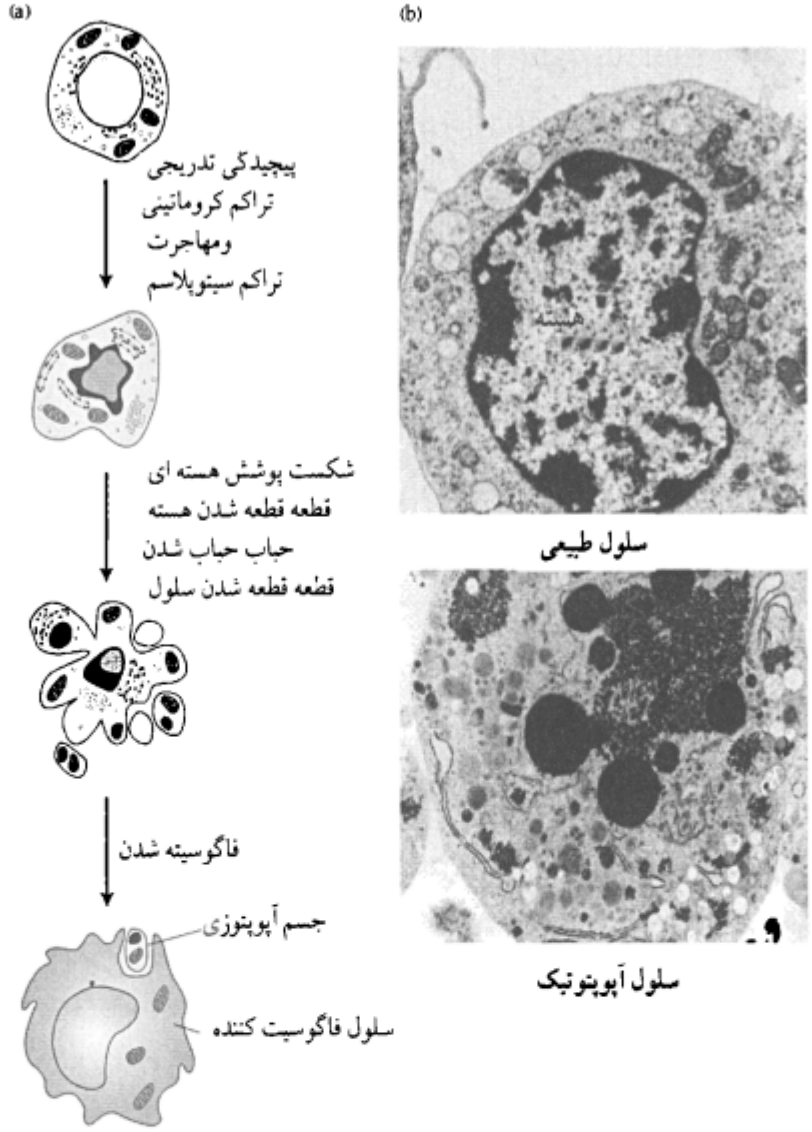
- تقسیم سلولی نامتقارن نیاز به قطبی شدن یک سلول در حال تقسیم (که معمولاً شامل جایگیری برخی از ترکیبات سیتوپلاسمی است) و سپس توزیع نامتقارن این ترکیبات به سلول‌های دختری دارد (شکل ۲۶-۲۱ را ملاحظه کنید).
- در تقسیم نامتقارن مخمرهای در حال جوانه‌زنی یک سیستم انتقالی وابسته به میوزین ASH1-mRNA را به جوانه حمل می‌کند (شکل ۲۸-۲۱ را ملاحظه کنید)
- پروتئین Ash1 در سلول دختری درست بعد از تقسیم ایجاد می‌شود و مانع از بیان آندونوکلئاز HO می‌شود که برای تغییر حالت گونه آمیزشی ضروری است (شکل ۲۷-۲۱ را ملاحظه کنید).
- تقسیم نامتقارن در نوروبلاست‌های دروزوفیلا به دوکمپلکس پروتئینی رأسی (IPLG-BPP)، یک کمپلکس قاعده‌ای (MPSB) و یک کمپلکس توزیع شده یکسان (DSL) بستگی دارد. پروتئین‌های قاعده‌ای به سلول مادر گانگلیون (GMC) می‌روند و دارای پروتئین‌هایی هستند که سرنوشت سلولی را تعیین می‌کنند (شکل ۳۰-۲۱ را ملاحظه کنید).
- فاکتورهای نامتقارنی تاثیرشان را حداقل توسط کنترل جهت دوک میتوزی اعمال می‌کنند. طوریکه پروتئین‌ها وساختارهایی که به طور نامتقارن قرار گرفته‌اند به طور متفاوتی به داخل دو سلول دختر می‌روند (شکل ۲۳-۲۱ را ملاحظه کنید)
- پروتئین کیناز غیرمعمول (aPKC) در کمپلکس رأسی BPP، پروتئین LGL (جزئی از کمپلکس DSL) را فسفریله می‌کند ولی فقط در ناحیه رأسی به دلیل محل قرارگیری BPP عمل می‌کند. LGL فسفریله نشده که فقط در نواحی قاعده‌ای وجوددارد در آوردن MPSB به قشر، جایی که آن نیاز به اسکلت سلولی اکتینی دارد، فعال است.
- فرآیندهای کلی تقسیم سلولی نامتقارن و کمپلکس‌های پروتئینی کنترل کننده آن در طی تکامل تا حد زیادی حفظ شده است.

۵-۲۱ مرگ سلولی و تنظیم آن

مرگ برنامه دار سلولی سرنوشت مهم سلولی است. مرگ سلولی مانع از پرده‌دار شدن دست‌های ما و تطویل دم جنینی‌ها و همچنین مانع از پاسخ سیستم ایمنی بدن به پروتئین‌های خودی می‌شود. در حقیقت عمده سلول‌های تولیدشده در طی تکوین مغز بعداً می‌میرند.

میانکنش‌های سلولی مرگ سلولی را به دو طریق مختلف تنظیم می‌کنند. اولاً اغلب سلول‌ها در موجودات پرسلولی نیاز به پیام‌هایی دارند که زنده بمانند. در غیاب چنین پیام‌های حیاتی که عمدتاً به آنها **فاکتورهای تروفیک**[1] اطلاق می‌گردد سلول‌ها برنامه خودکشی را فعال می‌کنند. ثانیاً در برخی از زمینه‌های

1 - Trophic factors



▲ **شکل ۳۳-۲۱ خصوصیات فراساختاری[1] مرگ سلولی توسط آپوپتوزیس.** (a) طرح شماتیک پیشرفت تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده در سلول‌های آپوپتوزی را توضیح می‌دهد. در ابتدای آپوپتوز تراکم کروموزومی در اطراف هسته اتفاق می‌افتد سلول چروکیده می‌شود، اگر چه اندامک‌ها سالم ودست‌نخورده باقی می‌مانند. بعداً هم قطعات هسته‌ای و هم سیتوپلاسمی تشکیل اجسام آپوپتوزی را می‌دهند که توسط سلول‌های همسایه فاگوسیت می‌شوند. (b) تصویر یک سلول طبیعی (در بالا) و یک سلول آپوپتوتیک (در پایین) را با هم مقایسه می‌کند در مورد سلول آپوپتوزی دایره‌هایی از کروماتین متراکم همچنانکه هسته شروع به قطعه قطعه شدن می‌کند، آشکار است.

تکوینی مانند سیستم ایمنی، پیام‌های ویژه، پیام مرگ را القا می‌کنند که سلول‌ها را می‌کشد. سلول‌ها یا در عدم وجود پیام‌های حیاتی می‌میرند و یا توسط پیام‌های کشنده از سایر سلول‌ها کشته می‌شوند، مرگ توسط مسیر مولکولی مشترکی واسطه‌گری می‌شود. در این بخش ما ابتدا مرگ برنامه‌دار سلولی را از مرگی که به دلیل آسیب بافتی حاصل می‌شود شناسایی می‌کنیم، سپس نقش فاکتورهای تروفیک را در تکوین عصبی مورد توجه قرار می‌دهیم و سرانجام مسیر اثرگر حفظ شده از لحاظ تکاملی را که منجر به خودکشی یا مرگ سلولی می‌شود شرح می‌دهیم.

مرگ برنامه‌دار سلول از طریق آپوپتوز اتفاق می‌افتد.

سلول‌هایی که به طریق مرگ برنامه‌دار سلولی می‌میرند، توسط ترادف شناخته شده از تغییرات مورفولوژیکی که مجموعاً آپوپتوز[2] نامیده می‌شود، شناخته می‌شوند (آپوپتوز واژه یونانی به معنی ریزش برگ درخت است). سلول‌های در حال مرگ چروکیده

1 - Ultra strictural 2 - Apoptosis

شده، متراکم می‌شوند، سپس قطعه‌قطعه می‌شوند و اجسام آپوپتوزی کوچک متصل به غشاء را آزاد می‌کنند که به طور کلی توسط سایر سلول‌ها از میان برداشته می‌شوند (شکل ۲۳-۲۱ و شکل ۱۹-۱ را نیز ملاحظه کنید). هسته متراکم‌شده و DNA قطعه‌قطعه می‌شود. ترکیبات درون سلول به محیط خارج سلولی آزاد نمی‌شود تا اثرات تخریبی بر روی سلول‌های همسایه نداشته باشند. تغییراتی که سلول‌ها در هنگام آپوپتوز محتمل می‌شوند مانند متراکم‌شدن هسته و از میان برداشته شدن توسط سلول‌های اطراف، باعث شد که محققان بگویند که این نوع مرگ سلولی تحت کنترل برنامه‌ای دقیق است. این برنامه در طی هم زندگی جنینی و هم در بلوغ به منظور حفظ طبیعی تعداد و ترکیب سلولی اساسی است.

ژن‌های دخیل در کنترل مرگ سلول پروتئین‌هایی با سه عملکرد مختلف را رمزدار می‌کنند.

- پروتئین‌های کشنده که به منظور شروع فرآیندهای آپوپتوزی لازم هستند.
- پروتئین‌های تخریبی، اعمالی مانند هضم DNA در سلول در حال مرگ را انجام می‌دهند.
- پروتئین‌های فروبرنده که برای فاگوسیتوز سلول‌های در حال مرگ توسط سلول دیگر لازم هستند.

در نگاه اول به فرو بردن، فرآیند تمیزکردن ساده بعد از مرگ است. ولی برخی مدارک می‌گویند که آن قسمتی از تصمیم نهایی برای مرگ است. برای مثال جهش‌هایی در ژن‌های سلول‌های کشنده همیشه مانع از شروع آپوپتوز می‌شوند، در صورتیکه جهش‌هایی که فروبردن را بلوکه می‌کنند برخی اوقات به سلول‌ها اجازه می‌دهند که زنده بمانند تا با مرگ طبیعی بمیرند. سلول‌های دارای جهش در ژن فروبرنده می‌توانند آپوپتوز را شروع کنند ولی برخی اوقات زنده می‌مانند. فرو بردن شامل تجمع هاله‌ای از اکتین در اطراف سلول در حال مرگ است که توسط پروتئین‌های آپوپتوزی مانند Rac که یک G پروتئین مونومری است و به تنظیم پلیمریزاسیون اکتین کمک می‌کند شروع می‌شود (شکل ۴۲-۱۷ را ملاحظه کنید) یک پیام بر روی سطح سلول‌های در حال مرگ گیرنده‌ای را بر روی سلول‌های همسایه تحریک می‌کند و آن نیز تغییرات غشایی منجرشونده به فرو بردن را شروع می‌کنند.

برخلاف آپوپتوز، سلول‌هایی که در پاسخ به آسیب بافتی می‌میرند تغییرات مورفولوژیکی خیلی متفاوتی را نشان می‌دهند که به آن نکروزسیس[1] اطلاق می‌گردد. سلول‌های که متحمل این فرآیند می‌شوند متورم شده، منفجر می‌شوند و محتویات داخل سلولی شان را آزاد می‌کنند که می‌تواند به سلول‌های اطراف صدمه زده و باعث التهاب شود.

نوروتروفین‌ها باعث بقاء نورون‌ها می‌شوند

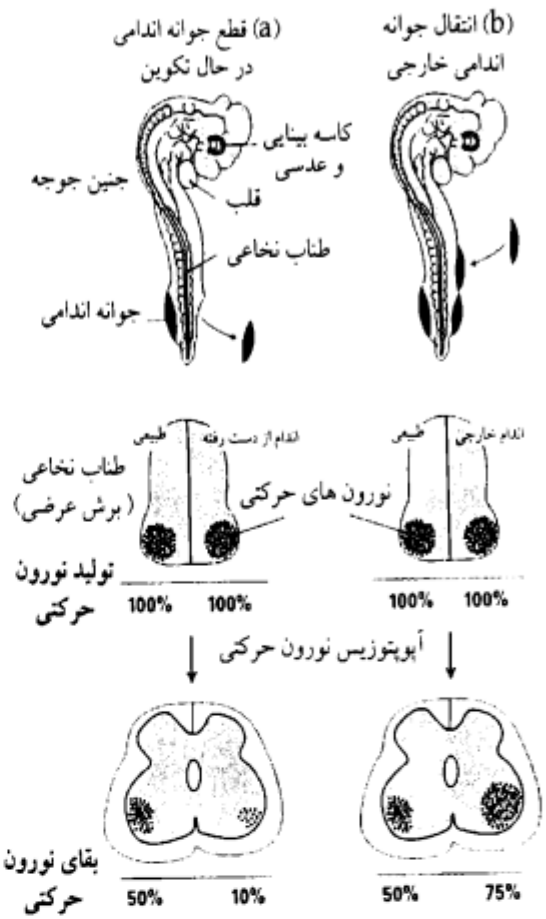
مطالعات اولیه‌ای که اهمیت فاکتورهای تروفیک را در تکوین سلولی تأیید می‌کردند از بررسی‌های سیستم عصبی در حال تکوین به دست آمده‌اند. زمانیکه نورون‌ها به منظور ایجاد ارتباط با سایر نورون‌ها و با ماهیچه‌ها (برخی اوقات مسافت‌های قابل ملاحظه‌ای دارند) رشد می‌کنند، اغلب اوقات سلول‌هایی که رشد می‌کند زنده خواهند ماند، نورون‌ها اجسام سلولی هستند که در طناب عصبی و نزدیک به عقده‌های عصبی قرار دارند، در حالیکه زائده‌های آن‌ها به خارج از این نواحی گسترش می‌یابند. آنهایی که ارتباطات خود را بیشتر می‌کنند ، زنده می‌مانند و آنهایی که نمی‌توانند ارتباط برقرار کنند می‌میرند.

در اوایل ۱۹۰۰ نشان داده شد تعداد نورون‌هایی که بخش محیط را عصب‌دهی می‌کنند به اندازه بافتی که آنها ارتباط خواهند داد (در میدان هدف نامیده می‌شود)، بستگی دارد مثلاً برداشت جوانه‌های اندامی از جنین‌های جوجه در حال تکوین منجر به کاهش در تعداد نورون‌های حسی و نورون‌های حرکتی عصب‌دهی کننده جوانه شد (شکل ۳۴-۲۱).

برخلاف آن، پیوند بافت‌اندامی دیگر به جوانه اندامی منجر به افزایش تعداد نورون‌ها در نواحی مربوط، طناب عصبی و عقده‌های عصبی حسی شد. در واقع افزایش در اندازه میدان هدف با افزایش اضافی متناسب در تعداد نورون‌های عصب‌دهی کننده میدان هدف، همراه می‌شود. این تناسب بیشتر در نتیجه بقاء انتخابی نورون‌ها تا تمایز و یا رشد آنها است. مشاهده اینکه اغلب نورون‌های حرکتی و حسی بعد از اینکه به میدان هدف محیطی‌شان رسیدند، می‌میرند این را پیشنهاد می‌کند که نورون‌ها برای فاکتورهای رشد تولیدشده توسط بافت هدف، رقابت می‌کنند.

بعد از مشاهدات اولیه دانشمندان کشف کردند که انتقال یک تومور سارکومای موشی به یک جوجه منجر به افزایش بارزی در تعداد انواع مشخصی از نورون‌ها شد این یافته حاکی از این امر است که تومور بصورت منبعی غنی از فاکتور رشد فرضی عمل می‌کند. به منظور جداسازی و خالص سازی این فاکتور که بعنوان فاکتور رشد عصبی (NGF) شناخته می‌شود، دانشمندان یک سنجش *In Vitro* که در آن رشد نوریت‌ها از عقده‌های حسی (عصب‌ها) اندازه‌گیری می‌شد، استفاده کردند. نوریت‌ها امتدادهایی از سیتوپلاسم سلولی هستند که می‌توانند به منظور تشکیل

1 - Necrosis



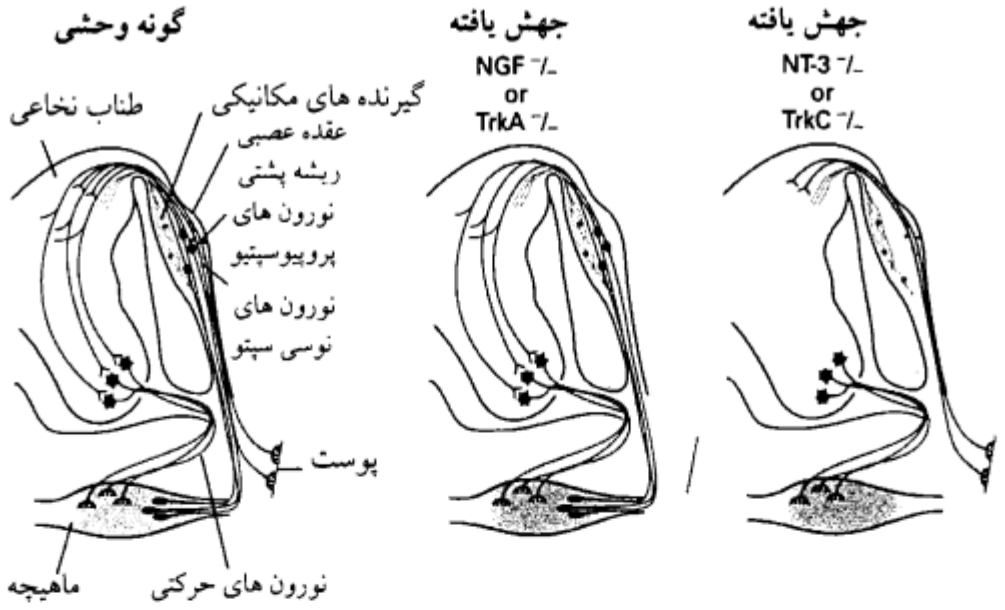
▲ **شکل تجربی ۳۴-۲۱ بقای نورون‌های حرکتی به اندازه میدان هدف ماهیچه‌ای که آن را عصب‌دهی می‌کنند، بستگی دارد.** (a) نتیجه برداشت یک جوانه اندامی از یک طرف جنین جوجه ۲/۵ روزه، کاهش فاحش در تعداد نورون‌های حرکتی در طرف دست خورده است. در یک جنین بریده شده تعداد طبیعی از نورون‌های حرکتی در هر دو طرف تولید می‌شوند. (وسط) در مراحل بعدی تکوین نورون‌های حرکتی بسیار کمتری در طرف طناب نخاعی که اندام‌شان را از دست داده نسبت به طرف طبیعی (پایین) باقی می‌مانند. توجه کنید که فقط ۵۰ درصد از نورون‌های حرکتی که تشکیل شده‌اند به طور طبیعی زنده می‌مانند. (b) انتقال جوانه اندامی خارجی به یک جنین اولیه جوجه اثر متفاوتی را ایجاد می‌کند بدین ترتیب که نورون‌های حرکتی بیشتری در طرفی که بافت هدف اضافه وجود دارد، نسبت به طرف طبیعی به وجود می‌آیند.

رشته‌های بزرگ سیستم عصبی رشد کنند (**آکسون‌ها و دندریت‌ها**) (شکل ۲-۲۳ را ملاحظه کنید). کشف بعدی اینکه غده ساب ماکسیلاری در موش تولید مقادیر زیادی از NGF را می‌کند، بیوشیمیست‌ها را قادر به تخلیص و تعیین توالی این پروتئین کرده، یک هومودیمری از دو پلی پپتید دارای ۱۱۸ اسیدآمینه‌ای، NGFC از لحاظ ساختاری و عملکردی به یک عده از فاکتورهای تروفیک وابسته است که در مجموع به آنها **نوتروفین‌ها** اطلاق می‌گردد. فاکتور نوتروفیک مشتق‌شده از مغز[1] (BDNF) ونوتروفین ۳ (NT-3) نیز از اعضای این خانواده پروتئینی است.

نوتروفین‌ها به یک خانواده از گیرنده‌های تیروزین کینازی که **Trk**ها نامیده می‌شوند، متصل شده و آنها را فعال می‌سازند. (ساختار عمومی گیرنده‌های تیروزین کینازی و مسیرهای پیام رسانی سلولی که آنها فعال می‌سازند در فصل ۱۶ آورده شده است). هر نوتروفین با تمایل بالا به یک گیرنده Trk متصل می‌شود: NGF به TrkA، BDNF به TrkB، و NT-3 به TrkC متصل می‌شود. NT3 همچنین می‌تواند با تمایل پائین‌تر هم به TrkA و هم TrkB متصل شود. اتصال این فاکتورها به گیرنده‌هایشان یک پیام زیستی را برای رده‌های متفاوت نورون‌ها ایجاد می‌کند. همچنانکه نورون‌ها از طناب نخاعی به طرف محیط رشد می‌کنند نوتروفین‌های تولید شده توسط بافت‌های هدف به گیرنده‌های Trk بر روی مخروطهای[2] رشد اکسون‌های در حال امتداد متصل می‌شوند و باعث بقای نورونهایی می‌شوند که به طور موفقیت‌آمیز به اهداف‌شان می‌رسند. علاوه بر این نوتروفین‌ها به نوع متفاوتی از گیرنده به نام $P75^{NTR}$ (NTR = گیرنده نوتروفین) با تمایل کمتر متصل می‌شوند. به هر حال $p75^{NTR}$ تشکیل کمپلکس‌های هتروالتی پلیمری را با گیرنده‌های Trk متفاوت می‌کند. این ارتباط تمایل Trkها را برای لیگاندهایشان افزایش می‌دهد. بسته به گونه سلولی اتصال NGF و BDNF به $p75^{NTR}$ در غیاب TrkA ممکن است مرگ سلولی را شروع کند. (پدیده‌ای که در آن چندین نوتروفین با چندین گیرنده مشابه میانکنش می‌دهند که قابل مقایسه با لیگاندهای شبه EGF و گیرنده‌های HER آنهاست که در شکل ۱۸-۱۶ توضیح داده شده است).

به منظور شناسایی نقش نوتروفین‌ها در تکوین، دانشمندان موش‌هایی بانقص در ژن هر یک از نوتروفین‌ها و گیرنده‌هایشان ایجاد کردند، این مطالعات روشن ساخت که نوتروفین‌های مختلف و گیرنده مرتبط با آن‌ها برای بقای رده‌های مختلف از نورون‌های حسی لازم هستند (شکل ۳۵-۲۱). برای مثال نورون‌های حساس به درد (نوسی سپتیو)[3] که TrkA را بیان می‌کنند بطور انتخابی از ریشه عقده عصبی پشتی موش ضربه دیده فاقد NGF یا TrkA حذف شده است. در صورتیکه نورون‌های بیان‌کننده TrkB و TrkC در چنین موش‌هایی دست‌نخورده باقی مانده‌اند.

1 - Brain deribed neurotrophic factor (BDNF)
2 - Growth Cones
3 - Noci Ceptive



▲ **شکل تجربی ۳۵-۲۱ (شکل رنگی) رده‌های مختلفی از نورون‌های حسی، در موش‌های تخریب ژنی فاقد فاکتورهای‌تروفیک متفاوت یا گیرندهٔ آنها حذف می‌شوند.** در جانوران فاقد فاکتور رشد عصبی (NGF) یا گیرنده‌اش یعنی TrkA، نورون‌های (جسگر درد) نوسی سپتیو (آبی) کوچک عصبدهی کننده پوست از بین می‌روند. این نورون‌ها گیرنده TrkA را بیان می‌کنند و بافت‌های هدف تولیدکننده NGF را عصبدهی می‌کنند. در حیوانات فاقد هم نوتروفین - ۳ (NT-3) و یا گیرنده آن یعنی TrkC، نورونهایی پروپی سپتیو بزرگ (قرمز) که دوک‌های ماهیچه‌ای را عصبدهی می‌کنند از بین می‌روند. ماهیچه تولید NT-3 را می‌کند و نورون‌های پروپی سپتیو، TrkC را بیان می‌کنند. گیرنده‌های مکانیکی[1] (نارنجی) رده دیگری از نورون‌های حسی در عقده عصبی از ریشه پشتی در این جهش‌یافته‌ها دست نخورده هستند.

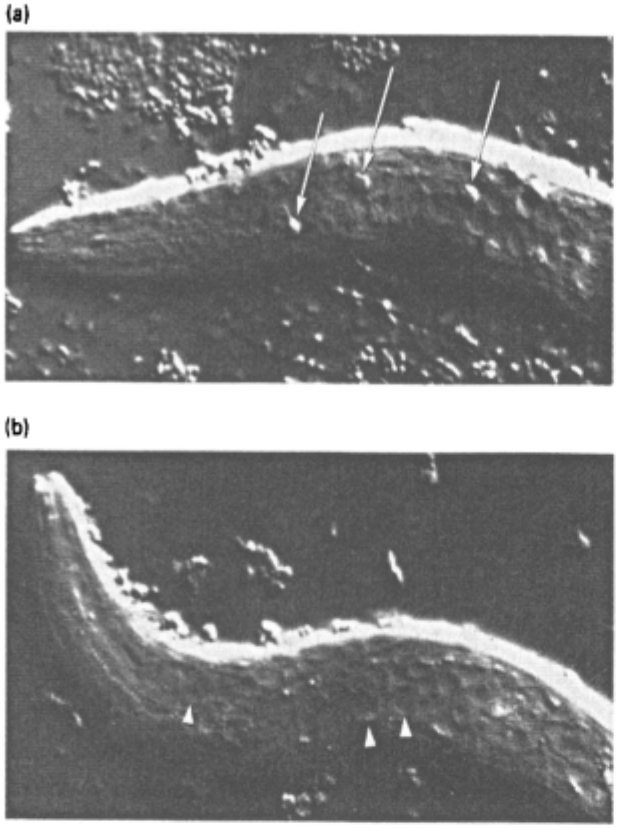
برخلاف آن در نورون‌های پروپری سپتیو[2] بیان‌کننده TrkC که موقعیت اندام‌ها را شناسایی می‌کند، در ریشه عقده عصبی پشتی در جهش‌یافته‌های TrkC و NT-3 از بین رفته است.

آبشاری از پروتئین‌های کاسپازی در یک مسیر آپوپوزتی عمل می‌کنند

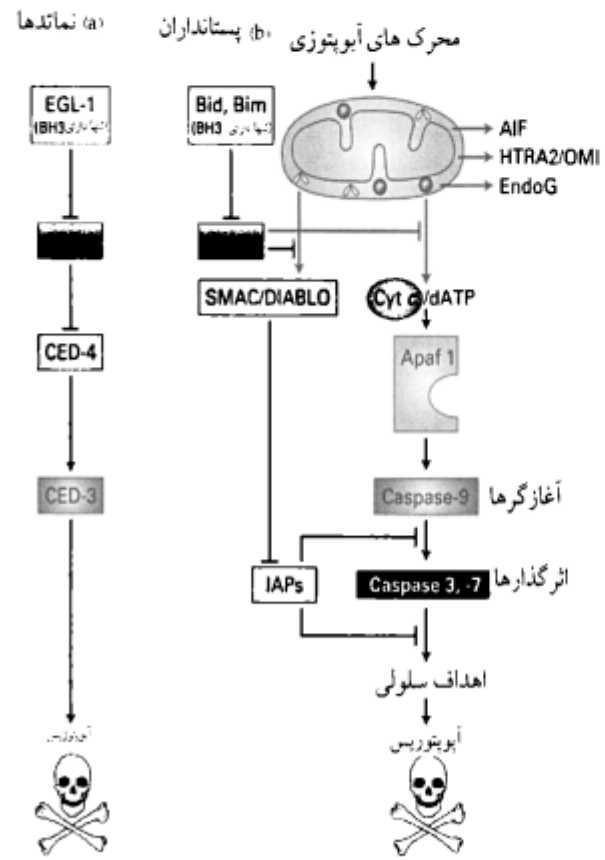
نوتروفین‌ها و سایر پیام‌هایی که سلول‌ها را زنده نگه می‌دارند بر روی سیستم کنترلی مرگ سلولی که از لحاظ تکاملی حفظ شده‌اند عمل می‌کنند. دیدگاههای کلیدی بر روی مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده مرگ سلولی از مطالعات ژنتیکی با استفاده از کرم الگانس حاصل می‌شوند. از ۹۴۷ سلول غیرجنسی تولید شده در طی تکوین در نوع هرمافرودیت بالغ، ۱۳۸ سلول متحمل مرگ برنامه‌دار سلولی می‌شوند. جهش‌های ویژه، چهار ژنی راکه مسئول ایجاد پروتئین‌هایی هستند که نقش اساسی را در کنترل مرگ برنامه دار سلولی در طی تکوین کرم الگانس شناسایی کرده‌اند: **ced-3** و **ced-4**، **ced-9** و **egl-1**. در جهش‌های **ced-3** و **ced-4**، ۱۳۱ سلول که در حالت طبیعی می‌میرند، زنده می‌مانند (شکل ۳۶-۲۱) پروتئین‌های پستانداری که با پروتئین‌ها CED-3، CED-4، CED-9 و EGL-1 مرتبط هستند در شکل ۳۷-۲۱ نشان داده شده‌اند. در توضیح پروتئین‌های کرمی اسامی پستانداری را در پارانتز به منظور ساده‌تر کردن ارتباطات آنها خواهیم آورد.

در نتیجهٔ مطالعات ژنتیکی در کرم‌ها و مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی انسانی در ابتدا پیشنهاد شد که یک مسیر حفظ‌شده تکاملی، آپوپتوز را واسطه‌گری می‌کند. اولین ژن آپوپتوزی کلون شده انسانی bcl-2 بود که از لنفومای فولیکولی انسانی جداسازی شد، یک نوع جهش‌یافته‌ای از این ژن در سلول‌های لنفوما توسط بازآرایی کروموزومی تولید می‌شود که نشان داده شده است که بصورت یک **آنکوژن** عمل می‌کند و باعث بقای سلول می‌شود (فصل ۲۵). بازآرایی کروموزومی ناحیه رمزدهنده ژن bcl-2 را به یک افزاینده ژن ایمونوگلوبولین متصل می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که تولید بیش از حد پروتئین Bcl-2 سلول‌های سرطانی را که برای مرگ برنامه‌دار شده‌اند، زنده نگه می‌دارد. پروتئین Bcl-2 انسانی و پروتئین CED-9 کرمی مشابه هم هستند و یک ترانس ژن bcl-2 می‌تواند مرگ سلولی زیاد را

1 - Mechanoreceptors 2 - Properi Ceptive



◀ **شکل تجربی ۳۶-۲۱ جهش در ژن ced-3 مرگ برنامه‌دار سلولی در کرم الگانس را بلوکه می‌کند.** (a) یک لارو جهش یافته که تازه ایجاد شده است دارای جهش در ژن **ced-1** است. به خاطر جهش‌هایی در این ژن از فرو بردن سلول‌های مرده ممانعت می‌شود و سلول‌های مرده منعکس کننده نور تجمع حاصل می‌کنند (که با پیکان نشان داده شده است) و مشاهده آنها را آسان می‌سازد. (b) لارو ایجادشده جدید با جهش‌هایی در هر دو ژن **ced-1** و **ced-3**. نبود سلول‌های مرده منعکس‌کننده نور در این جهش‌یافته‌های دوگانه حاکی از عدم مرگ سلولی است. بنابراین پروتئین CED-3 برای مرگ برنامه‌دار سلولی لازم است.



◀ **شکل ۳۷-۲۱ (شکل رنگی) حفظ تکاملی مسیرهای آپوپتوز** پروتئین‌هایی که با رنگ‌های مشابه نشان داده شده‌اند، نقش‌های مشابه را هم در پستانداران و هم نماتدها (کرم‌های حلقوی) بازی می‌کنند. (a) در نماتدها، پروتئینی که EGL-1 نامیده می‌شود به CED-9 بر روی سطح میتوکندری متصل می‌شود. این میانکنش CED-4 را از کمپلکس CED-9/CED-4 آزاد می‌کند. CED-4 آزاد خودپروتئولیزی کاسپاز CED-3 را که پروتئین‌های سلولی را تخریب کرده و باعث آپوپتوز می‌شوند را فعال می‌کند. این ارتباط بصورت یک مسیر ژنتیکی نشان داده شده است، با مهار CED-9 توسط EGL-1، CED-4 نیز مهار می‌شود. CED-4 فعال CED-3 را فعال می‌سازد. (b) در پستانداران همتاهای پروتئین‌های نماتدی و سایر پروتئین آپوپتوز را تنظیم می‌کنند. پروتئین Bcl-2 مشابه پروتئین CED-9 در شروع بقای سلولی با جلوگیری از فعال‌سازی Apaf-1 عمل می‌کند که آن نیز مشابه CED-4 است. دو پروتئین تنها دارای Bcl2 BH3 (Bim ,Bid) را به منظور ایجاد آپوپتوز مهار می‌کنند. محرک‌های آپوپتوز که به میتوکندری آسیب می‌رساند، باعث رهایی چندین پروتئین می‌شوند که مرگ سلولی را تحریک می‌کنند. مخصوصاً سیتوکروم c رهاشده از میتوکندری Apaf-1 را فعال می‌کند که آن نیز کاسپاز ۹ را فعال می‌سازد و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌گردد. متن را برای توضیح سایر پروتئین‌های پستانداری ملاحظه بفرمائید (SMAC/DIABIO و IAPها) که در نماتدها همتایی ندارند.

در کرم‌های جهش‌یافته در ced-9 حتی با وجود اینکه این دو پروتئین فقط ۲۲ درصد شبیه هم هستند را بلوکه کند. بنابراین هر دو پروتئین بصورت تنظیم‌کننده‌هایی عمل می‌کنند که مسیر آپوپتوزی را مهار می‌کنند (شکل ۳۷-۲۱) بعلاوه هر دو پروتئین دارای یک دُمین منفرد گذرنده از غشاء هستند که به طرف غشاهای بیرونی میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و هسته‌ای قرار گرفته است و در آنجا آنها بعنوان حسگرهایی عمل می‌کنند که مسیر آپوپتوزی را در پاسخ به محرک‌های خارجی کنترل می‌کنند. همچنانکه ما در زیر توضیح می‌دهیم سایر تنظیم‌گرها، آپوپتوز راشروع می‌کنند.

در مسیر آپوپتوزی از پروتئین کرمی CED-3 (کاسپاز-۹) به منظور تخریب اجزاء سلولی در طی آپوپتوز لازم است. CED-4 (Apaf-1) یک فاکتور فعال‌سازی پروتئازی است که باعث خودشکافتی پروتئین پیش‌ساز CED-3 می‌شود و ایجاد یک پروتئاز CED-3 فعال را می‌کند که مرگ سلولی را شروع می‌کند (شکل ۳۷-۲۱ را ملاحظه کنید). مرگ سلولی در جهش‌یافته‌های **ced-3** و **ced-4** و یا در جهش یافته‌های دوگانه **ced-9/ced-3** اتفاق نمی‌افتد. چنانکه کرم به نوع بالغ تکامل نمی‌یابد. این مطالعات ژنتیکی نشان داد که CED-3 و CED-4 پروتئین‌های کشنده مورد نیاز مرگ سلولی هستند و CED-9 (Bcl-2) جلوی آپوپتوزیس را می‌گیرد و این مسیر آپوپتوزی می‌تواند در همه سلول‌ها فعال شود. به هر حال نبود مرگ سلولی در جهش‌یافته‌های دوگانه **ced-3/ced-3** پیشنهاد می‌کند که CED-9 در بالادست CED-3 به منظور مهار آپوپتوز عمل می‌کند.

مکانیسمی که توسط آن CED-9 (Bcl-2)، CED-3 (کاسپاز ۹) را کنترل می‌کند ناشناخته است. پروتئین CED-9 به طور طبیعی به غشای خارجی میتوکندری متصل می‌شود و تشکیل کمپلکس با CED-4 (Apaf-1) را می‌دهد و بدانجهت مانع از فعال‌سازی CED-3 توسط CED-4 می‌شود. در نتیجه سلول زنده می‌ماند. این مکانیسم با یافته‌های ژنتیکی مطابقت دارد که نشان می‌دهند CED-9 اثری ندارد اگر CED-3 هم نباشد (جهش یافته‌های **ced-9/ced-3** مرگ سلولی ندارند). ساختار کریستالی کمپلکس‌های تریمری CED-4-CED-9 سطح تماس قلاب مانند را بین دو مولکول CED-4 و یک مولکول CED-9 ظاهر ساخت، (شکل ۳۸-۲۱) سطح تماس زیاد، ارتباط را خیلی اختصاصی می‌کند. ولی در چنین روشی است که تجزیه کمپلکس می‌تواند تنظیم شود.

رونویسی **egl-1**، (چهارمین ژن تنظیم‌کننده آپوپتوز) و به طور ژنتیکی تعیین شده است که در پاسخ به پیام‌های مرگ تحریک می‌شود. پروتئین EGL-1 تازه تولیدشده رهایی CED-4 را از CED-9 کاتالیز می‌کند. هم EGL-1 و هم CED-9 دارای یک دُمین BH3 ۱۲ اسیدآمینه‌ای هستند. به این جهت که EGL-2 اغلب فاقد دُمین‌های دیگر CED-9 است پروتئین تنها دارای BH3 نامیده می‌شود. پروتئین‌های تنها دارای BH3 مشابه پروتئین پستانداری Bim و Bid هستند. نگرشی بر اینکه چگونه EGL-1 کمپلکس CED4/CED-9 را تجربه می‌کند از ساختار کریستالی EGL-1 (Bid/Bim) در کمپلکس با CED-9 و (Bcl-9) حاصل می‌شود. در این کمپلکس دُمین BH3 تشکیل قسمت کلیدی از سطح تماسی بین این دو پروتئین را می‌دهد. CED-9 وقتی که متصل به EGL-1 است شکل‌بندی متفاوتی را نسبت به وقتی که متصل به CED-4 است دارد. این یافته پیشنهاد می‌کند که اتصال EGL-1، CED-9 را تخریب می‌کند و میانکنش آن را با CED-4 کمتر و ناپایدارتر می‌سازد. زمانیکه EGL-1 باعث تجزیه کمپلکس CED-4/CED-9 می‌شود، دیمر CED-4 رهاشده دوباره به منظور ایجاد تترامر دیمر می‌شود و سپس CED-3 را فعال می‌سازد و مرگ سلولی به دنبال آن اتفاق می‌افتد (شکل ۲۹-۲۱). مدارکی برای رویدادهای مشابه در سلول‌های کشت داده شده انسانی یافت شده است.

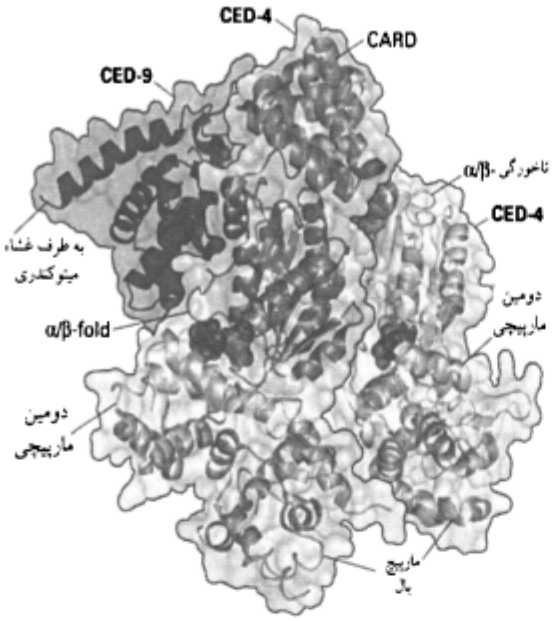
مدارکی که می‌گوید مراحل شرح داده شده در این جا برای فعال‌سازی کاسپاز کافی است از آزمایشاتی که در آنها رویدادها در محیط *In Vitro* بازسازی شده‌اند، با استفاده از ترکیبات خالص‌شده به دست آمده‌اند. CED-3، CED-4، یک CED-9 که فاقد بخش گذرنده از غشای میتوکندریایی است و EGL-1 خالص‌سازی شده است و همچنین کمپلکس CED-4/CED-9 بود. CED-4 خالص‌سازی شده (Apaf-1) قادر به شتاب دادن خود کاتالیزی CED-3 (کاسپاز ۹) خالص شده است ولی افزایش CED-9 (Bcl-2) بریده شده به ترکیب، واکنش خودشکافتی را مهار کرد. وقتی که کمپلکس CED-4/CED-9 با CED-3 ترکیب شد، خودشکافتی اتفاق نیفتاد، ولی افزایش EGL-1 به واکنش خاصیت خودشکافتی CED-3 را بازگرداند.

نام پروتئین‌های اثرگذار در مسیر آپوپتوزی (کاسپازها)[1] آنها به علت وجود یک ریشه سیستئین کلیدی در جایگاه کاتالیتیک است که به طور انتخابی پروتئین‌ها را در جایگاه‌های انتهای C در ریشه آسپارتات برش می‌دهد. کاسپازها بصورت هومودیمر عمل

1- Cysteine - Aspartic acid Protease (caspase)

می‌کنند که یک دُمین از هر کدام جایگاه فعال دیگری را پایدار می‌کند. کاسپاز اثرگذار مهم در کرم الگانس، CED-3 است، انسان‌ها ۱۵ کاسپاز مختلف دارند. همه کاسپازها در ابتدا به صورت پروکاسپازها ساخته می‌شوند که بایستی به منظور فعال شدن شکافته شوند. چنین فرآیند پروتئولیتیک در پروتئین‌ها به طور مکرر در لخته شدن خون، تولید آنزیم‌های گوارشی و تولید هورمونها استفاده می‌شود. در مهره‌داران کاسپازهای آغازگر (مانند کاسپاز ۹) توسط خود پروتئولیزی که توسط انواع دیگری از پروتئین‌ها (Apaf-1) القا می‌شود، فعال می‌شوند که به تجمع آغازگرها کمک می‌کنند. کاسپازهای آغازگر فعال شده، کاسپازهای اثرگذار (مانند کاسپاز ۳) را برش می‌دهند و بنابراین به طور سریع سطح فعالیت کاسپازی کل را در سلول د رحال مرگ تشدید می‌کنند. چندین کاسپاز اثرگذار توالی‌های سیدآمینه کوتاهی را در بسیاری از پروتئین‌های هدف، شناخته و برش می‌دهند. آنها در توالی هدف مورد ترجیح‌شان تفاوت دارند. اهداف داخل سلولی ویژه آنها شامل پروتئین‌های لامینای هسته‌ای و سیتواسکلتون است که شکافت آنها منجر به مرگ سلول می‌شود.

در پستانداران و حشرات ولی نه در کرم‌ها، آپوپتوز توسط چندین پروتئین دیگر تنظیم می‌شود (سمت راست شکل ۳۷-۲۱ را ملاحظه کنید). برای مثال خانواده‌ای از مهارگرهای پروتئین‌های آپوپتوز[1] (IAPها) یک روش دیگر برای فرونشاندن کاسپازهای اثرگذار و آغازگر ایجاد می‌کنند. IAPها یک یا چندین دُمین متصل‌شونده به عنصر روی دارند که می‌تواند به طور مستقیم به کاسپازها متصل شده و فعالیت پروتئازی آنها را مهار کند. (باکولوویروس، یک ویروس حشره، پروتئینی را تولید می‌کند که بطور مشابه به کاسپازها متصل می‌شود و آنها را مهار می‌کند و بنابراین مانع از رفتن سلول به طرف مرگ به منظور ایست عفونت ویروسی قبل از اینکه ویروس جدید ساخته شود، می‌شود). مهار کاسپازها توسط IAPها وقتی سلول نیاز به آپوپتوز دارد، مشکل ایجاد می‌کند. میتوکندری‌ها منبع خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که SMAC/DIABLOها نامیده می‌شوند که IAPها را مهار می‌کنند. بعد از اینکه سلول آسیب دید، SMAC/DIABLOها از میتوکندری‌ها رهاشده و به IAPها در سیتوزول متصل می‌شوند و به این طریق جلوی اتصال IAPها به کاسپازها را می‌گیرند با کاهش مهار واسطه شده توسط IAPها، SMAC/DIABLO، فعالیت کاسپازی و مرگ سلولی را شروع می‌کند. سه پروتئین مرتبط با میتوکندری دیگر (سرین پروتئاز Htra2/omi، فاکتور القاکننده آپوپتوز (AIF) و آندونوکلئاز G) نیز به کشتن سلول با



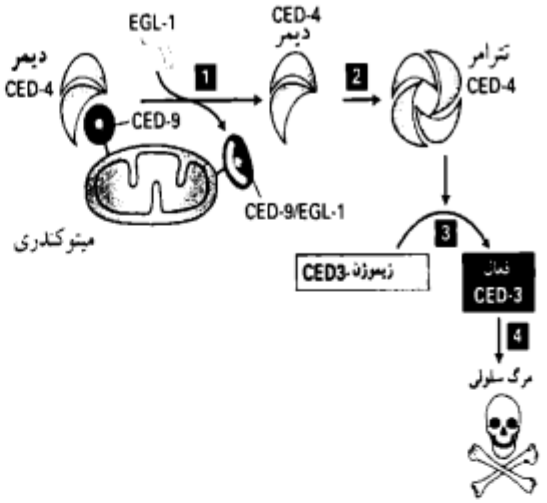
▲ **شکل ۳۸-۲۱ (شکل رنگی) ساختار کمپلکس پروتئینی CED-4/CED-9**. ساختار کریستالی، دو مولکول CED-4 متصل با یک مولکول CED-9 دارد. انتهای C از پروتئین CED-9 (آبی تیره) این کمپلکس را به غشای میتوکندری متصل می‌کند. CED-4 از چهار دُمین تشکیل شده است. (CARD) تاخوردگی‌های α/β دُمین مارپیچ بالی، دُمین مارپیچی دیگر). هر مولکول CED-4 به یک ATP متصل شده و یک یون Mg^{2+} دارد که بصورت خوشه‌ای از اتم‌ها در داخل زیرواحد قابل مشاهده است.

رهایی آنها از میتوکندری‌ها به دنبال آسیب سلول کمک می‌کنند. Htra2/omi، IAPها را برش می‌دهد، بنابراین مهار آپوپتوزی آنها را کاهش می‌دهد. از آنجا که این تنظیم کاتالیتیک است، Htra2/omi یک آنتاگونیست قوی‌تر IAPها نسبت به SMAC/DIABLO است. AIF یک فلاوپروتئین است که به طور طبیعی بصورت اکسیداز NADH عمل می‌کند که توسط پروتئازها بریده نشده و به طرف هسته که در آنجا باعث تراکم کروموزوم و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شود، حرکت می‌کند. این اثرات غیروابسته به کاسپاز هستند، پس بنابراین در همه فرآیندهای آپوپتوزی کاسپازها نقش ندارند.

تنظیم‌کننده‌های پروآپوپتوزی اجازه فعال‌سازی کاسپاز را در غیاب فاکتورهای تروفیک می‌دهند

با داشتن اجزاء اصلی در مسیر آپوپتوزی اکنون ما دید خود را

1 - Inhibitor of apoptosis Proteins



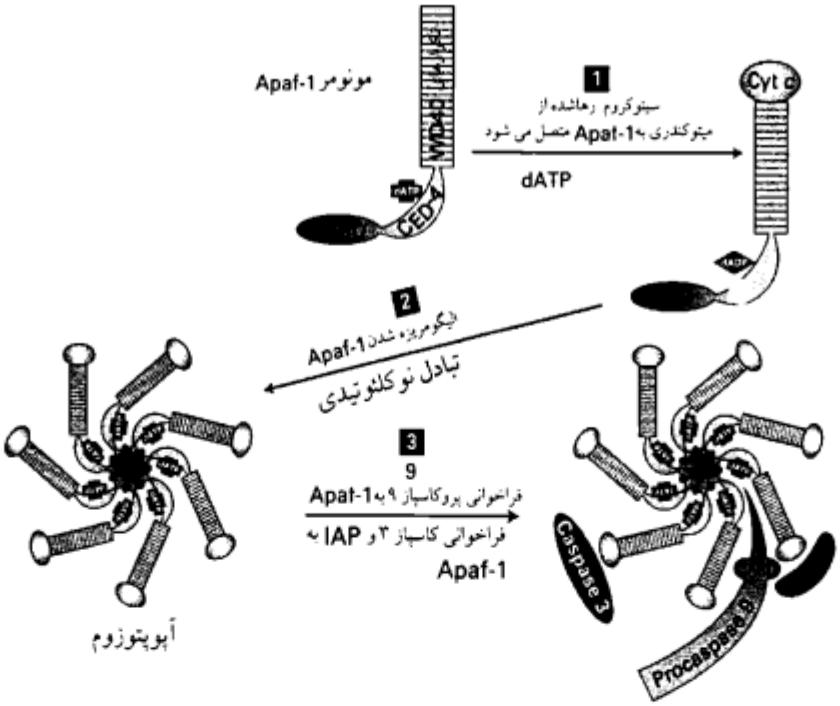
▲ **شکل ۳۹-۲۱ فعال‌سازی پروتئاز CED-3 در کرم الگانس.** پروتئین EGL-1 در پاسخ به پیام‌هایی که مرگ سلولی را شروع می‌کنند تولید می‌شود و دیمر CED-4 را از CED-9 بر روی سطح غشاء میتوکندری جدا می‌سازد ❶. دیمر CED-4 آزاد با دیمر دیگر ترکیب‌شده و یک تترامر را تشکیل می‌دهد ❷ که تبدیل زیموژن CED-3(پیش‌ساز غیرفعال آنزیمی از یک پروتئاز) را به پروتئاز CED-3 فعال را کاتالیزمی‌کند ❸. سپس این کاسپاز اثرگذار تخریب اجزاء سلولی را شروع کرده و بنابراین باعث آپوپتوزیس و مرگ سلولی می‌گردد ❹.

نسبت به کارکرد پروتئین‌های غشایی میتوکندری که آپوپتوز را تنظیم می‌کنند معطوف می‌کنیم. اگر چه عملکرد طبیعی CED-9 و Bcl-2 مسیر مرگ سلولی را مهار می‌کند ولی دیگر پروتئین‌های تنظیمی درون سلولی آپوپتوز را شروع می‌کنند. تنظیم‌کننده پرو آپوپتوزی که برای اولین بار شناخته شده Bax نامیده شد که توالی‌اش مشابه با CED-9 و Bcl-2 است. تولید بیش از حد Bax مرگ سلولی را شروع می‌کند که مخالف با CED-9 و Bcl-2 عمل می‌کند و جلوی آپوپتوز را می‌گیرد. بنابراین این خانواده از پروتئین‌های تنظیمی دارای هم اعضای آنتی آپوپتوزی (مانند CED-9 و Bcl-2) و هم اعضای پروآپوپتوزی (مانند Bax) است.

همه اعضای این خانواده که ما از آنها بعنوان خانواده Bcl-2 یادمی‌کنیم پروتئین‌های یک بار گذرنده از غشاء هستند و در میانکنش‌های الیگومری شرکت می‌کنند. در پستانداران شش عضو خانواده Bcl-2 مانع از آپوپتوز می‌شوند و ۹ عضو آن را شروع می‌کنند. بنابراین سرنوشت یک سلول (مرگ یا بقا) ممکن است طیف خاص، اعضای خانواده Bcl-2 ایجادشده توسط سلول و مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی تنظیم‌کننده آنها را منعکس کند.

برخی از اعضای خانواده Bcl-2 یکپارچگی غشای بیرونی میتوکندری را یا حفظ می‌کنند و یا از بین می‌برند و بدین ترتیب رهایی پروتئین‌های میتوکندریایی مانند سیتوکروم c را باعث می‌شوند. در سلول‌های طبیعی و سالم، سیتوکروم c در بین غشای داخلی و خارجی میتوکندری قرار گرفته است ولی در سلول‌های متحمل آپوپتوز، سیتوکروم c به داخل سیتوزول رها می‌شود. تولید بیش از حد Bcl-2 رهایی سیتوکروم c را مهار کرده و آپوپتوز را بلوکه می‌کند. برعکس تولید بیش از حد Bax رهایی سیتوکروم c به داخل سیتوزول را شروع کرده و باعث آپوپتوز می‌گردد. بعلاوه تزریق سیتوکروم c به سیتوزول سلول‌ها، آپوپتوز را القاء می‌کند. یک تعداد از محرک‌های القاکننده مرگ باعث می‌شوند که مونومرهای Bax از سیتوزول به طرف غشای خارجی میتوکندری که در آنجا الیگومریزه می‌شوند، حرکت‌کنند. هومودیمرهای Bax (نه هومردیمرهای Bcl-2 یا هترودیمرهای Bcl-2/Bax) جریان یافتن یونها را از غشای میتوکندری باعث می‌شوند. این موضوع مبهم باقی می‌ماند که چگونه جریان یونی باعث رهایی سیتوکروم c می‌گردد. اثر اعضای خانواده Bcl-2 بر روی نفوذپذیری غشای بیرونی میتوکندری در *In Vitro* با استفاده از وزیکولهای متشکل از غشاء خارجی میتوکندری تقلید شده است. افزایش Bax خالص سازی‌شده در حضور یک پروتئین دارای BH3 (مانند EGL-1 از کرم یا Bid/Bim مهره‌داران) باعث نفوذپذیری غشاء شد. این عملکرد زیست شناختی اعضای خانواده Bcl-2 توانایی عمومی آنها را برای تغییر غشای میتوکندریایی آشکار می‌سازد. علاوه بر افزایش نفوذپذیری، میتوکندری‌ها به طور طبیعی متحمل تغییراتی در مورفولوژی (ادغام و تقسیم میتوکندری) در طی مرگ سلولی می‌شوند. Bcl-xL (عضوی از خانواده Bcl-2 در مهره‌داران) و CED-9 داخل شده به سلول‌های پستاندار، می‌توانند باعث ادغام میتوکندریایی شوند. بنابراین این پروتئین‌ها توانایی‌های قابل توجهی به منظور تنظیم خصوصیات غشاءهای خارجی میتوکندری دارند.

زمانیکه سیتوکروم c به داخل سیتوزول رها می‌شود، به Apaf-1 (مشابه پستانداری CED-4) متصل شده و فعال‌سازی آبشار کاسپازی را که منجر به مرگ برنامه‌دار سلولی می‌شود شروع می‌کند (سمت راست شکل ۳۷-۲۱ را ملاحظه کنید). در غیاب سیتوکروم c، Apaf-1 به dATP متصل شده است. بعد از اتصال سیتوکروم c، dATP متصل به Apaf-1 را به dADP تبدیل می‌کند و متحمل فرآیند تجمعی به یک هپتامر دیسکی شکل می‌شود، یک کمپلکس چرخ مانند با وزن مولکولی ۱۴ مگادالتون



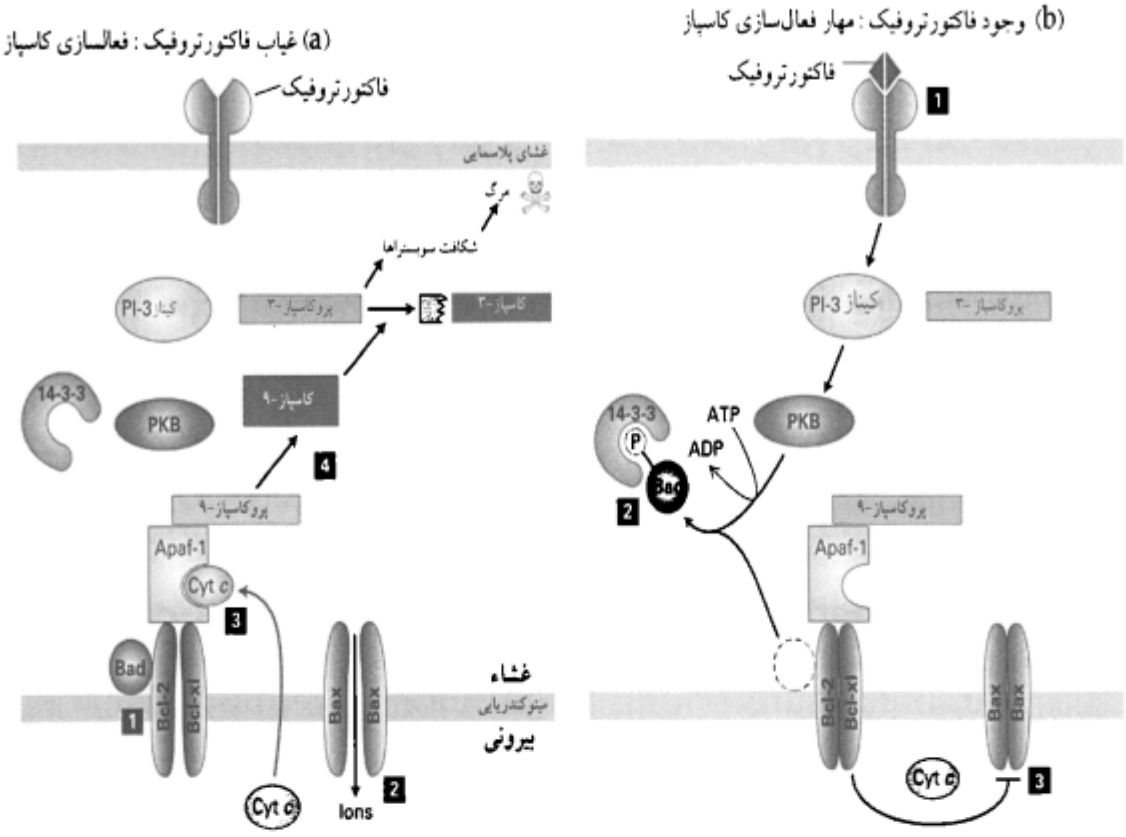
▲ **شکل ۴۰-۲۱ تجمع آپوپتوزوم پستانداری** در غیاب آغازگر آپوپتوز، Apaf-1 در سیتوزول بصورت یک مونومر غیرفعال متصل به dATP موجود است. Apaf-1 دارای چندین تکرار WD40 (دُمین متصل‌شونده به dATP) و یک دُمین CARD است. مرحله ❶: وقتی که آپوپتوزیس شروع می‌شود، آسیب به میتوکندریها اجازه رهایی سیتوکروم c را می‌دهد که به Apaf-1 متصل می‌شود. این میانکنش منجر به هیدرولیز dATP متصل به dADPمی‌شود و تغییری را در ساختار Apaf-1 به وجود می‌آورد. مرحله ❷: در ساختار گسترده Apaf-1، این پروتئین به یک کمپلکس هفت زیرواحدی مجتمع می‌شود. (آپوپتوزوم) مرحله ❸: میانکنش آپوپتوزوم با ۹ پروکاسپاز آغازگر خودشکافتی و دیمریزه شدن این پروکاسپاز را شروع می‌کند که برای فعالیتش ضروری است. کاسپاز ۹ فعال بر روی کاسپازهای اثرگذاری مانند کاسپاز - ۳ عمل می‌کند. اگر چه عمل‌های دقیق آنها شناخته نشده است پروتئین‌های مهارگر آپوپتوز (IAPها) نیز به آپوپتوزوم متصل می‌شوند.

که **آپوپتوزم**[1] (شکل ۴۰-۲۱) نامیده می‌شود. آپوپتوزوم بصورت ماشین فعال‌سازی برای کاسپازی‌های آغازگر و اثرگذار عمل می‌کند.

برخی از فاکتورهای تروفیک غیرفعال‌سازی تنظیم‌گر پروآپوپتوزی را القاء می‌کنند.

ما قبلاً دیدیم که نوتروفین‌هایی مانند فاکتور رشد عصبی، نورون‌ها را از مرگ سلولی محافظت می‌کنند. در غیاب فاکتورهای تروفیک، نوع فسفریله شده پروتئین پروآپوپتوزی Bad به Bcl2/Bcl-x1 در غشاء میتوکندریایی متصل می‌شود (شکل ۴۱-۲۱). اتصال Bad عملکرد ضد آپوپتوزی Bcl2/Bcl-xl را مهارمی‌کند و بنابراین مرگ سلولی را شروع می‌کند. Bad فسفریله شده نمی‌تواند به Bcl-2/Bcl-xl متصل شود و در سیتوزول بصورت کمپلکس با پروتئین ۳-۳-۱۴ متصل شونده به فسفوسرین یافت می‌شود. از این رو، مسیر پیام‌رسانی که منجر به فسفریله‌شدن Bad می‌گردد، کاندید خوبی برای انتقال پیام‌های بقاء خواهد بود. شماری از فاکتورهای تروفیک شامل NGF نشان‌داده شده است که مسیر پیام‌رسانی PI-3 کیناز را شروع می‌کنند که منجر به فعال‌سازی پروتئین کیناز B می‌گردد (شکل ۳۰-۱۶ را ملاحظه کنید) پروتئین کیناز B فعال شده Bad را در جایگاههای شناخته‌شده‌ای به منظور مهار فعالیت پروآپوپتوزی آن فسفریله می‌کند. بعلاوه یک نوع فعال پروتئین کیناز B می‌تواند مانع از آپوپتوز و مرگ نورون‌های محروم از نوتروفین شود. این یافته‌ها مکانیسم عمل بقای فاکتورهای تروفیک را حمایت می‌کند که در شکل ۴۱-۲۱ ترسیم شده‌اند. در سایر انواع سلولی، فاکتور تروفیک متفاوت ممکن است بقای سلولی را از طریق تغییرات پس از ترجمه سایر ترکیبات و اجزای ماشین مرگ سلولی شروع کند. مکانیسم دیگری که توسط آن نوتروفین‌ها می‌توانند آپوپتوز را تحت تاثیر قرار دهند (در این زمان به طور مثبت) شامل $p75^{NTR}$ است که گیرنده نوتروفین با تمایل پائین است و در بالا

1 - Apoptosome



▲ **شکل ۴۱-۲۱ مسیرهای داخل سلولی پیشنهادی، منجر به مرگ سلولی توسط آپوپتوز یا باعث بقاء سلولی واسطه شده توسط فاکتور تروفیک در سلول‌های پستاندار می‌شود.** (a) در غیاب فاکتور تروفیک پروتئین پروآپوپتوزی محلول Bad به پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک Bcl-2 و Bcl-xl متصل می‌شود که به غشای میتوکندری وارد شده‌اند. ❶ اتصال Bad مانع میانکنش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی با Bax که یک پروتئین پروآپوپتوزی متصل به غشاء است، می‌شود. در نتیجه Bax کانالهای هوموالیگومری را در غشاء به وجود می‌آورد که جریان یونی را باعث می‌شوند ❷. از طریق یک مکانیسم ناشناخته این جریان یونی منجر به رهایی سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌گردد که در آنجا به یک پروتئین وفق دهنده Apaf-1 متصل می‌شود ❸. شروع آبشار کاسپازی که منجر به مرگ سلولی می‌شود ❹. (b) در برخی از سلول‌ها اتصال فاکتور تروفیک مانند NGF ❶ فعالیت PI-3 کینازی را تخریب می‌کند که منجر به فعال‌سازی پائین دستی پروتئین کیناز B(PKB) می‌شود که Bad را فسفریله می‌کند. سپس Bad فسفریله شده با پروتئین ۳-۳-۱۴ کمپلکس تشکیل می‌دهد ❷. با وجود Bad جداشده در سیتوزول پروتئین‌های ضد آپوپتوزی Bcl-2/Bcl-xl می‌توانند فعالیت Bax ❸ را مهار کنند. بدانجهت مانع از رهایی سیتوکروم c و فعال‌سازی آبشار کاسپازی می‌شوند.

شرح داده شده است. این پروتئین آپوپتوز را هم می‌تواند مهار و هم شروع کند که این امر بستگی به زمینه سلولی دارد. در نورونهای خاص پیام‌های نوتروفین مانند BDNF آپوپتوز را از طریق $p75^{NTR}$ تحریک می‌کند. در این نورون‌ها، شکافت $p75^{NTR}$ توسط یک پروتئاز متصل به غشاء که (که گاما - سکرتاز نامیده می‌شود) دُمین داخل سلولی گیرنده را رها می‌کند که به یک پروتئین متصل‌شونده به DNA که NRIF نامیده می‌شود متصل می‌شود. شکافت $p75^{NTR}$ منجر به یوبی کوئیتینه شدن NRIF و حرکت آن به طرف هسته می‌شود و در آنجا آپوپتوز را و شاید رونویسی را تحریک می‌کند. گاما سکرتاز همان پروتئازی است که شکافت داخل غشایی گیرنده نوتج را کاتالیز می‌کند و بنابراین آن را فعال می‌سازد و همچنین پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) را که در ایجاد بیماری‌آلزایمر نقش دارد، فعال می‌سازد (شکل‌های ۳۶-۱۶ و ۳۷-۱۶ را ملاحظه کنید).

فاکتور نکروز توموری و پیام‌های مرگ مرتبط با آن، مرگ سلولی را توسط فعال‌سازی کاسپازها شروع می‌کنند.

اگر چه مرگ سلولی می‌تواند در غیاب فاکتورهای زیست (بقاء) ایجاد شود، آپوپتوز همچنین می‌تواند توسط پیام‌های مرگ نیز تحریک شود. برای مثال فاکتور نکروز توموری (TNF) که توسط ماکروفاژها رها شده و مرگ سلولی و تخریب بافتی مشاهده شده در بیماریهای التهابی مزمن خاص را باعث می‌شود (فصل ۲۴).

پیام القاکننده مرگ دیگر، لیگاند (Fas) یک پروتئین سطحی است که توسط سلول‌های کشنده طبیعی فعال شده و همچنین لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک تولید می‌شود. این پیام می‌تواند مرگ سلول‌های عفونی شده با ویروس، برخی از سلول‌های توموری و سلول‌های پیوندشده خارجی را شروع کند.

هر دو لیگاند TNF و Fas از طریق گیرنده‌های مرگ در سطح سلول عمل می‌کنند که یک دُمین گذرنده از غشاء دارند و وقتی که اتصال لیگاند سه مولکول گیرنده را به نزدیکی یکدیگر می‌آورد شروع می‌شود. کمپلکس سه‌تایی گیرنده پروتئینی را که FADD[1] (دُمین مرگ مرتبط باFas) نام دارد به طرف خود می‌کشد که بعنوان یک وفق دهنده به منظور فراخوانی و فعال‌سازی کاسپاز ۸ (یک کاسپاز آغازگر) در سلول‌های دریافت‌کننده پیام مرگ عمل می‌کند. دُمین مرگ یافت‌شده در FADD توالی اسید آمینه‌ای هست که در بیشماری از پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز وجود دارد. زمانی که کاسپاز ۸ فعال شد، سایر کاسپازها را فعال می‌کند و آبشار تشدیدی شروع می‌شود. به منظور آزمایش توانایی گیرنده Fas برای القاء مرگ سلولی، محققان سلول‌ها را با آنتی‌بادی‌هایی بر علیه گیرنده Fas انکوبه کردند. این آنتی‌بادی‌ها به گیرنده Fas متصل شده و با آن ارتباط متقابل می‌دهند و مرگ سلولی را تحریک می‌کنند که این امر حاکی از فعال‌سازی گیرنده Fas است که برای شروع آپوپتوز کافی است.

نکات کلیدی بخش ۵-۲۱

مرگ سلولی و تنظیم آن

■ همه سلول‌ها برای جلوگیری از آپوپتوز و زنده ماندن نیاز به فاکتورهای تروفیک دارند. در غیاب این فاکتورها، سلول‌ها خودکشی می‌کنند.

■ مطالعات ژنتیکی در کرم الگانس یک مسیر آپوپتوزی حفظ شده تکاملی را با سه جزء تعیین کرد: پروتئین‌های تنظیمی متصل به غشاء، پروتئین‌های تنظیمی سیتوزولی و پروتئازهای اثرگذار که در مهره‌داران کاسپاز نامیده می‌شوند (شکل ۳۷-۲۱ را ملاحظه نمائید).

■ زمانی که پروتئازهای آپوپتوزی فعال می‌شوند سوبستراهای درون سلولی خاصی می‌شکنند که این امر منجر به مرگ سلول می‌شود. پروتئین‌هایی (مانند CED-4 و Apaf1) که به پروتئین‌های تنظیمی و کاسپازها متصل می‌شوند. برای فعال‌سازی کاسپاز لازم هستند (اشکال ۳۹-۲۱ و ۴۰-۲۱ را ملاحظه کنید).

■ پروتئین‌های تنظیمی پروآپوپتوزی (مانند Bax و Bad) فعال‌سازی کاسپاز را شروع می‌کنند و تنظیم‌کننده‌های آنتی آپوپتوزی (مانند Bcl-2) فعال‌سازی را مهار می‌کنند. میانکنش‌های مستقیم بین پروتئین‌های پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی منجر به مرگ سلولی در غیاب فاکتورهای تروفیک می‌شوند. اتصال فاکتورهای تروفیک خارج سلولی می‌تواند تغییراتی را در این میانکنش‌ها ایجاد کند که نتیجه آن بقاء سلول است.

■ خانواده Bcl-2 دارای هم پروتئین‌های پروآپوپتوزی و هم پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی است؛ همه آنها پروتئین‌های یکبار گذرنده از غشاء هستند و در میانکنش‌های پروتئین - پروتئین به کار می‌روند. مولکول‌های Bcl-2 جلوی رهایی سیتوکروم C از میتوکندریها را می‌گیرند و مرگ سلولی را مهار می‌کنند در حالی که فاکتورهای پروآپوپتوزی شکست غشاء را تحریک می‌کنند که اجازه رهایی سیتوکروم C و اتصال آن به Apaf-1) را می‌دهند و بنابراین کاسپازها را فعال می‌کنند.

■ اتصال پیام‌های مرگ خارج سلولی (مانند فاکتور نکروز توموری و لیگاند Fas) به گیرنده‌هایشان یک پروتئین مرتبط را فعال می‌کند (FADD) که آبشار کاسپازی را که منجر به مرگ سلولی می‌شود را شروع می‌کند.

چشم‌اندازی به آینده

تولد، رده‌بندی و مرگ سلولی در قلب تکوین، رشد و سلامتی یک موجود زنده قرار می‌گیرد که برای فرآیندهای بیماری نیز اساسی هستند. به نظر می‌رسد چندین تغییر شکل که نقش‌شان برجسته‌تر از ایجاد انواع سلولی در طی تکوین است. در شروع رده‌بندی با یک تخم لقاح‌یافته، یک کره ۲۰۰ میکرومتری در " plain vanilla" تولید نورون‌هایی با طول زیاد سلول‌های ماهیچه‌ای چندهسته‌ای ضربان‌دار، سلول‌های شبکیه حساس به نور، ماکروفاژهایی که اجسام را شناسایی کرده و می‌بلعند و همه صدها نوع سلول دیگر را می‌کند. تنظیم‌کننده‌های رده‌بندی سلولی این تنوع را توسط دو تصمیم اساسی، ایجاد می‌کنند (۱) چه زمانی و کجا چرخه سلولی فعال شود (فصل ۲۰) و (۲) آیا دو سلول

1 - Fas -associated death domain

دختری مانند هم یا متفاوت از هم خواهند بود. یک سلول ممکن است شبیه سلول والدش باشد یا ممکن است وارد مسیر جدیدی شود.

تولد سلول به طور طبیعی و با دقت در زمان‌ها و محلهای خاص مانند لایه قاعده‌ای پوست یا مریستم ریشه، محدود می‌شود. کبد وقتی که آسیب می‌بیند، تجدید می‌شود ولی جلوی سرطان کبد توسط ممانعت از رشد غیر ضروری در سایر زمان‌ها گرفته می‌شود. رده‌بندی سلولی توسط توزیع نامتقارن تنظیم کننده‌های کلیدی به سلول‌های دختری حاصل از یک تقسیم به وجود می‌آید. برخی از این تنظیم کننده‌ها درون سلول والدی هستند و به طور نامتقارن در طی قطبی شدن سلول توزیع می‌شوند. تنظیم کننده‌های دیگر، پیام‌های خارجی هستند که به طور متفاوتی به سلول‌های دختری می‌رسند. نامتقارنی سلول‌ها باعث نامتقارنی بافت‌ها و در نهایت کل موجودات زنده می‌شود. دست‌های راست و چپ ما فقط در نتیجه نامتقارنی سلولی از هم فرق می‌کنند.

برخی از سلول‌ها در تمام دوره حیات موجود زنده دوام می‌آورند، ولی سایر سلول‌ها مانند سلول‌های خونی و روده‌ای به سرعت تعویض می‌شوند. بسیاری ازسلول‌ها برای مدتی زنده می‌مانند و سپس به صورت برنامه‌دار می‌میرند و با سایر سلول‌های حاصل از یک جمعیت سلول بنیادی جایگزین می‌شوند. مرگ برنامه‌دار سلولی همچنین، برای حذف دقیق سلول‌های آسیب زننده مانند سلول‌های ایمنی خود واکنش‌گر می‌شود که به سلول‌های بدن حمله می‌کنند یا باعث حذف نورون‌هایی می‌شود که به طور مناسبی ارتباط برقرار نکرده‌اند. برنامه‌های مرگ سلولی برای دفاع در مقابل عفونت نیز به کار می‌روند و سلول‌های آلوده شده به طور انتخابی در پاسخ به پیام‌های مرگ می‌میرند. ویروس‌ها تلاش‌های دفاعی سلول‌های میزبان را بی‌اثر می‌کنند. برای مثال p53 فاکتور رونویسی است که آسیب و استرس‌های سلولی را حس می‌کند و رونویسی اعضای پروآپوپتوزی از خانواده ژنی bcl-2 رافعال می‌کند که توسط پروتئین E1B آدنوویروسی مهار می‌شود. برآورد شده است که در حدود یک سوم از ژنوم آدنوویروس برای غلبه بر دفاع میزبان طراحی شده است. مرگ سلولی مرتبط با مواد شیمیایی سمی و همچنین عفونت‌های ویروسی است. بد شکلی‌هایی به جهت وجود سموم اغلب از آپوپتوز اضافی منشاء می‌گیرند. نقص مرگ برنامه‌دار سلولی می‌تواند منجربه رشد سرطانی کنترل نشده، شود (فصل ۲۵). پروتئین‌هایی که مانع از مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند، هدف‌هایی برای داروها هستند. یک تومور ممکن است دارای ترکیبی از سلول‌ها باشد که برخی از آنها توانایی شروع تومورهای جدید یا رشد کنترل نشده ادامه دار را دارند و برخی فقط توانایی رشد در مکان یا زمان محدودی را دارند. بعبارتی، تومور دارای سلول‌های بنیادی خودش است و آنها بایستی یافت شده و مورد مطالعه قرار گیرند، چنانکه آنها به درمان پزشکی مقاوم می‌شوند. یک گزینه دستکاری مسیر مرگ سلولی توسط فرستادن پیامهایی است که باعث می‌شوند که سلول‌های سرطانی خودشان را از بین ببرند.

اکنون توجه بیشتر به تنظیم سلول‌های بنیادی به منظور تلاش برای فهم اینکه چگونه جمعیت‌های سلولی به وجود آمده و حفظ می‌شوند، معطوف شده است. این امر در ترمیم بافت‌ها دخالت بارزی دارد: برای مثال، به منظور تجدید چشم‌های آسیب دیده، غضروف پاره شده، بافت مغزی تحلیل رفته یا اندامهای ناقص به کار می‌رود. یک امکان جالب توجه این است که برخی از جمعیت‌های سلول‌های بنیادی با توانایی ایجاد و تحلیل یافتی به طور طبیعی توسط مرگ سلولی در طی مراحل بعدی تکوین حذف می‌شوند. اگر چنین باشد، روش یافت شده به طور انتخابی مرگ این سلول‌ها را که می‌توانند باعث تجدید شوند را بلوکه می‌کنند. آیا حذف چنین سلول‌هایی در طی تکوین پستانداران می‌تواند در بین یک دوزیست دارای توانایی تجدید عضو و یک پستاندار که این عمل را نمی‌تواند انجام دهد، تفاوت ایجاد کند؟

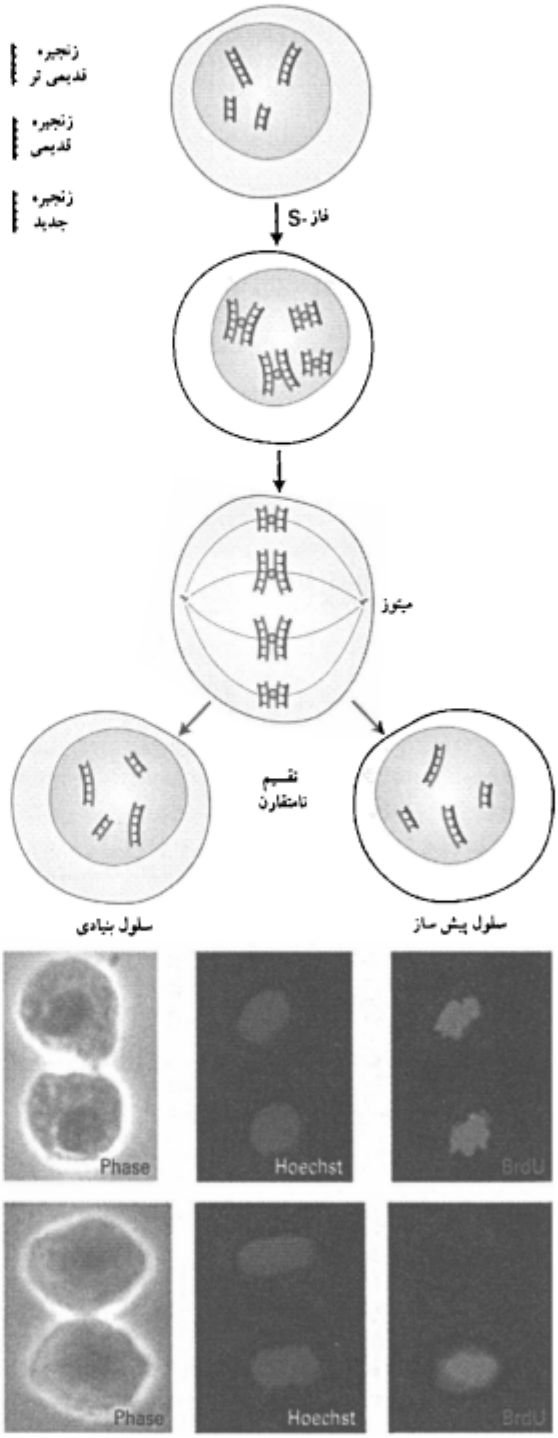
تجزیه و تحلیل داده‌ها

فرضیه زنجیره نامیرا می‌گوید وقتی که یک سلول بنیادی به طور نامتقارن برای ایجاد یک سلول بنیادی جدید و یک سلول پیش ساز تقسیم می‌شود. سلول بنیادی جدید کروماتیدهای خواهری دارای زنجیره قدیمی DNA است (زنجیره نامیرا). سلول دختری دیگر که سلول پیش ساز است و سرانجام باعث ایجاد سلول‌های تمایز یافته می‌شود کروماتیدهای خواهری دارای زنجیره‌های جدید DNA را دریافت می‌کند (دیاگرام زیر را ملاحظه کنید). اگر مکانیسم زنجیره نامیرا واقعاً انجام شود، آن مانع از تجمع جهش در سلول‌های بنیادی بالغ خواهد شد که در هر دو راز همانند سازی DNA اتفاق می‌افتد.

سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه‌ای پیش‌سازهای میوبلاست‌ها هستند و منبع سلول‌هایی هستند که از رشد ماهیچه بعد از تولد و

تعمیر ماهیچه بعد از آسیب حاصل می‌شوند. سلول‌های ماهواره‌ای می‌توانند خودشان را تجدید و احیا کنند که حاکی از این امر است که آنها خصوصیات سلول‌های بنیادی را نیز دارند. برای آزمایش فرضیه زنجیره نامیرا، محققان اخیراً مطالعات زیر را انجام داده‌اند.

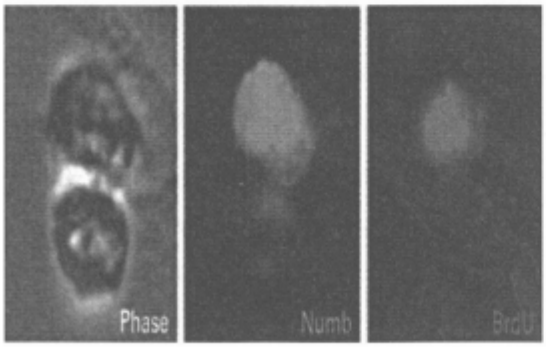
سلول‌های ماهواره‌ای را از فیبرهای ماهیچه‌ای موش جداسازی شده و در in vitro در حضور BrdU (یک مشتق نوکلئوتیدی که در طی همانند سازی DNA در ساختار آن وارد می‌شود) کشت دادند.



a) بعد ازچهار روز در محیط دارای BrdU، همه سلول‌های ماهواره‌ای به شدت با BrdU نشاندار شدند (ضربه)، همانطور که انتظار می‌رفت اگر این سلول‌ها بطور متقارن تقسیم می‌شدند، سپس سلول‌ها به مدت ۱۸ ساعت در غیاب BrdU (تعقیب) (زمانی که معادل تقریباً دو تقسیم سلولی در این سلول‌ها است) انکوبه شدند. تصاویر زیر دو مثال از سلول‌های ماهواره‌ای متحمل تقسیم را بعد از ۱۸ ساعت انکوبه شدن در غیاب BrdU نشان می‌دهند. رنگ آبی (هوخست) کل DNA را نشان می‌دهد. رنگ قرمز جایی را که DNA نشاندار با BrdU در ژن قرار گرفته است را نشان می‌دهد.

عمده سلول‌ها مانند سلول در حال تقسیم در قسمت بالای شکل به نظر می‌رسند وی در حدود ۱/۵ درصد از سلول‌های در حال تقسیم مانند قسمت پایین شکل به‌نظر می‌رسند. شما می‌توانید این مشاهدات را توجیه کنید؟ با موش‌هایی که ۴۰ کروموزوم دارند (این تقسیم کروماتیدهای خواهر نشاندار با BrdU می‌توانست انجام شود) قسمت پایین شکل مشاهده شد آیا این امر به طور شانسی اتفاق افتاده است؟

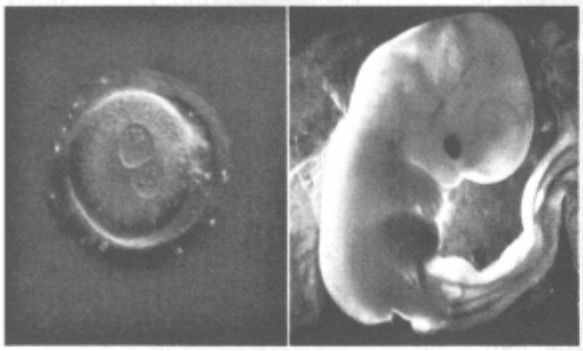
b) سلول‌های ماهواره‌ای مورد آزمایش ضربه و تعقیب مشابه با قسمت a قرار گرفته و سپس برای تولید Numb (پروتئینی که حضور و عدم حضور آن به سلول‌های دختری اجازه می‌دهد که سرنوشت‌های تکوینی متفاوتی را قبول کنند) مورد ارزیابی واقع شدند. عکس‌های زیر یک سلول در حال تقسیم رنگ‌آمیزی شده برای Numb (قرمز) و DNA (سبز) دارای BrdU را نشان می‌دهد. شما چه انتظاری از نتیجه سلولی دختری دارید که Numb دریافت کرده است؟ شما چگونه بایستی تعیین کنید Numb در ایجاد زنجیره‌های DNAی قدیمی‌تر نقش دارد؟



c) فرض کنید شما یک آزمایش ضربه و تعقیب را با استفاده از یک رده سلولی انجام دادید تقسیم سلولی مشابه با قسمت پایینی شکل (a) مشاهده نشد، این نتیجه را توجیه کنید.

فصل ۲۲

زیست‌شناسی سلولی و مولکولی تکوین



از یک تک سلولی تا جنین انسان ۲۰۰ ساعت بعد از لقاح تخمک انسان، پیش هسته‌های نر و ماده با هم ادغام شده و اطلاعات ژنتیکی از مادر و پدر با هم ترکیب می‌شود. ۴۶ روز بعد جنین ۲ سانتی‌متری، شروع به تکوین اندام‌ها و بافت‌ها نموده که با خون ورودی توسط بندناف تغذیه می‌شود.

رئوس مطالب

۲۲.۱. مهم‌ترین رویدادهای تکوین

۲۲.۲. گامتوژنز و لقاح

۲۲.۳. تنوع سلولی و الگوبندی در جنین‌های اولیه مهره‌داران

۲۲.۴. کنترل بندبندی شدن بدن: موضوعات و تنوعات در حشرات و پستانداران

۲۲.۵. تشخیص نوع سلول در تکوین عصبی اولیه

۲۲.۶. رشد و الگوبندی اعضاء

در **تکوین جنین**[1]، ژن‌ها، پروتئین‌ها و سلول‌هایی که در سیستم پیچیدهٔ جنین‌زایی عمل می‌کنند، مهم می‌باشند. پیام‌ها در داخل و بین سلول‌ها جریان می‌یابند و بیان طیف وسیعی از ژن‌ها اجازه تشکیل هزاران نوع سلول در اشکال مختلف را می‌دهند (فصول ۷، ۱۵ و ۱۶). همان گونه که در فصل ۲۰ توصیف شد، برای جنین‌زایی طبیعی، چرخه سلولی بایستی تنظیم شود، تا رشد و تقسیم سلول در زمان و مکان مناسب اتفاق بیافتد؛ دودمان‌های سلولی مانند آنهایی که در فصل ۲۱ توصیف شدند باید در فضا و زمان مناسب سازماندهی شده باشند. مکانیسم‌های توصیف شده در فصول ۱۹ـ۱۷ باید سلول‌ها را به بافت‌ها، اندام‌ها و کل بدن سازماندهی کنند؛ و مرگ سلولی (فصل ۲۱) باید برنامه‌ریزی شده باشد تا پرده‌های بین انگشتان (نه خود انگشتان) برداشته شوند.

در این فصل ما تنظیم مراحل اولیه جنین جانوران را برای مشاهدهٔ مکانیسم‌های تکوینی در بافت بررسی می‌کنیم. ما بر روی حشرات و پستانداران تمرکز می‌کنیم و مثال‌هایی از بقیهٔ گونه‌های جانوری به علاوه گیاهان ذکر می‌کنیم. بعد از یک خلاصه مختصر از تکوین اولیه، توضیح می‌دهیم که چطور تخمک و اسپرم شکل می‌گیرند، لقاح چگونه رخ می‌دهد و خواص ژنتیکی ویژه سلول‌های اولیه پستانداران را شرح می‌دهیم. سپس نگاهی به تقسیمات اولیه سلولی در تکوین پستانداران و ایجاد لایه‌های مختلف بافت می‌اندازیم. شکل‌گیری قطعات تکراری در جنین حیوانات و ژن‌هایی که سرانجام باعث می‌شوند که آن قطعات تغییر یابند، بعداً بحث می‌شوند. ما همچنین به طور ویژه چندین جنبهٔ اطلاعاتی از تکوین بعدی حیوانات، شامل شکل‌گیری نامتقارن قسمت راست ـ چپ بدن، کنترل سرنوشت سلول‌ها در سیستم عصبی اولیه و الگوی اندام‌ها (دست و پا) را آزمایش نمودیم. همچنین موضوعات وسیعی را پوشش دادیم و خواهیم دید که چگونه روش‌های آزمایشگاهی (ردیابی دودمانی، غربال‌های ژنتیکی، حیوانات موزائیک) دستکاری

1- Embryogenesis

پروتئین‌های پیام‌رسان و پیوند ـ برای کشف و تجزیه و تحلیل رویدادهای ساختمان حیوانات استفاده می‌شود.

بیائید با تفکر دربارهٔ موقعیت ساده‌ای که سلول‌ها از طریق تقسیم سلولی ایجاد می‌شوند، اما همهٔ سلول‌ها یکسان هستند، شروع کنیم. برای ایجاد بافت‌های عمل کننده، هر سلول باید کار خود را انجام دهد. بعضی‌ها شاید تقسیم شوند، بعضی خم شوند و بعضی به خارج پیام بفرستند. هر سلول تا حدی باید درباره موقعیت و سرنوشت خود بیاموزد و به درستی شروع به تمایز نماید. **تمایز**[1]، ممکن است باعث فعال‌سازی ژن‌های صحیح، تولید پروتئین‌های ویژه، افزایش یا کاهش تقسیم سلول، تغییرشکل، تغییر پروتئین‌های سطحی و اتصال به دیگر سلول‌ها، آزادسازی پیام‌های ترشحی، کسب فعالیت الکتریکی، قطبی شدن در یک یا چند محور، مهاجرت و یا ترکیب چند تا از این موارد شود. اشتباه در هر جنبه از تمایز اولیه سلولی تکوین می‌تواند برای ارگانیسم کشنده باشد. جذابیت زیست‌شناسی سلولی تکوینی در کشف این که چگونه سیستم‌های پیچیده تکوینی کار می‌کنند و چرا با وجود تنوعات در محیط، ژن‌های به ارث رسیده، تعداد سلول‌ها و تغذیه این سیستم‌ها همچنان با موفقیت عمل می‌کنند. در این زمان، این رشته راهی جدید برای توضیح تکامل و منشأ انسان: (چگونه جانوران شکل می‌گیرند، گونه‌ها به وجود می‌آیند و تغییر می‌یابند) پیشنهاد می‌کند. علاوه بر این اغلب بیماری‌ها در زمینهٔ تکوین طبیعی و انحراف ژنوم سریع‌تر شناخته می‌شوند در حقیقت همهٔ این بیماری‌ها با یک سلول آغاز می‌شود.

۲۲-۱ مهم‌ترین رویدادهای تکوینی

موجودات تک‌سلولی چرخه زندگی تکوین پیچیده‌ای را طی می‌کنند که می‌تواند شکل و رفتارشان را به صورت شگفت‌انگیزی تغییر دهد. یک مثال چرخه زندگی پلاسمودیوم مالاریا است که در فصل (۱) بحث شد (شکل ۴ـ۱). در این فصل ما بر روی تکوین حیوانات پُرسلولی تمرکز می‌کنیم. مراحل اولیه تکوین حیوانات چندین هدف اساسی دارد که عبارتند از: تکوین ژنوم پدری و مادری در موجود جدید؛ افزایش در تعداد سلول‌ها؛ شکل‌گیری سه لایه سلولی؛ اولین مرحله در ایجاد سلول متمایز و انواع بافت‌ها و آشکارکردن سازماندهی اصلی جنین ـ از سمت جلو به عقب، سر به دم و چپ به راست.

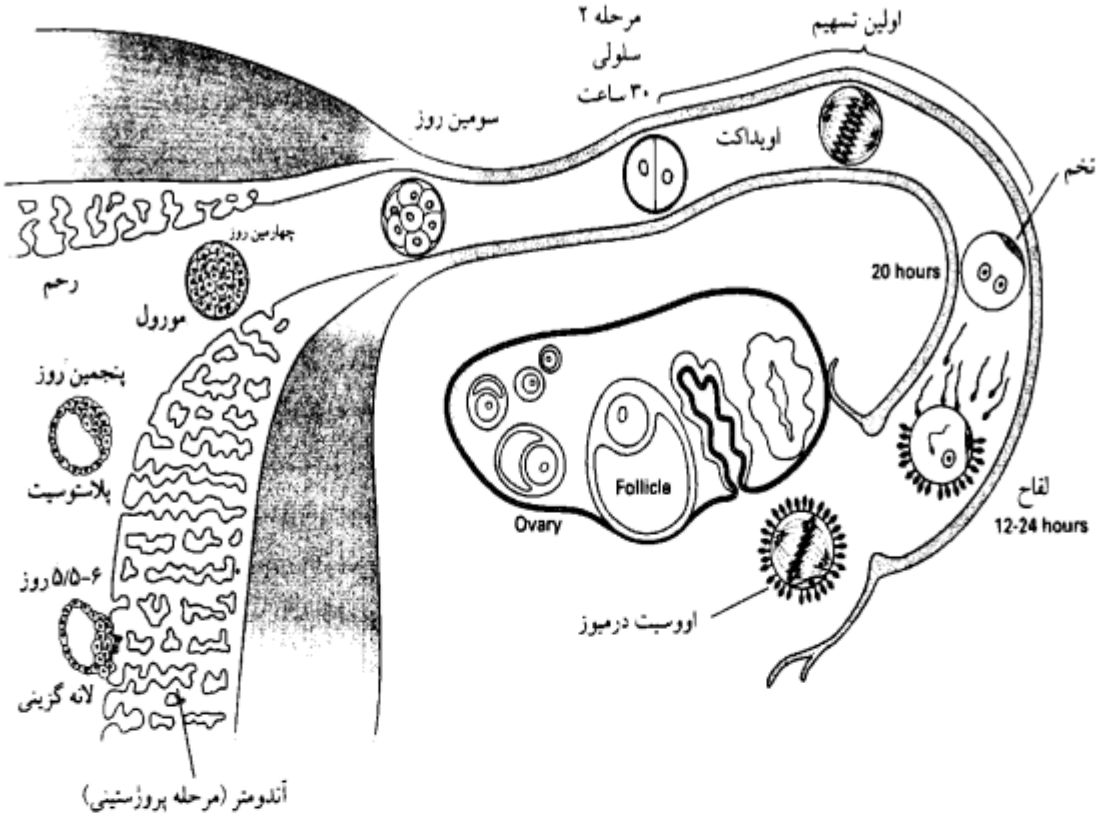
پیشرفت تکوین از تخمک و اسپرم به جنین اولیه

تکوین موجود جدید با ادغام **گامت‌های**[2] نر و ماده شروع می‌شود، یک تخمک (اووسیت) ناقل مجموعه‌ای از کروموزم‌های مادر و یک اسپرم حاوی مجموعه‌ای از کروموزوم‌های پدر است. گامت‌ها یا سلول‌های جنسی، چون **میوز**[3] انجام می‌دهند، **هاپلوئید**[4] بوده و بنابراین تنها حامل یک مجموعهٔ کروموزومی هستند (شکل ۵ـ۳). آنها طی فرآیندی که لقاح نامیده می‌شود، ترکیب شده، سلول منفرد آغازی، (**تخم**[5]) را ایجاد می‌کنند که دو مجموعه کروموزومی (یکی مادری و دیگری پدری) دارد و در نتیجه **دیپلوئید**[6] است. تخم طی پروسه‌ای که **تسهیم**[7] نامیده می‌شود شروع به تقسیم می‌کند و تولید توده‌ای سلول که اغلب شبیه به هم به نظر می‌آیند، می‌کند (شکل ۱ـ۲۲). زاده‌های حاصل از این سلول‌های آغازی به طور آهسته متمایز می‌شود و همه بافت‌ها و اندام‌ها ایجاد می‌شوند.

در اوایل جنین‌زایی سلول‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: **سلول‌های لایه زایا**[8] که گامت‌ها را ایجاد می‌کنند و **سلول‌های سوماتیک**[9] که بیشتر بدن را ایجاد می‌کنند اما به نسل بعد نمی‌رسند. **سلول‌های لایه زایا** ناقلین تغییرات ژنتیکی‌اند، در بعضی موارد ناقل حالات بیماری ارثی نیز هستند، اما تغییری که در DNAی سلول‌های سوماتیکی اتفاق می‌افتد، به نسل بعد انتقال نمی‌یابد. به منظور اینکه موجود زنده بتواند تکوین یابد، جنین باید **قطبی**[10] شود. یعنی این که یک سلول در یک جهت (چپ ـ راست، سر ـ دم یا جلو ـ عقب) باید متفاوت از سلول در جهت دیگر رفتار کند. اطلاعات قطبیت شاید به شکل پروتئین‌ها یا مولکول‌هایی در تخمک و یا در محلی در تخمک که اسپرم وارد می‌شود مربوط باشد که می‌تواند باعث تغییرات موضعی که فرآیند قطبی شدن را شروع می‌کنند، بشود. منحصراً عدم تقارن تصادفی جنین اولیه ممکن است به عنوان قطبیت نهایی جنین تثبیت شود.

برای ایجاد لایه‌های بافتی اولیه، صفحه‌های سلولی تا خورده و بعضی سلول‌ها به سمت داخل می‌روند که این مرحله **گاسترولاسیون**[11] نامیده می‌شود. جنین بیشتر سه بعدی شده و شامل **سه لایه زایا**[12] می‌شود، اکتودرم (پوسته خارجی) مزودرم (پوسته میانی) و آندودرم (پوسته داخلی). اگرچه مفهوم سه لایه زاینده مختصرسازی یک حقیقت پیچیده است، که باعث ایجاد بافت‌های

1- Differentiation
2- Gamets
3- Mioss
4- Haploid
5- Zygote
6- Diploid
7- Cleavage
8- Germ-linc cells
9- Someatic
10- Polarized
11- Gastrulation
12- Germ Layers



▲ **شکل ۱-۲۲. مراحل اولیه تکوین انسان** این تصویر، لقاح، تسهیم (تقسیم سلول) و لانه‌گزینی در بافت اویداکت و رحم، جایی که این رویدادها رخ می‌دهد را ترسیم می‌کند. زمانبندی بعد از آزادسازی تخمک از تخمدان براساس ساعت یا روز می‌باشد.

ویژه و ساختارهایی می‌شود، حتی در حیوانات نسبتاً پیچیده، بنابراین اصطلاحات دارای ارزش کافی برای پافشاری دارند (شکل ۳-۲۱). حرکات سلولی که سه لایه زایا ایجاد می‌کنند نیاز دارند که خواص سطحی سلول تغییر کند تا اتصالات بین سلول‌ها شل شده و یا محکم شوند. سلول‌های جنینی اولیه می‌توانند یا شکل توده‌های قابل انتقال به هم پیوسته که به عنوان **مزانشیم**[1] طبقه‌بندی می‌شوند و یا صفحه‌هایی که **اپی‌تلیا**[2] نامیده می‌شوند، تشکیل دهند. در مرحلهٔ تکوین، سلول‌ها بین این دو حالت در حالت رفت و برگشت هستند. اپی‌تلیا معمولاً قطبی هست و یک جهت، صفحه قاعده‌ای و جهت دیگر به عنوان رأسی توصیف می‌شود. در تکوین اولیه، سلول‌ها شروع به انتقال یا ایجاد پیام با استفاده از پروتئین‌های ترشحی که در فصول ۱۵ و ۱۲ بحث شدند، می‌کنند. برای این که پیام‌رسانی در سلول‌های ایجاد کننده‌مفید باشد، بعضی سلول‌ها باید پیام بسازند و بقیه باید به عنوان گیرنده عمل کنند. سلول‌هایی که حس دارند و به پیام پاسخ می‌دهند به عنوان سلول **شایسته**[3] توصیف می‌شوند. قطبی شدن اولیه جنین که سلول‌ها را از هم متمایز می‌نماید اجازه می‌دهد که بعضی از سلول‌ها، تولیدکننده و برخی دیگر دریافت کننده پیام شوند، در حالیکه بعضی سلول‌ها هم تولیدکننده و هم دریافت کننده پیام می‌شوند. **القاء**[4] فرآیندی است که بدان وسیله پیام فرستاده شده از یک سلول یا مجموعه سلولی سرنوشت سلول‌های دیگر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال، یک پیام ممکن است سلول‌های پیش‌ساز را به فرم بافت عصبی القاء کند.

سلول‌های جنینی به طور مداوم محیط موضعی خود را امتحان می‌کنند تا ببینند چگونه بیان‌های برنامه‌ریزی شدهٔ ژنتیکی خودشان را مطابقت دهند. غیاب یک پیام مورد انتظار و یا وجود یک پیام نامناسب می‌تواند باعث مرگ سلول، تقسیم، حرکت، تغییر هویت و یا تغییر شکل سلولی شود. یک پیام می‌تواند به سلول در مورد موقعیت آن در طول محور بدنی پشتی شکمی (پشت - جلو) اطلاع دهد، در حالی که دیگری به سلول در مورد موقعیت جلویی - عقبی (سر به دم) اطلاع دهد. پیام سوم در مورد آغاز میتوز می‌تواند به سلول اطلاع

1- Mesenchyme
2- Epithelia
3- Competent
4- In dvction

دهد. یک سلول می‌تواند چندین پیام را **ترکیب نموده**[۱] و همزمان به پیام‌های مختلف پاسخ دهد. در بعضی موارد، پاسخ نهایی سلول مجموعه ساده‌ای از پیام‌های چندگانه نخواهد بود. به جای آن، یک پیام ممکن است پاسخ سلولی به پیام دیگر را تغییر دهد. علاوه بر این برای پیام‌های موضعی، پیام‌هایی با فواصل طولانی مانند هورمون‌ها، می‌تواند به اغلب یا تمام قسمت‌های جانور در حال تکوین یا بالغ برسند و زمان رویدادها، تحریک رشد یا شروع تغییرات دیگر را هماهنگ کنند.

بعضی پیام‌های تکوینی بصورت وابسته به غلظت عمل می‌کنند. یعنی سلول‌های دریافت‌کننده در یک مسیر به سطوح بالای پیام و در مسیر دیگر به سطوح پائین پیام پاسخ می‌دهند. به طور کلی، سلول‌های نزدیک به منبع پیام در معرض سطوح بالا و سلول‌های دورتر از آن در معرض سطوح پیام پائین قرار می‌گیرند. بنابراین، موقعیت منبع، موقعیت سلولی که دارای گیرنده است و توانایی پیام برای حرکت از بافت، مکانی راکه پاسخ ویژه به پیام وابسته به غلظت رخ می‌دهد را هدایت می‌کند.

همچنانکه جنین تکوین پیدا می‌کند، لایه‌های سلولی بافت و اندام‌ها را می‌سازند.

زیست‌شناسی مولکولی مسیرهای تمایز سلول‌های منفرد به انواع متفاوت سلولی مثلاً شکل‌گیری کلیه یا پوست را بررسی می‌کند. اساس تمایز سلول، فعال شدن ژن‌های ویژه مانند ژن‌هایی که کراتین‌های متنوع، پروتئین‌های فیبری پوست، را رمز می‌کنند، می‌باشد. علاوه بر بیان افتراقی ژن که نوع سلولی را ایجاد و معین می‌کند، شکل‌گیری بافت و اندام‌ها به **آرایش**[۲] اختصاصی سلول‌ها وابسته است. برای مثال، سلول‌های حساس به نور باید در سطح شبکیه قرار بگیرند و سلول‌های ماهیچه‌ای باید سازماندهی شده باشند تا بتوانند عدسی را حرکت دهند و تصویر را روی شبکیه متمرکز کنند. بنابراین شکل‌گیری اندام‌ها و بافت‌ها وابسته به اتصالات بین سلولی حرکات و نظم دوباره سلول‌ها است. الگوی شاخه‌ای رگ‌های خونی و اتصالات اختصاصی بین اعصاب و ماهیچه‌ها ممکن است به دلیل ارتباط سلول‌های در حال تکوین باشد.

فرآیند تشکیل همهٔ قسمت‌های کارآمد بدن (قلب، کبد، کلیه، گنادها، شش‌ها و غیره) به عنوان **اندام‌زایی**[۳] شناخته می‌شود. اندام‌زایی اغلب شامل تاشدگی و پیچش لایه‌های سلولی است. اگر سلول‌های خط میانی پائینی، انتهای رأسی خود را منقبض نمایند در حالی که انتهای دیگر آنها در حال استراحت باشد، سلول‌های اپی‌تلیال خم می‌شوند. همچنین تغییرات هماهنگ در شکل اسکلت سلولی و سازماندهی آن، به عنوان پیام‌هایی در بین لایه‌های بافتی متفاوت ضروری هستند. سیستم گردش خون و قلب به طور معمول از آنجایی که باید اکسیژن زیاد به همهٔ سلول‌ها انتقال دهند، در ابتدا اندام‌زایی می‌شوند.

انواع مشخص سلولی از رده‌های مشخص، یک اندام را می‌سازند. پوست دارای اپی درم با منشاء اکتودرم است در حالیکه درمیس منشاء مزودرمی دارد. عدسی چشم از یک رده سلولی و شبکیه از رده دیگر به وجود می‌آید. اعضاء، از ماهیچه و استخوان و پوست و اعصاب تشکیل شده‌اند. پیام‌های بین بافت‌هایی با منشأ مختلف اجازه تشکیل ساختارهای مناسب در زمان و مکان درست را می‌دهند.

سازمان کل بافت‌ها، به عنوان **الگوبندی**[۴] شناخته می‌شود که اغلب نمای زیبایی جهان طبیعی مانند؛ گل‌ها، بال‌های پروانه، صورت‌ها، ماهی صخره مرجانی، رنگ‌های هشداردهنده، پوشش و شباهت خارجی را دربرمی‌گیرد. الگوهای تقارنی در حیوانات مشترک هستند: برای مثال دست چپ ما آینه دست راست ما است. الگوها اغلب شامل واحدهای تکراری مثل قطعات بدن یا مهره یا انگشت‌ها هستند. تنوعات تکراری اعمال متفاوتی مانند انگشتان شست قابل تقابل را اعطا می‌کنند. شکست تقارن، یا الگوبندی نامتقارن، برای تکوین خیلی از حیوانات مانند انسان اساسی است. برای مثال، قلب در حال رشد ما در یک مسیر مارپیچی ویژه برای شروع شکل‌گیری حفره‌های قلبی پیچ می‌خورد.

گرچه این فصل بر روی تکوین جنین متمرکز است، ولی تکوین بعد از تولد نوزادجانوران نیز ادامه می‌یابد. خیلی از بافت‌ها تا زمانی که به مرحلهٔ بلوغ می‌رسند، پیوسته رشد و تکوین می‌یابند. همان طور که در فصل ۲۱ بحث شده بعضی بافت‌ها مانند پوست، خون، هیپوکامپ (بخشی از مغز)، آستر روده و چشم ماهی به طور پیوسته حتی در زمان بلوغ یا بعد از آسیب ترمیم می‌شوند (مثل کبد). در خیلی از حیوانات، پیچیدگی‌های اکولوژیکی مانند تغییر شرایط یا مهاجرت باعث شروع **دگردیسی**[۵] می‌شوند. جنین حشرات، دگردیسی می‌یابند تا به لارو تبدیل شوند (جوان‌ها)، که بعداً برای بالغ شدن، نیز دگردیسی می‌یابند. ماهی آزاد برای سازگاری از آب شیرین به شور دگردیسی می‌یابد.

1- Integrate
2- Arrangment
3- Organogenesis
4- Pattern formation
5- metamorphosis

پیری همچنین می‌تواند به عنوان بخشی از فرآیند تکوین نگریسته شود. همچنانکه یک حیوان مسن می‌شود، انواع سلول‌ها، تغییرات فیزیولوژیک که زمینه تغییرات بافت و اندام است را می‌گذرانند. از آنجایی که پیری یک جنبهٔ ژنتیکی برنامه‌ریزی شده تکوین است، واضح است که بافت‌های مختلف در گونه‌های مختلف حیوانات با سرعت متفاوت پیر شوند. همچنین پیری قویاً می‌تواند با عوامل محیطی تحت تأثیر واقع شود. بنابراین در همه فرآیندهای تکوینی یک تأثیر متقابل بین ژن‌ها، تغذیه و تجربه وجود دارد.

ژن‌هایی که تکوین را تنظیم می‌کنند، قلب تکامل هستند

تکامل فرآیند تغییر اشکال و توانایی‌های موجودات زنده در نسل‌های متوالی می‌باشد. همچنین که امروزه دو انسان مشابه وجود ندارد (حتی دوقلوهای همسان مشابه نیستند)، اختلافات در درون همهٔ گروه‌های موجودات وجود دارد. گاهاً اختلاف موجب یک مزیت در تولیدمثل می‌باشد. در حقیقت فرآیندهای تکاملی توسط کشاورزان و دیگران هزاران سال برای انتخاب گیاهان و حیوانات با خواص مفید و آمیزش انتخابی آنها به کار گرفته شده است. برای مثال تغییرات وسیع در بین نژادهای سگ، نتیجهٔ انتخاب انسان شاید طی ۱۰ هزار تا ۲۰ هزار سال باشد. فسیل‌های ثبت شده نشان می‌دهند انتخاب طبیعی، که میلیون‌ها سال عمل کرده است، منجر به تغییرات بزرگ‌تری در تنوع بین سگ‌ها شده است. تغییرات آب و هوایی، جغرافیایی، موقعیت و حضور مخلوقات دیگر، نیچ‌های اکولوژیک جدیدی ایجاد می‌کنند و حیوانات در مسیری قرار می‌گیرند که اجازه زندگی به خیلی از آنها را می‌دهد.

از آنجایی که شکل و عمل خیلی از موجودات با عده زیادی از ژن‌های تنظیم کننده تکوین کنترل می‌شود، تغییر چنین ژن‌هایی موروثی است که زمینه تکامل گیاهان و حیوانات مختلف هستند. به هر حال، جهش‌هایی که زمینه تغییرات تکاملی ارثی هستند (چه انتخاب توسط انسان بوده و چه توسط دلایل طبیعی) معمولاً به صورت ناشناس در گذشته باقی مانده‌اند. به همراه افزایش دسترسی به توالی DNA ، آغاز یک تغییر دربارهٔ مادهٔ ژنی تکوین بافت‌ها و اندام‌های خیلی از موجودات است. این پیشرفت‌ها اختلافات ژنتیک مولکولی را که تنوعات گیاهان و حیوانات را مشخص می‌کند، آشکار می‌سازد.

خیلی از تغییرات در ژن‌ها مضر است و تغییرات در ژن‌هایی که رشد و یا تکوین را کنترل می‌کنند ممکن است که اثرات تخریبی بزرگی داشته باشند. در حقیقت خیلی از سندرم‌های ژنتیکی ارثی انسان (سندرم، گروهی از اشکال بیماری می‌باشد که با هم بروز می‌کنند)، شامل نقایص تولدی یا سرطان مربوط به ژن‌های تکوینی می‌باشند.

حفظ اغلب انواع پروتئین‌های مهم تکوینی در میان گونه‌های حیوانی مختلف نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها در نیم‌میلیون سال قبل در میان اجداد حیوانات وجود داشته‌اند. در خیلی از موارد، پروتئین‌های حفظ شده متعهد به ایجاد یک نوع بافت یا اندام در کل زمان‌ها هستند، با وجود تفاوت‌های مورفولوژیک زیادی که بین قلب پستانداران و حشرات وجود دارد. از روی تشابهات عملکرد ژنی بین گونه‌های جانوری و بر پایه اطلاعات از گونه‌های متفاوت می‌توان به نقش ژن‌ها و بیماری‌های ژنی انسانی پی برد.

تکامل جانوران اصولاً می‌تواند به واسطهٔ ظهور ژن‌ها و پروتئین‌های جدید باشد، اما به نسبت خیلی کمی شناخته شده است. در عوض تغییرات در شکل بدن در طی نسل‌ها به نظر می‌رسد اساساً به واسطهٔ تغییر در صدها هزار توالی تنظیمی کوتاه DNA است که نسخه‌برداری ژن‌ها و پردازش RNA را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اغلب «سخت‌افزار» پروتئینی در حیوانات متفاوت مشابه می‌باشد اما «نرم‌افزار» به سادگی و سریعاً می‌تواند تغییر یابد.

نکات کلیدی بخش ۲۲.۱

رویدادهای مهم تکوین

- ژنوم مادری و پدری در تخم لقاح یافته گردهم می‌آیند.
- سلول‌های لایه زایشی تخمک و اسپرم را می‌سازند و اغلب در اخلاف به ارث می‌رسند، سلول‌های سوماتیک بقیه بدن را می‌سازند ولی به نسل بعد نمی‌رسند.
- طی جنین‌زایی، یک تخم لقاح یافته متقارن انسان، جنین اولیه‌ای است که در طول محورهای جلویی ـ عقبی (سر ـ دم)، چپ و راست و پشتی ـ شکمی (پشت ـ جلو) نامتقارن است (شکل ۱ـ۲۲).
- جنین اولیه سه لایه سلولی آغازی ـ اکتودرم، مزودرم و آندودرم ـ را می‌سازند که بافت‌ها و اندام‌های متفاوت را ایجاد می‌کنند.
- سلول‌های جنینی از طریق پیام‌های پروتئین ترشحی که به گیرنده در سطح سلول دریافت کننده متصل می‌شود با یکدیگر، ارتباط دارند و تغییراتی در سلول دریافت کننده ایجاد می‌کند که منجر به تمایز به انواع سلول‌های ویژه می‌شود. این فرآیند، که یک یا گروهی از سلول‌ها پیامی را می‌فرستند که بقیه سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، القاء نامیده می شود.
- اندام‌زایی فرآیندی است که در آن کل بافت‌ها و اندام‌های بدن شکل می‌گیرند.

■ الگوبندی، فرآیند سازماندهی شکل، اندازه و رنگ بافت‌ها و اندام‌ها طی تکوین است.

■ ژن‌های زیادی مشخص شده‌اند که تکوین را کنترل می‌کنند و آسیب به این ژن‌ها می‌تواند به نقص تولد، سرطان یا تخریب بافت منجر شود.

■ انواع زیادی از ژن‌های کنترل کننده تکوین از لحاظ تکاملی حفظ شده‌اند. نه تنها این ژن‌ها در طیف وسیعی از انواع حیوانات می‌توانند مشخص شوند، بلکه در خیلی از موارد به نظر می‌رسند نقش مشابهی در حیوانات مختلف بازی می‌کنند. این عمل تکامل حیوانات از اجداد مشترک را منعکس می‌کند.

۲۲-۲ گامتوژنز و لقاح

خواه در رحم (زهدان) خواه در پناهگاه صدف، جنین با چالش‌های مشابهی مواجه می‌شود: شروع جنین با کروموزوم‌های صحیح، تغذیه، سازماندهی رشد، ساخت انواع مختلف سلول و ایجاد الگو.

سلول‌های رده زایا همهٔ آن چیزی هستند که به ارث می‌بریم

تصور می‌شود که کنارگذاشتن سلول‌های رده زایا در اوایل تکوین کروموزوم‌ها را از آسیب به وسیلهٔ کاهش تعداد دورهای همانندسازی حفظ می‌کنند یا با بحث حفاظت از سلول‌ها که برای وراثت اساسی هستند، می‌شود. به هر دلیل، تفرق اولیه رده زایا در بین حیوانات (گرچه عمومی نیست) گسترده است. در گیاهان اصلاً چنین چیزی نیست: اغلب مریستم‌ها، گروهی از سلول‌های تقسیم شونده در نوک ساقه‌ها و ریشه‌های در حال رشد، می‌توانند سلول‌های رده زایا را ایجاد نمایند. یک نتیجهٔ تفرق اولیهٔ سلول‌های رده زایا این است که از دست رفتن و نظم دوباره ژن‌ها در سلول‌های سوماتیک نمی‌تواند ژنوم به ارث رسیده به تخم آینده را تحت تأثیر قرار دهد.

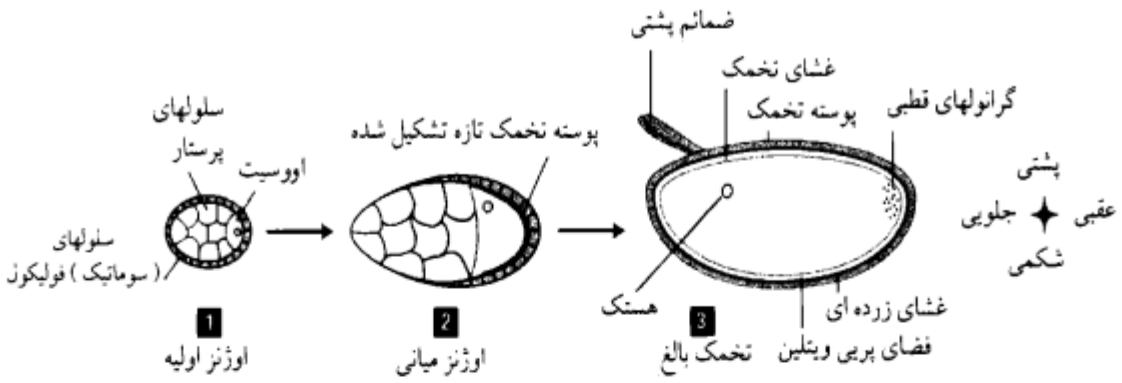
مگس سرکه (**دروزوفیلا**) اساس خیلی از کارهای بنیادی انجام شده در زمینهٔ رفتار کروموزوم‌ها در قرن قبل بود. امروزه آنها در تحقیقات تکوین، ژنومیک و زیست‌شناسی سلولی مولکولی به کار می‌روند و انواعی از جهش یافته‌های حشرات به عنوان مدل‌های بیماری‌های انسانی به کار گرفته می‌شود. همچنین این موجودات مدل برای بررسی گامتوژنز، ایجاد تخمک (**اووژنز**) و اسپرم (**اسپرماتوژنز**) مفید هستند.

اووژنز در دروزوفیلا با یک سلول بنیادی شروع می‌شود که به طور نامتقارن برای تولید تک سلول رده زایا (یا فقط سلول زایا) تقسیم می‌شود، که این سلول ۴ بار تقسیم شده و ۱۶ سلول ایجاد می‌کند. یکی از این سلول‌ها میوز را کامل کرده، و تبدیل به اووسیت یا تخمک می‌شود و ۱۵ سلول دیگر **سلول پرستار**[1] می‌شوند که پروتئین و mRNAهایی سنتز می‌کنند که از طریق پل‌های سیتوپلاسمی به اووسیت انتقال می‌یابند (شکل ۲-۲۲). پروتئین‌ها و mRNAهایی که توسط سلول‌های پرستار فراهم می‌شوند برای بلوغ اووسیت و برای مراحل اولیه جنین‌زایی ضروری هستند و نقش کلیدی در نظم اصلی بدن حشره دارند. حداقل یک سوم ($\frac{1}{3}$) ژنوم دروزوفیلا نمایانگر ژنوم مادری است که به اووسیت رسیده است (یک جهیزیه اساسی). هر گروه ۱۶ سلولی با تک لایه‌ای از سلول‌های سوماتیک که **فولیکول** نامیده می‌شود، احاطه می‌شوند که پوسته تخم را حفاظت می‌کند. اووسیت بالغ یا تخمک، در اوویداکت رها می‌شود، جایی که لقاح رخ می‌دهد، و سپس تخمک لقاح یافته (تخم) شکل می‌گیرد.

در پستانداران حدود ۲۵۰۰ سلول پیش‌ساز رده زایا، **سلول‌های زاینده اولیه** (PGCs)، طی گاسترولاسیون به وجود آمده و به قسمتی از مزودرم حفره شکمی، جایی که نهایتاً غدد جنسی (تخمدان یا بیضه) به وجود می‌آید، مهاجرت می‌کنند. این سلول‌های زاینده اولیه تولید پروتئین Kit، گیرنده سطحی برای استیل (Steel)، پیام پروتئینی میتوژنیک ترشحی از سلول‌ها طی مسیر مهاجرت PGC را می‌کنند. پس، همچنانکه سلول‌های زاینده اولیه مهاجرت می‌کنند، تحت تأثیر استیل تقسیم می‌شوند. سلول‌های زاینده اولیه بعد از رسیدن به مقصدشان در غدد جنسی، برای اووژنز یا اسپرماتوژنز آماده می‌شوند.

همانطور که در شکل ۲۲-۳a نشان داده شده است، سلول‌های زاینده اولیه در تخمدان در حال تکوین انسان به طور پیوسته طی ۲ تا ۷ ماه حاملگی برای تولید حدود ۶ میلیون اووسیت اولیه تقسیم می‌شوند. از اینها حدود ۴۰۰ هزار سلول تا زمان بلوغ زنده می‌مانند و حدود ۵۰۰ تا طی عمر فرد تخمک‌گذاری می‌شوند. اووسیت‌های اولیه شروع به میوز نموده اما در پروفاز میوز اول متوقف می‌شوند. به دلیل این توقف پروفازی، اووسیت‌های اولیه تتراپلوئید هستند که نسخه‌هایی اضافی از ژنوم برای کمک به تهیه تغذیه سلول تخمک غیرمعمول بزرگ فراهم می‌کند. بعضی اووسیت‌ها در پروفاز میوز I نزدیک به ۵۰ سال باقی می‌مانند. در بلوغ، رشد سریع اووسیت‌های اولیه شروع می‌شود که سرانجام ضخامت آنها به ۲۰۰ میکرومتر می‌رسد. میوز طی تخمک‌گذاری ادامه می‌یابد اما تنها بعد از لقاح

1- Nurse cell



شکل ۲ـ۲۲ (شکل رنگی) اووژنز دروزوفیلا: یک سلول پیش‌ساز رده زایا ایجاد ۱۵ سلول پرستار (سبز) و یک سلول اووسیت (قرمز) در اوایل اووژنز می‌کند. ❶ اووسیت اولیه به اندازه سلول‌های پرستار همسایه است. فولیکول (سلولی سوماتیکی) اووسیت و سلول‌های پرستار را احاطه می‌کند. سلول‌های پرستار شروع به سنتز mRNAها و پروتئین‌های ضروری برای بلوغ اووسیت می‌کنند و سلول‌های فولیکول شروع به ساخت پوسته تخمک می‌کنند. ❷در اووژنز میانی اندازه اووسیت به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. ❸ تخمک بالغ با پوسته تخمک (خاکستری) کاملاً احاطه می‌شود. سلول‌های پرستار دور ریخته شده‌اند اما mRNAها سنتز شده و با عملکرد سلول‌های پرستار در جنین اولیه به اووسیت انتقال داده شده‌اند. گرانول‌های قطبی در ناحیهٔ عقبی سیتوپلاسم تخمک ناحیه‌ای که سلول‌های رده زایا ایجاد خواهند شد را نشان می‌دهند. عدم تقارن اووسیت بالغ (موقعیت خارج از مرکزی هسته) مراحل آغازی تعیین سرنوشت سلولی در جنین را تعیین می‌کند. بعد از این که تخمک به اوویداکت رها شد، لقاح تخمک جنین‌زایی را به راه می‌اندازد.

کامل می‌شود. هر میوز باعث ایجاد یک اووسیت بالغ یا سلول تخمک می‌شود.

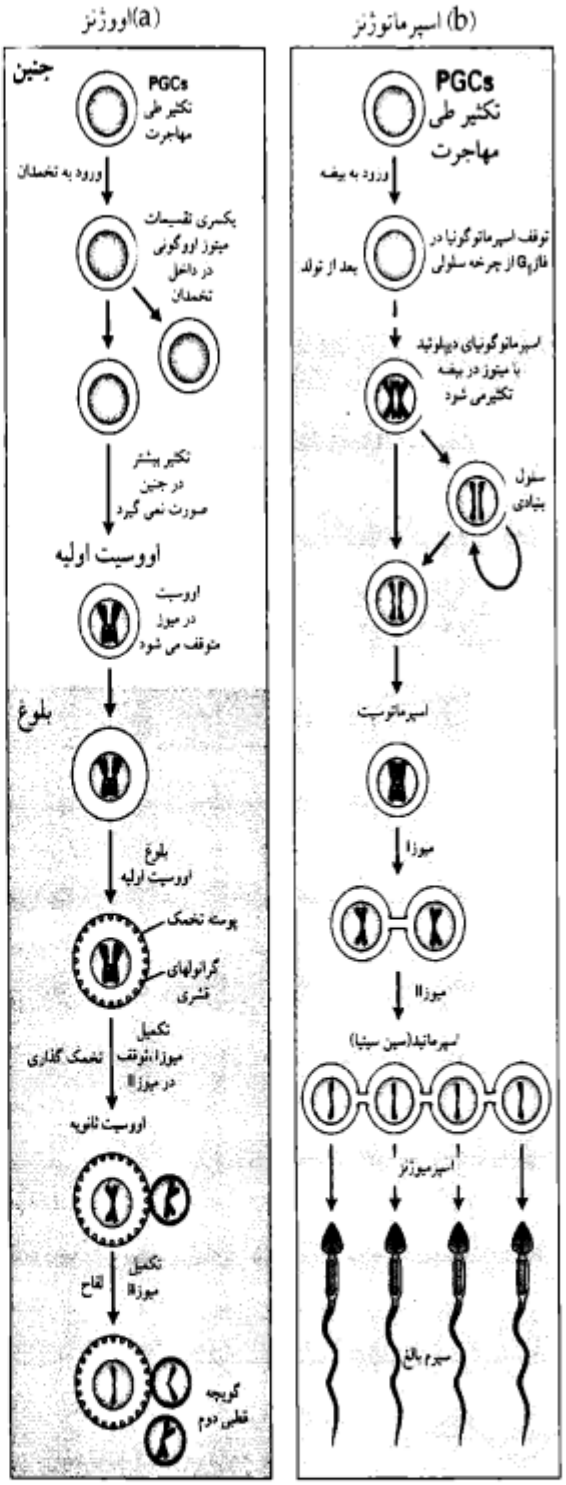
سلول‌های زاینده اولیه که به بیضه‌های نو در حال تکوین مهاجرت می‌کنند، سرنوشت کاملاً متفاوتی دارند (شکل ۲۲ـ۳b). در بیضه، آنها در G_1 چرخه سلول متوقف می‌شوند و هیچ میوزی رخ نمی‌دهد. بعد از تولد این سلول‌های متوقف شده که **اسپرماتوگونیا** نامیده می‌شوند، میوز را از سر می‌گیرند. از این لحاظ که سیتوکینز ناقص باعث می‌شود سلول‌های با پل سیتوپلاسمی (سینسیتیا، سلول‌های مشابه) شکل بگیرند میوز آنها ویژه است. از اسپرماتوگونیا، **اسپرماتوسیت اولیه** به وجود می‌آید که وارد میوز می‌شوند، اما هنوز دارای پل سیتوپلاسمی هستند. هر میوز ۴ گامت هاپلوئید یا **اسپرماتید** ایجاد می‌کند که با پل‌های سیتوپلاسمی به همدیگر متصلند. این پل‌ها همزمان شدن بلوغ سلول زایا را باعث می‌شوند و اجازه می‌دهند تا محتویات بین سلول‌ها تقسیم شوند. بنابراین، سلول‌های هاپلوئید حاصل از میوز می‌توانند محصولات کروموزومی مختص X یا Y که هر سلول هاپلوئید انتقال می‌دهد، را شریک شوند.

اسپرماتیدها فرآیند تمایز برجسته‌ای را می‌گذرانند (**اسپرمیوژنز**) که سلول‌های اسپرم بالغ را تولید می‌کند (۲۲ـ۴). دستگاه گلژی برای ایجاد **کلاه آکروزومی**[1] در بالای هسته به یک انتهای سلول حرکت می‌کند، در حالی که تاژک شروع به ساخته شدن در انتهای دیگری می‌کند. میتوکندری‌ها در پایه تاژک به هم می‌رسند تا آماده تولید ATP برای شنای اسپرماتید شوند. بیشتر سیتوپلاسم بیرون ریخته می‌شود، پل‌های سیتوپلاسمی از بین می‌روند و هسته با اثر سابق‌خود، توسط هدایت پروتئین پروتامین غنی از آرژینین، که هیستون‌های طبیعی را از کروماتین جابجا می‌کنند، متراکم می‌شود.

در انسان ایجاد سلول اسپرم از اسپرماتوسیت، حدود ۲ ماه طول می‌کشد. در مردها حدود 10^8 سلول اسپرم در هر روز و بیشتر از 10^{12} اسپرم در طول عمر تولید می‌شود. طول اسپرم انسان حدود ۵۰ میکرومتر است، اما اسپرم دروزوفیلا به طور قابل ملاحظه‌ای بزرگ‌تر است. به طور شگفت‌انگیزی اسپرم در یک گونه مگس سرکه حدود ۵/۸ سانتی‌متر طول دارد که ۲۰ برابر طویل‌تر از حشره نری است که آن را ایجاد می‌کند! اسپرم بالغ شامل سر حاوی آکروزوم و هسته متراکم و یک دم تاژکی است. دم دارای ساختار پیچیده‌ای است، آکسونم، که تشکیل شده از میکروتوبول‌ها و پروتئین حرکتی داینئین و حرکات آن، اسپرم را به سمت تخمک جلو می‌برد (شکل ۲۹ـ۱۸ و ۳۱ـ۱۸). میتوکندری‌های در پایهٔ دم، انرژی را برای حرکت **آکسونم** به شکل ATP فراهم می‌کنند.

جهش‌هایی که به پروتئین‌های حرکتی اسپرم آسیب

1- Acrosomal cap



می‌رسانند، می‌توانند باعث عقیمی شوند. برای مثال در بیماری ارثی سندرم کارتاژنر[1]، نقص بازوهای داینئینی در آکسونم (بعضی مواقع با جهش خود ژن داینئین ایجاد می‌شوند) باعث بی‌حرکت شدن تاژک و مژک می‌شوند، در نتیجه آن ناباروری جنس نر و سیتوس اینورسوس[2] است. سیتوس اینورسوس نقص در تولد است که قلب و بقیه اندام‌ها در جهت اشتباه در بدن قرار دارند. این ناهنجاری در نتیجهٔ عدم حرکت مژک‌هایی است که محور طبیعی چپ ـ راست بدن طی گاسترولاسیون را قطبی

شکل ۳ـ۲۲. گامتوژنز پستانداران: در هر دو نوع نر و ماده، گامتوژنز در جنین شروع شده و در مرحله بلوغ کامل می‌شود. (a) اووژنز با تکثیر سلول‌های زایای اولیه (PGC) در جنین ابتدایی شروع می‌شود و در جایگاهی که تخمدان شکل خواهد گرفت جمع‌آوری می‌شوند. اووسیت‌های اولیه در میوز I متوقف شده و تا بلوغ در این مرحله باقی می‌مانند. بعد از تخمک‌گذاری، اووسیت میوز I را کامل کرده و در میوز II متوقف می‌شود. اگر اووسیت لقاح یابد، میوز II کامل می‌شود. حاصل هر میوز یک اووسیت منفرد است، بقیه محصولات میوز جسم قطبی را ایجاد می‌کنند که عملکرد ندارند. (b) اسپرماتوژنز همچنین با چندبرابر شدن PGC در جنین شروع می‌شود و در بیضه در حال تکوین جمع می‌شوند. برخلاف پیش‌سازهای اووسیت، پیش‌سازهای اسپرم (اسپرماتوگونیا) در G_1 چرخه سلولی متوقف شده و میوز را تا بعد از تولد شروع نمی‌کنند. بعداً تقسیم سلولی میوز و میتوز کامل می‌شود، حاصل آن اسپرماتیدهای هاپلوئید با سیتوپلاسم متصل به هم (سین‌سی‌تیا) است اسپرماتید طی پدیده‌ای که اسپرمیوژنز نامیده می‌شود به اسپرم بالغ تمایز می‌یابد (شکل ۴ـ۲۲).

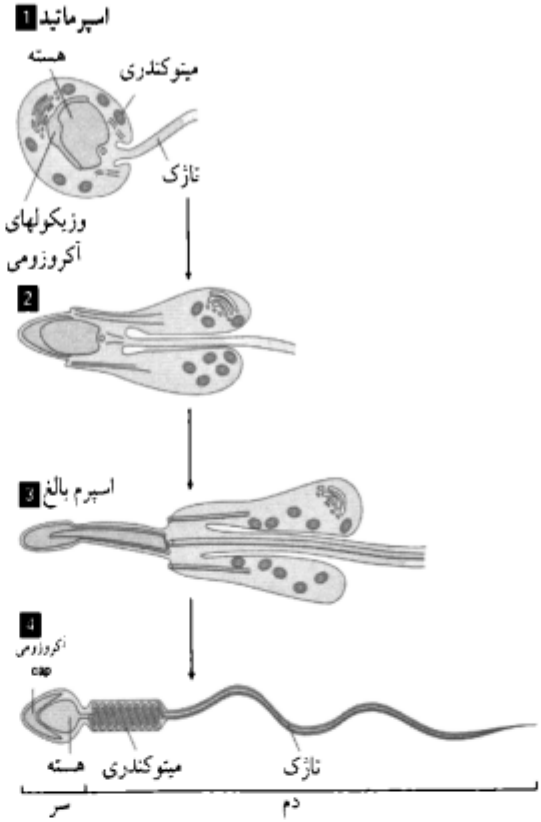
می‌کرده‌اند ـ شرح مبسوط این وقایع را در بخش ۳ـ۲۲ خواهیم دید.

چندین رویداد مهم طی گامتوژنز رخ می‌دهد. در هر دو جنس، میوز تعداد کروموزوم‌ها را به دستهٔ هاپلوئید کاهش می‌دهد. دسته‌بندی کروموزوم که ادامه می‌یابد خودش یک تولیدکننده استثنایی تغییرات است. از آنجایی که ۲۳ جفت کروموزوم در انسان وجود دارد و شانس مساوی برای رسیدن هر جفت به یک گامت وجود دارد 2^{23} ترکیب احتمالی از کروموزوم می‌تواند طی میوز به وجود آید. در بین جمعیت‌های انسانی، توالی منفرد نوکلئوتید هتروژن در حدود ۱ در ۱۰۰۰ جفت باز وجود دارد، همچنین اندازه متوسط کروموزوم انسان حدود 130×10^{6} جفت باز دارای ۱۳۰۰۰۰ تنوع از همولوگ خود است.

این گوناگونی را به نوترکیبی (حدوداً یک کراس‌آور در هر کروموزوم) که ترکیبات جدیدی از توالی‌ها را احیاء می‌کند، اضافه کنید و گوناگونی حالا نمایان می‌شود. همچنین گامتوژنز در جنس نر جنسیت نسل بعد را اداره می‌کند: اسپرم حامل کروموزوم X ایجاد نوزاد ماده می‌کند در حالی که آنهایی که حاوی کروموزم Y هستند، نوزاد نر ایجاد می‌کنند.

1- Kartagener's syndrome

2- Situs inversus



▲ **شکل ۴ـ۲۲. اسپرمیوژنز** تمایز اسپرماتید (❶) به سلول اسپرم بالغ (❹) شامل یک سری از تغییرات مورفولوژیک است. در یک انتها، کلاه آکروزومی در بالای هسته شکل می‌گیرد که فوق‌العاده متراکم می‌شود. در انتهای دیگر، تاژک طویل می‌شود و بیشتر سیتوپلاسم اطراف آن از دست رفته و یک غلاف میتوکندریایی شکل می‌گیرد. گرچه در اینجا نشان داده نشده است، هر اسپرماتید با پل سیتوپلاسمی به اسپرماتید مجاور متصل است (شکل ۳b‌ـ۲۲). اینها طی اسپرمیوژنز جدا می‌شوند، همچنین هر سلول اسپرم بالغ می‌تواند به صورت غیرمستقل حرکت کند.

عمل لقاح ژنوم را یکی می‌کند

لقاح می‌تواند یک پدیده تماشایی باشد، مخصوصاً زمانی که همهٔ حیوانات مرجانی صخره‌های بزرگ استرالیا، تخمک و اسپرم را در یک شب در اوایل سال در مهتاب کامل آزاد می‌کنند. فرآیند **لقاح** که درنتیجه اتحاد یک اسپرم و تخمک است، چندین رویداد چالش‌آور را شامل می‌شوند: نفوذ یک سلول اسپرم به تخمک، جمع شدن ژنوم دیپلوئید (نه کمتر و نه بیشتر)، کامل شدن تقسیم میوزی تخمک و آغاز برنامه ویژه فعال‌سازی ژن. اسپرم اولین بار در اواخر سال ۱۶۰۰ توصیف شد و تخمک‌ها که بزرگ‌تر هستند خیلی قبل‌تر تشخیص داده شدند. اما خود لقاح مستقیماً مشاهده نشد و در اواخر سال ۱۸۰۰ مستند شد. مطالعات اولیه لقاح بر روی اُرکین دریایی انجام شد چون اسپرم و تخمک آن به راحتی جدا شده، کشت و به آسانی دیده می‌شود. مشاهدات ادغام پیش هسته‌های تخمک و اسپرم به طرح ایده اولیه که اسپرم موجود زندهٔ آلوده کننده در مایع منی است، کمک کرد.

قابل ملاحظه است که اسپرم حتی توانایی رسیدن ونفوذپذیرکردن تخمک را دارد. برای مثال در انسان‌ها، یک اسپرم در حال رقابت با بیش از ۱۰۰ میلیون اسپرم دیگر برای ورود به یک تخمک می‌باشد و مسافت طولانی برای رسیدن به تخمک را شنا می‌کند. علاوه بر این تخمک دارای چندین لایه احاطه کننده است که از ورود اسپرم جلوگیری می‌کند. گرچه اسپرم‌ها توانایی بالایی برای سرعت وشنا دارند، ولی تنها تعداد کمی به تخمک موجود در اوویداکت می‌رسند (شکل ۱ـ۲۲). تاژک اسپرم انسان شامل حدود ۹۰۰۰ موتور داینئین است که میکروتوبول را در آکسونم انعطاف می‌دهد و باعث خمش متوالی اسپرم شده و آن را به طرف جلو می‌راند (شکل ۳۱ـ۱۸). برآورد نیروی تولیدشده با پروتئین حرکتی داینئین دامنه‌ای از ۱ تا ۶ پیکونیوتون (pN) دارد. از آنجاکه یک pN برای حرکت سلول قرمز خون کافی است، یک اسپرم به وضوح مقدار زیادی قدرت حرکتی ایجاد می‌کند.

کلاه آکروزومی (یا به طور ساده، آکروزوم)، که در نوک سر اسپرم پیدا شده است یک قطعه تخصصی شده متصل به غشاء برای برهمکنش با اووسیت است. غشای آکروزومی فقط در زیر غشای پلاسمایی در سر اسپرم قرار دارد: در جهت دیگر آکروزوم، غشای آن پهلوی غشای هسته قرار گرفته است (شکل ۴ـ۲۲). در داخل آکروزوم آنزیم‌های محلول شامل هیدرولازها و پروتئازها قرار دارند. در ابتدا که اسپرم به تخمک می‌رسد، باید لایه‌ای از سلول‌های کومولوس که از فولیکول تخمدانی جایی که اووسیت بالغ می‌شود، مشتق شده‌اند را نفوذپذیر کند. سپس اسپرم با زوناپلاسیدا[1]، یک ماتریکس ژلاتینه خارج سلولی با ضخامت تقریباً ۶ میکرومتر، مواجه می‌شود که تخم را احاطه می‌کند (شکل ۵a‌ـ۲۲). زوناپلاسیدا تا درجه زیادی از ۳ گلیکوپروتئین که ZP1، ZP2 و ZP3 نامیده می‌شوند، تشکیل شده است. ZP3 جالب توجه‌ترین آنها است، چون اسپرم به آن متصل می‌شود. باقیمانده‌های قندی بر روی ZP3 برای اسپرم به منظور تشخیص اووسیت لازم می‌شود و برداشتن آنها از لقاح جلوگیری می‌کند. قندهای روی ZP3 به بتا ۱، ۴ـ و گالاکتوزیل ترانسفراز I (GalT) روی سطح اسپرم متصل می‌شود. زمانی که ZP3 در تخمک تجمع کپی‌های چندگانه GalT روی سر اسپرم را القاء

1- Zona pellucida

می‌کند، یک آبشار G پروتئین در سلول اسپرم راه‌اندازی می‌شود و در نتیجه آکروزوم اگزوسیتوز نموده و محتویات آن بر روی سطح تخمک آزاد می‌شود (شکل ۲۲ـ۵b مراحل 1 و 2). عموماً این فرآیند **واکنش آکروزومی** نامیده می‌شود. اسپرم‌های فاقد GalT قادر به اتصال به ZP3 یا گذراندن واکنش آکروزومی نیستند، گرچه پروتئین‌های دیگر سطح اسپرم اجازه می‌دهند که اسپرم‌های دارای نقص GalT باز هم به زوناپلاسیدا متصل شوند. تشخیص ZP3 مختص گونه است بنابراین از تشکیل جنین غیرقابل حیات (مرده) با اسپرم یک گونه و تخمک از گونه دیگر جلوگیری می‌کند. همچنین آنزیم‌های آزادشده زوناپلاسیدا را هضم می‌کنند، اسپرم می‌تواند این سد را با داخل شدن خودش نفوذپذیر کند. غشاهای پلاسمایی تخمک و اسپرم بعداً به هم متصل شده و ادغام می‌شوند و اجازه می‌دهند که هستهٔ اسپرم به داخل تخمک برود (شکل ۲۲ـ۵ مراحل 3 تا 5). باز هم پروتئین‌های تشخیصی ویژه‌ای کشف شده‌اند که ادغام غشاء را واسطه‌گری می‌کنند مثل CD9، یک اینتگرین در غشای پلاسمایی تخمک، و Izumo، یک پروتئین با دُمین ایمونوگلوبولینی در غشاء پلاسمایی اسپرم (شکل ۲۲ـ۶). پروتئین‌هایی مانند CD9 و Izumo می‌توانند هدف‌هایی برای کنترل باروری باشند.

به دنبال جفت‌گیری حیوانات، اسپرم‌ها در مسابقه‌ای برای رسیدن و ادغام با تخمک قرار می‌گیرند. در حالت طبیعی، تعداد زیادی سلول اسپرم احتمال دارد به تخمک در دسترس برسند. اسپرم اول به طور موفق به زوناپلاسیدا نفوذ کرده و با تخمک ادغام می‌شود و پاسخی توسط تخمک ایجاد می‌شود که از **پلی اسپرمی**، (ورود اسپرم‌های دیگر با کروموزم‌های اضافی)، جلوگیری می‌کند. اسپرم بعد از این که در ادغام با سطح اووسیت موفق شد، جریانی از Ca^{2+} از جایگاه ورود اسپرم شروع به جریان در حدود ۵ تا ۱۰ میکرومتر بر ثانیه در اووسیت می‌کند. یک اثر این جریان کلسیم این است که باعث می‌شود وزیکول‌های قرار گرفته در زیر غشای پلاسمایی تخمک، گرانول‌های قشری، محتویات خود را از طریق غشای پلاسمایی رها سازند و یک غشای پشتیبان لقاحی شکل بگیرد که از ورود اسپرم‌های دیگر جلوگیری می‌کند. در این واکنش قشری، حرکت گرانول‌ها توسط گردهمایی زیاد میکروفیلامنت‌های اکتین که در پاسخ به ورود اسپرم از اکتین‌های گلبولی ایجاد می‌شوند، کنترل می‌شود. جریان کلسیمی القاء شده توسط ادغام اسپرم ـ تخمک به عنوان پیامی مؤثر برای آغاز تکوین تخم نیز عمل می‌کند. از اولین رویدادها، تکمیل میوز تخم می‌باشد (چیزی که در میوز I متوقف شده بود، مجدداً از سر گرفته می‌شود، شکل ۲۲ـ۳a). سپس هسته هاپلوئید تخمک و اسپرم می‌توانند با هم ادغام شوند و هسته دیپلوئید تخم حاصل می‌شود.

یک اووسیت امکانات قابل ملاحظه‌ای برای تخم تازه شکل گرفته دارد. در پستانداران و خیلی از گونه‌های دیگر جانوری، همهٔ DNA میتوکندریایی تخم از تخمک می‌آید. هیچ DNA میتوکندریایی اسپرمی بعد از لقاح باقی نمی‌ماند. توارث DNA میتوکندریایی مختص جنس ماده برای ردیابی وراثت مادری (مثلاً منشأ انسان‌های اولیه از آفریقا بوده است) به کار برده شده است. طی میوز اووسیت و اولین تسهیم جنین، نسخه‌برداری کم است و یا اتفاق نمی‌افتد، همچنین طی این دوره RNA اووسیت حیاتی است. در این بین اغلب mRNAهای هیستونی فراوانی وجود دارند که دارای دم کوتاه پلی - A هستند، که با راندمان کم ترجمه می‌شوند. ترجمه این mRNAها توسط یک پروتئین متصل‌شونده به ساقه ـ حلقه (SLBP)[1] که به نوکلئوتیدهای انتهای ′۳ توالی ترجمه‌نشده متصل می‌شود، تنظیم می‌شود. SLBP تنظیم شده توسط فسفریلاسیون، با چرخه سلولی تا حدی که mRNA هیستونی پایدار شده و ترجیحاً طی فاز S ترجمه شود، تنظیم می‌شود. mRNAهای دیگر اووسیت طی تکوین اولیه جنینی به طور متفاوتی فعال می‌شوند.

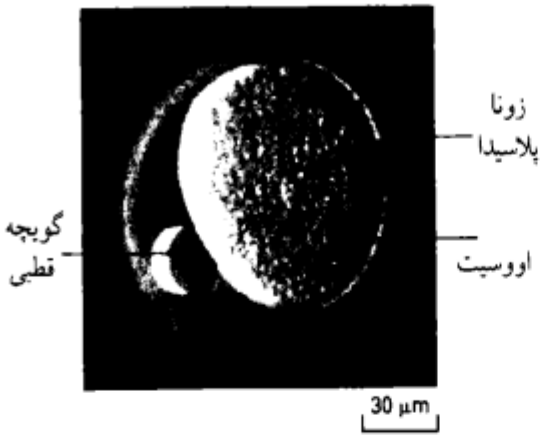
نقش‌پذیری ژنومی[2] فعال‌سازی ژن براساس منشأ مادری یا پدری کروموزوم را کنترل می‌کند.

انتظار می‌رود که دو پیش هسته که توسط اسپرم و تخمک اهدا می‌شوند دارای توانایی برابر برای فعال کردن ژن‌ها، به جز اختلاف بین کروموزوم‌های X و Y، باشند. ولی حتی بعد از لقاح، زمانی که کروموزوم‌های مشتق شده مادری یا پدری در هسته یکسان هستند، منشأ جنس نر یا ماده پیوسته دارای اثر تأخیری است. این پدیده توسط تجربیاتی در جنین موش آشکار شده است. جنین‌های دیپلوئید می‌توانند از دو پیش هسته نر یا ماده که در تئوری کافی است، ساخته شوند. هر چند تخم‌هایی با دو ژنوم هاپلوئید مشتق از جنس نر بافت‌های خارج جنینی خوبی ایجاد می‌کنند، اما جنین‌های فوق‌العاده معیوبی هستند. برعکس، تخم‌هایی با دو ژنوم هاپلوئید مشتق از جنس ماده، جنین نسبتاً خوبی ایجاد می‌کنند اما کیسه‌های زرده و جفت که بافت‌های خارجی جنینی هستند، را ندارند.

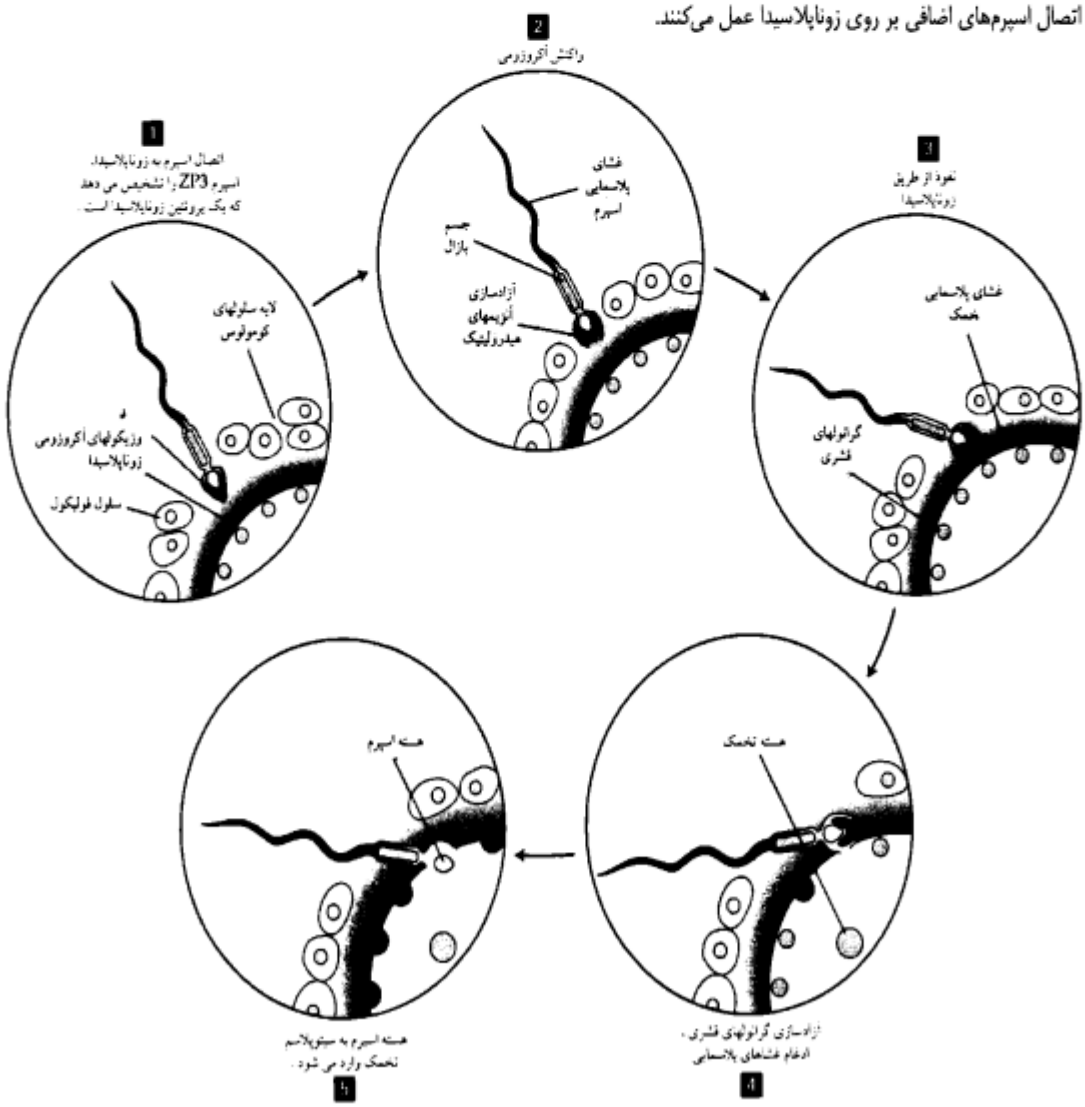
تفسیر این نتایج فرایند نقش‌پذیری ژنومی نامیده می‌شود که

1- Stem-loop binding protein (SLBP)

2- Genomic Imprinting



◀ **شکل ۲۲.۵ (شکل رنگی) ادغام گامت‌ها طی لقاح** (a) تخمک‌های پستانداران، مثل اووسیت موش که اینجا نشان داده شده، با یک حلقه از مواد شفاف، زوناپلاسیدا، احاطه می‌شود که یک ماتریکس اتصالی برای اسپرم فراهم می‌کند. ضخامت تخمک موش ۷۰ میکرومتر است و ضخامت زوناپلاسیدا ۶ میکرومتر است. جسم قطبی یک محصول غیرعملکردی میوز است (میله مقیاس ۳۰μm می‌باشد). (b) در مرحله آغازی لقاح، ❶اسپرم از لایه سلولی کومولوس اطراف تخمک برای رسیدن به زوناپلاسیدا نفوذ می‌کند. ❷برهمکنش بین GalT، یک پروتئین در سطح اسپرم، و ZP3، یک گلیکوپروتئین در زوناپلاسیدا، واکنش آکروزومی را راه‌اندازی می‌کند که آنزیم‌ها از وزیکول‌های آکروزوم آزاد می‌شوند. ❸ تجزیه زوناپلاسیدا با هیدرولاز و پروتئاز آزاد شده طی واکنش آکروزومی به اسپرم اجازه می‌دهد که وارد تخمک شود. پروتئین‌های ویژه تشخیص دهنده در سطح تخمک و اسپرم، ادغام غشای پلاسمایی آنها را تسهیل می‌کند. ❹ و ❺ ادغام و بعداً ورود هسته اولین اسپرم به سیتوپلاسم تخمک، آزادسازی کلسیم در داخل اووسیت را به راه می‌اندازد. گرانول‌های قشری (نارنجی)، به موج کلسیم حاصل از ادغام غشای اووسیت پاسخ داده و آنزیم‌هایی آزاد می‌کند که برای جلوگیری از اتصال اسپرم‌های اضافی بر روی زوناپلاسیدا عمل می‌کنند.



طی اسپرماتوژنز و اووژنز رخ می‌دهد. نقش‌پذیری با تغییرات کروماتینی، (اما نه توالی DNA،) در گامت‌های در حال تکوین، تکمیل می‌شود به طوریکه تنها ژن‌های معین برای فعال‌سازی و نسخه‌برداری قابل دسترس می‌شوند. برای مثال در انسان‌ها، ژن فاکتور رشد شبه انسولینی (Igf2) II روی هر دو نسخه کروموزم ۱۱ جنین وجود دارد، اما در کروموزوم مشتق از مادر غیرفعال است. برعکس، در بعضی انسان‌ها ژن Igf-2r، که گیرنده Igf-2 را رمز می‌کند تا Igf-2 را به لیزوزوم به منظور عمل هضم انتقال می‌دهد. در کروموزوم ۶ مشتق از جنس نر غیرفعال است در حالی که در جنس ماده فعال می‌باشد. نقش‌پذیری توالی نوکلئوتیدی DNA را تغییر نمی‌دهد. به این دلیل نسخهٔ پدری یا مادری هر کروموزوم اگر به گامت لقاح یابنده انتقال یابد، می‌تواند در تکوین زاده‌ها نقش داشته باشد.

ناهنجاری در نقش‌پذیری ژنی که باعث نقص در رشد، بیماری‌های ارثی مختلف و سرطان می‌شود اهمیت این فرآیند را نشان می‌دهد. مکانیسم نقش‌پذیری ناشی از متیلاسیون افتراقی DNA طی تمایز رده زایا است. نوع مهم و رایج‌تر متیلاسیون،دی‌نوکلئوتیدهای CpG را تغییر می‌دهد که در حدود ۳۰ میلیون بار در ژنوم پستانداران رخ می‌دهد. عموماً ۶۰ تا ۸۰ درصد باقیمانده‌های C در نوکلئوتید CpG با چندین متیل ترانسفراز تغییر داده می‌شوند. بیشتر متیلاسیون‌های CpG در (سلول‌های رده زایای اوّلیه) طی تکوین جنین محو می‌شوند، بنابراین اجازه فعالیت دوباره به ژن‌های نقش‌پذیر داده می‌شود. متیلاسیون مجدد سلول‌های رده زایا بعضی ژن‌ها را بسته به این که کروموزوم به اووژنز یا اسپرماتوژنز بروند، (یعنی این که حیوان نر است یا ماده) تحت تأثیرقرار می‌دهد. بنابراین، تخمک و اسپرم با انگشت‌برداری مشخص مجزا می‌شوند. بعد از لقاح، موج ثانویه‌ای از دمتیلاسیون در تسهیم و در مرحله بلاستوسیست جنین موش رخ می‌دهد، اگر چه این امر ژن‌های انگشت‌برداری شده را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد.

دلیل وجود انگشت‌برداری مشخص نیست. تعداد کمی، در حدود ۸۰ ژن در پستانداران، معین شده است که انگشت‌برداری می‌شوند. اما ژن‌های تنظیم شده در این روند، در کنترل رشد و تکوین جنین نقش دارند. این مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که یک ارتباط احتمالی بین کنترل رشد و منشأ پدری یا مادری ژن‌ها وجود دارد.

یک یافته خیلی خوب: کروموزم X با جبران مقداری[1] تنظیم می‌شود

نرها یک و ماده‌ها دو تا کروموزوم X دارند. به دلیل این اختلاف در تعداد کروموزوم‌های X در دو جنس، جنین ماده به طور بالقوه دوبرابر محصولات بیشتری که با کروموزوم X رمز می‌شوند را نسبت به جنین نر می‌سازد. مقدار دو برابر محصولات کروموزوم X سمی بوده و مکانیسم‌های زیادی در خیلی از گونه‌ها، شامل انسان، برای بازیابی تعادل حیاتی بیان ژن کروموزم جنسی به کار رفته‌اند. در حدود ۴ روز بعد از لقاح، جنین‌های پستانداران از یک غلاف سلول خارجی که بافت خارج جنینی مثل جفت را شامل می‌شوند و یک توده سلولی داخلی که جنین را می‌سازد، تشکیل شده است. در این مرحله، یکی از دو کروموزوم X یا X_m از والد مادری یا X_P از والد پدری) در همهٔ سلول‌های جنین ماده، فوق‌العاده متراکم شده و از لحاظ نسخه‌برداری غیرفعال می‌شود. نصف سلول‌ها با کروموزوم X_P فعال هستند، نیمهٔ دیگر با کروموزوم X_m فعال هستند. غیرفعال شدن X یک **مکانیسم جبران مقداری** است که ماده‌ها و نرها تولید سطوح یکسانی از محصولات ژن کروموزوم X را می‌کنند. بار اول که یک سلول جنینی غیرفعال شدن X را می‌گذراند، کروموزوم X مشابه (X_m یا X_P) فعال باقی می‌ماند و بقیه در همهٔ زاده‌های آن سلول غیرفعال باقی می‌مانند. بنابراین همهٔ ژن‌ها تا اندازه‌ای موزائیک ژنتیکی هستند، زیرا نصف سلول‌های آنها دارای کروموزوم X_m فعال و نصف دیگر دارای X_P فعال هستند. چون دو کروموزوم X به طور متوسط در ۱ در ۱۰۰۰ جفت باز متفاوت هستند، سلول‌های افراد ماده با توجه به ژن‌های وابسته به کروموزوم X فعال، مشابهت زیادی نخواهند داشت. در مقابل نرها دارای کروموزوم فعال مشابه در همهٔ سلول‌ها هستند.

جبران مقداری پستانداران نیاز به ناحیه‌ای از کروموزوم X که مرکز غیرفعال سازی X نامیده می‌شود، دارد (شکل ۲۲-۷a). در این ناحیه ۲ ژن وجود دارند، Tsix و Xist که هر دو RNA طویلی را کد می‌کنند. چون ژن‌ها روی هم می‌افتند و در مسیر مخالف نسخه‌برداری می‌شوند، محصولات RNA آنها با یکدیگر آنتی سنس هستند (بنابراین نام معکوس دارند). Xist RNA که تنها در یکی از دو کروموزوم X سلول ماده ساخته می‌شود، کاملاً کروموزومی که از آن ساخته شده است را می‌پوشاند. از آنجایی که Xist RNA نمی‌تواند به کروموزوم دیگر X برود، آن کروموزوم X دیگر پوشانده نشده و در نتیجه فعال باقی می‌ماند.

مکانیسم راه‌اندازی بیان ژن Xist از یک کروموزوم کاملاً شناخته نشده است. عناصر کنترلی نزدیک[2] در مرکز غیرفعال

1- Dosage compensation

2- Cis-acting control elements

سازی X در هر دو کروموزوم X در سلول‌های ماده حضور دارند (شکل ۷b-۲۲). یک سرنخ دربارهٔ فرآیند sensing از مشاهداتی حاصل می‌شود که مراکز غیرفعال شدن دو کروموزوم X در سلول‌های ماده قبل از این که یک کروموزم X غیرفعال شود، به طور موقت هم محل[1] می‌شوند. این هم محل شدن ممکن است باعث (۱) بیان پائین Tsix از کروموزومی شود که غیرفعال خواهد شد که منجر به (۲) خاموشی نسخه‌برداری وابسته به کروماتین Xist شود و به دنبال آن (۳) موجی از بیان بالای Xist به وجود می‌آید که منجر به غیرفعال شدن کروموزوم می‌شود.

بعد از تولید RNAی Xist، پروتئین‌های گروه چند شانه[2] باقیمانده‌های لیزین ۲۷ بر روی دم هیستون H_3 از کروموزوم X پوشیده شده با Xist را تغییر می‌دهند. این تغییر و بقیه تغییرات اولیه مجموعه‌ای از تغییرات کروماتینی به راه می‌اندازند که منجر به تراکم کروماتین و غیرفعال شدن نسخه‌برداری می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۲۲.۲

گامتوژنز و لقاح

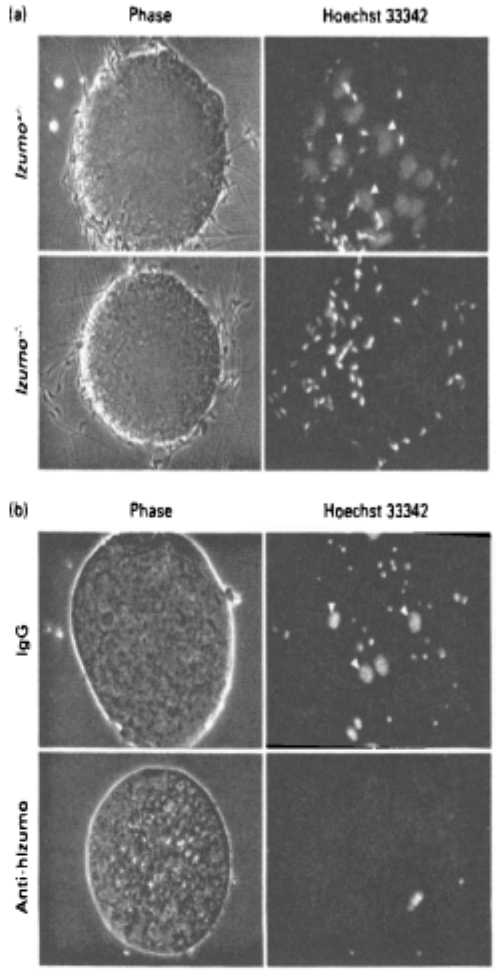
- در جنین‌زایی اولیه، سلول‌های زاینده اولیه به گنادها مهاجرت می‌کنند و شروع به تولید گامت‌ها (اووسیت یا اسپرم) در زهدان (utero) می‌نمایند، اما این سلول‌ها کامل نمی‌شوند.
- در اووژنز پستانداران، اووسیت‌های اولیه در داخل جنین در حال تشکیل در مرحله میوز متوقف و در تخمدان ذخیره می‌شوند. بعد از لقاح آنها میوز را تکمیل نموده و اووسیت‌های بالغ هاپلوئید ایجاد می‌کنند (شکل ۳a-۲۲). اووسیت‌ها حاوی منبعی از میتوکندری، mRNAها و بقیه مواد لازم برای تکوین اولیه هستند.
- در اسپرماتوژنز پستانداران پیش‌سازهای رده زایا در جنین تشکیل می‌شوند و در بیضه ذخیره می‌شوند. این سلول‌های دیپلوئید بعد از تولد میوز انجام داده و اسپرماتیدهای هاپلوئید ایجاد می‌کنند (شکل ۳b-۲۲). حاصل تمایز اسپرماتیدها (اسپرمیوژنز) اسپرم بالغ، سلولی با یک تاژک طویل و هستهٔ فشرده، است.
- طی لقاح، اسپرم ابتدا لایه گرانولی (زوناپلاسیدا) در خارج اووسیت را تشخیص داده و به آن متصل می‌شود. این برهمکنش، که گلیکوپروتئین‌های زوناپلاسیدا (مثل ZP3) و پروتئین‌های سطح اسپرم را درگیر می‌کند، واکنش آکروزومی را در اسپرم راه‌اندازی می‌کند. آنزیم‌های آزادشده از آکروزوم اسپرم زوناپلاسیدا را تجزیه می‌کنند و منجر به ادغام غشای پلاسمایی اسپرم و تخمک می‌شوند (شکل ۵-۲۲).
- لقاح باید به یک سلول اسپرم محدود شود تا از عدم تعادل کروموزوم جلوگیری کند. ادغام اسپرم - تخمک تغییراتی در اووسیت القاء می‌کنند که از ورود اسپرم‌های دیگر جلوگیری می‌کند.
- گرچه اسپرم و اووسیت هر کدام یک ژنوم هاپلوئید به اشتراک می‌گذارند، ولی نقش‌پذیری ژنی فعالیت همهٔ آلل‌ها در یک سلول را محدود می‌کند. در بعضی ژن‌های نقش‌پذیر، نسخه پدری در جنین فعال و نسخه مشابه مادری غیرفعال است و بالعکس.
- نرها با یک کروموزوم X زنده‌اند، اما دو کروموزوم X در ماده‌ها منجر به تولید دوبرابر محصولات ژنی X می‌شود که مضر است. این حالت در زن‌ها با غیرفعال شدن یکی از دو کروموزوم X در هر سلول جنین اولیه جلوگیری شده است، که فرآیند جبران مقداری نامیده می‌شود (شکل ۷-۲۲).

۳-۲۲ تنوع سلولی و الگوبندی اولیه جنین‌های مهره‌داران

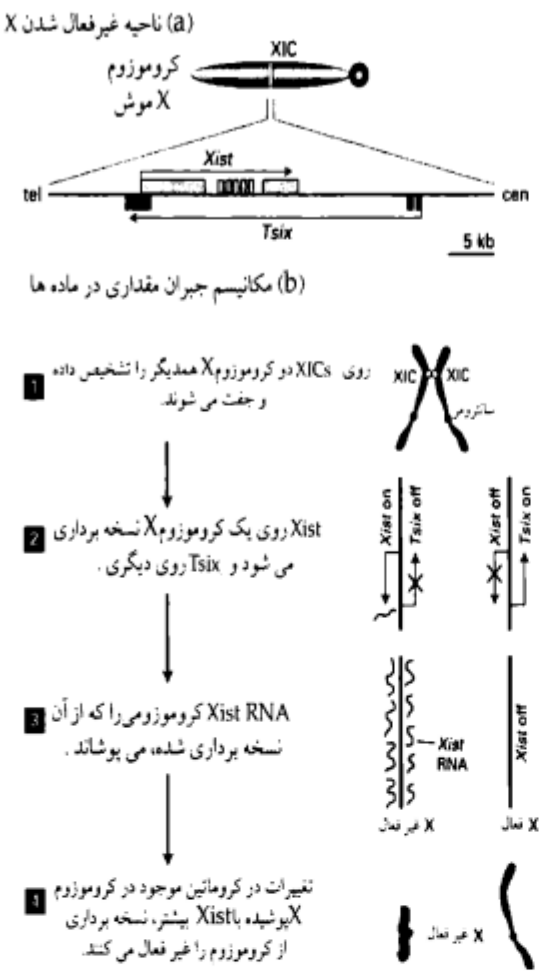
لقاح، یک سلول منفرد (تخم)، باعث می‌شود که سریعاً تقسیم شود. طی روزهای کمی، سلول‌های شکل گرفته جدید، شروع به ارسال و دریافت پیام‌هایی می‌کنند که سرنوشت آینده آنها را تعیین می‌کند. اولین تفاوت‌ها به نظر می‌رسد که ۲ نوع سلول و سپس قطبی‌شدن جنین در امتداد محورهای مختلف باشد. در این زمان، تفاوت‌های بیشتر منجر به شکل‌گیری لایه‌های چندگانه سلولی می‌شود که بافت‌ها و اندام‌های مختلف ایجاد نمایند. بیشتر این تعیین سرنوشت‌های اولیه نیاز به سیستم‌های پیامی دارد که در فصول ۱۵ و ۱۶ بحث شد. عمومی‌ترین آنها آن است که تعداد کمی سلول شروع به تولید پیام می‌کنند و بقیه سلول‌ها گیرنده‌هایی تولید خواهند کرد که آنها را به پذیرنده پیام تبدیل می‌کند. سپس دریافت پیام تولید فاکتورهای نسخه‌برداری را القا می‌کند که بیان ژن‌ها را برای کنترل سرنوشت سلول دریافت کننده تنظیم می‌نماید.

1- Co-localize

2- Polycomb-group proteins



▲ **شکل ۶-۲۲. یک پروتئین غشایی اسپرم ادغام غشای اسپرم - تخمک را میانجیگری می‌کند.** Izumo، یک پروتئین در غشای پلاسمایی اسپرم انسان و موش، ادغام بین غشاهای اسپرم و اووسیت را تسهیل می‌کند. (a) تخمک هامستر از طریق زوناپلاسیدای خود با اسپرم هتروزیگوت $Izumo^{+/-}$ یا هموزیگوت $Izumo^{-/-}$ باردار می‌شود. این شکل میکروگراف‌های فاز کنتراست یک تخمک را نشان می‌دهند که با چند اسپرم احاطه شده‌اند. ۶ ساعت بعد از آبستنی ماده، هوخست 33342، که سر اسپرم را آبی رنگ می‌کند، به محیط اضافه می‌شود. در اسپرم $Izumo^{+/-}$، پیکان سفید سرهای باد کرده اسپرم را که با تخمک واکنش می‌دهند بعد از رنگ‌آمیزی با هوخست 33342 را نشان می‌دهند. هیچ ادغامی با اسپرم $Izumo^{-/-}$ مشاهده نشد. (b) در آزمایش دوم، تخمک‌های فاقد زونای هامستر با اسپرم تیپ وحشی انسان در حضور آنتی Izumo انسانی (Anti hIzumo) یا آنتی بادی کنترل IgG باردار شدند. بعد از ۶ ساعت، نمونه‌ها با هوخست 33342 رنگ‌آمیزی شدند. ادغام در عدم حضور آنتی بادی Anti-Izumo (پیکان‌های سفید) مشاهده شد. اسپرم غیرفعال بلوک پلی‌اسپرمی ایجاد نمی‌کند.



▲ **شکل ۷-۲۲. جبران مقداری در پستانداران ماده.** در اوایل جنین‌زایی، یکی از کروموزوم‌های X ماده در ساختار کروماتینی ویژه فوق‌العاده متراکم می‌شود. این کروموزوم غیرفعال متراکم جسم بار نامیده می‌شود. مکانیسمی که حضور دو کروموزوم X را در جنین ماده نمایان می‌کند، شامل یک ناحیه در کروموزوم X است، مرکز غیرفعال سازی X، که در قسمت a ترسیم شده است. جفت انتقالی XICها در کروموزوم‌های پدری و مادری در ماده، فرآیند جبران مقداری مشخص شده را آغاز می‌کند. (b) از آنجا که جفت شدن و در نتیجه رویدادها به صورت تصادفی در هر سلول رخ می‌دهد، نصف سلول‌ها دارای X غیرفعال مادری و نصف دیگر دارای X غیرفعال پدری هستند. از آنجایی که جنین‌های نر تنها یک کروموزوم X دارند هیچ جفت شدگی XIC نمی‌تواند رخ دهد و هیچ RNAی xist تولید نمی‌شود، بنابراین غیرفعال‌سازی کروموزوم X وجود ندارد.

تسهیم منجر به اولین رویداد تمایزی می‌شود

تخم، یک سلول توتی پوتنت (چند توان) است به خاطر این که

قابلیت تولید همه انواع سلول‌های بدن را دارد. لقاح سریعاً با تسهیم، تقسیم سلولی قبل از لانه‌گزینی جنین در رحم، دنبال می‌شود (شکل ۱ـ۲۲). کروماتین متراکم غیرفعال از لحاظ نسخه‌برداری اسپرم با جایگزینی هیستون‌های ویژه اسپرم با هیستون‌های طبیعی که توسط اووسیت فراهم می‌شود، به حالت عادی بر می‌گردد.

در آغاز، سلول‌ها نسبتاً کروی هستند و توانایی اتصال به دیگر سلول‌ها را از دست می‌دهند (شکل ۸ـ۲۲). همان طوری که به صورت تجربی در گوسفند توصیف شد، هر سلول در مرحلهٔ ۸ سلولی دارای پتانسیل ایجاد یک حیوان کامل است. ۳ روز بعد از لقاح، جنین ۸ سلولی دوباره تقسیم می‌شود و **مورولای ۱۶ سلولی** ایجاد می‌کند. در مراحل بعدی تمایل ذاتی سلول‌ها افزایش می‌یابد و جنین متحمل فشردگی می‌شود. این فرآیند تا حدودی به مولکول‌های سطحی E-کادهرین وابسته است. (فصل ۱۹). **فشردگی**[1]، از افزایش چسبندگی سلول ـ سلول ناشی می‌شود و نتیجه آن توده سفتی از سلول‌ها (مورولای متراکم) می‌باشد. بعداً، بعضی از چسبندگی‌های سلولی تقلیل یافته و مایع شروع به حرکت به داخل حفرهٔ داخلی، **بلاستوسل**، می‌کند. تقسیمات اضافی **جنین مرحلهٔ بلاستوسیست** را تولید می‌کند که تقریباً از ۶۴ سلول تشکیل شده است که دارای دو نوع سلول هست: **تروفواکتودرم (TE)**، که بافت‌های خارج جنینی مانند جفت را ایجاد خواهد کرد و **توده سلولی داخلی (ICM)** که جنین را ایجاد خواهد کرد.

این که یک سلول به عنوان TE یا ICM در نظر گرفته می‌شود، با جایگاه آن در جنین اولیه تعیین می‌شود. این عامل به صورت تجربی با قراردادن یک سلول نشاندار در داخل یا خارج هر جنین اولیه می‌تواند اثبات شود (شکل ۹ـ۲۲). تقریباً سلول‌های نشاندار قرار داده شده در خارج منحصراً بافت‌های خارج جنینی (TE fate) را تولید می‌کنند و آنهایی که به داخل وارد شدند، ترجیحاً بافت‌های جنینی را تولید می‌کنند (ICM fate). آنالیز ریزآرایه DNA از بیان ژن در هر مرحلهٔ تکوین اولیه تغییرات برجسته‌ای در بیان ژن‌هایی که از مرحلهٔ دو سلولی تا مرحله بلاستوسیست نقش دارند را آشکار کرد.حتی این جنین‌های خیلی اولیه از مسیرهای پیام‌رسانی wnt، Notch و TGFβ استفاده می‌کنند.

هر دوی سلول‌های TE و ICM دارای خواص سلول بنیادی هستند به این معنی که هر کدام خود تجدیدی نموده و شروع به ایجاد دودمان مجزایی می‌کنند که جمعیت‌های متنوعی از سلول‌های تمایز یافته را تولید می‌نمایند. توده سلولی داخلی (ICM)، منبع **سلول‌های بنیادی جنینی**[2] **(ES)** هستند که در هر قسمت جنین شرکت می‌کنند (شکل ۷ـ۲۲). جداسازی این سلول‌ها به عنوان یک رده سلولی، پیشرفت‌های حیرت انگیزی در دستکاری ژنتیکی موش ایجاد کرده است. اولین علامت شناخته شده سرنوشت ICM، بیان ژن Oct4 می‌باشد که تنظیم کننده ضروری حفظ سلول‌ها در حالت پرتوان است.

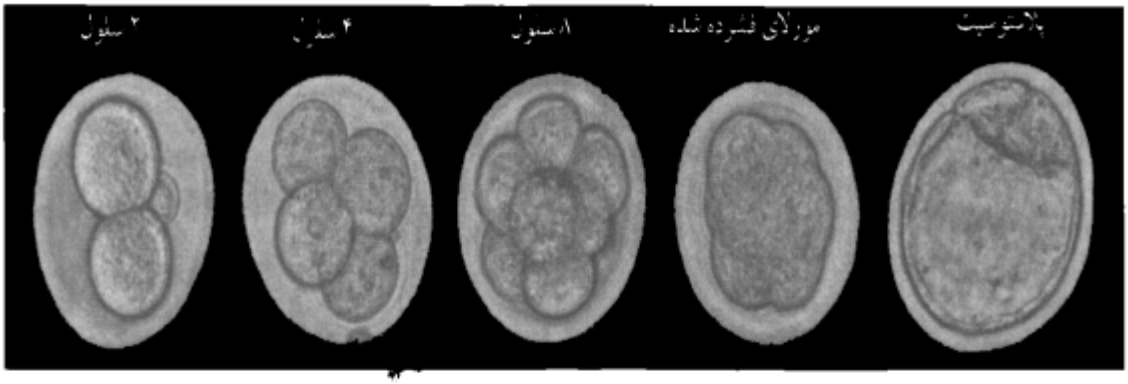
همانطور که در شکل ۹aـ۲۲ نشان داده شده، سلول‌های ICM در یک طرف بلاستوسل واقع شده‌اند در حالی که سلول‌های TE یک توپ توخالی در اطراف ICM و بلاستوسل ایجاد می‌کنند. در این مرحله، بلاستوسیست با اتصالات سلول ـ سلول بین سلول‌های مجاور در یک صفحه اپی‌تلیالی سازماندهی شده‌اند. در مقابل، سلول‌های ICM یک توده شلی هستند که به عنوان **مزانشیم**، اصطلاح رایج برای سلول‌هایی که اتصالات شل داشته و سازماندهی شلی دارند، توصیف می‌شوند. طی تکوین، سلول‌ها انتقال مزانشیم ـ اپی‌تلیال و یا بالعکس را می‌گذرانند. سلول‌های اپی‌تلیالی، صفحه‌ای ایجاد می‌کنند که به عنوان یک سد عمل کرده، حرکت هماهنگ داشته، و خاصیت قطبی واضحی از یک جهت صفحه به جهت دیگر دارند. سلول‌های مزانشیمی به صورت تکی عمل می‌کنند و به فشار یکسان کمتر پاسخ می‌دهند. این سلول‌ها با توانایی برای جداشدن از همدیگر، به صورت سلول‌های منفرد مهاجرت می‌کنند، اندام جدیدی ایجاد می‌کنند، سلول‌های خونی گردش خون را ایجاد می‌کنند و در یک تودهٔ سه بعدی مانند توده سلول داخلی می‌چسبند.

ژنوم اغلب سلول‌های سوماتیک کامل است

برای ژنوم در مراحل اولیه جنینی چه اتفاقی می‌افتد؟ گرچه بخش‌های مختلف ژنوم در سلول‌های مختلف نسخه‌برداری می‌شوند ولی به نظر می‌رسد که خود ژنوم تقریباً در همه سلول‌ها مشابه باشد. یک استثنا مستند شده، طی تکوین لنفوسیت از پیش‌سازهای خونی رخ می‌دهد. قطعاتی از ژنوم طی تکوین لنفوسیت از دست رفته یا بازآرایی می‌شود و کلون‌هایی از لنفوسیت که ژنوم یکسان دارند را تولید می‌کند (فصل ۲۴). همچنین، اریتروسیت‌های بالغ (سلول‌های قرمز خون) فاقد هسته هستند و ژنوم هسته‌ای ندارند. اما به نظر می‌رسد اغلب سلول‌های سوماتیک دارای یک ژنوم دست نخورده، برابر با آن که در رده زایا وجود دارد، هستند.

شواهدی که حداقل بعضی سلول‌های سوماتیک دارای ژنوم کامل و عملکردی هستند از تولید موفق حیوانات کلون شده، توسط

1- Compaction 2- Embryonic stem cells



▲ **شکل ۸ـ۲۲. تقسیم تسهیم در جنین موش:** طی این تقسیمات رشد سلولی کمی وجود دارد، بنابراین سلول‌ها به طرز پیش رونده‌ای کوچک می‌شوند. متن را ملاحظه بفرمائید.

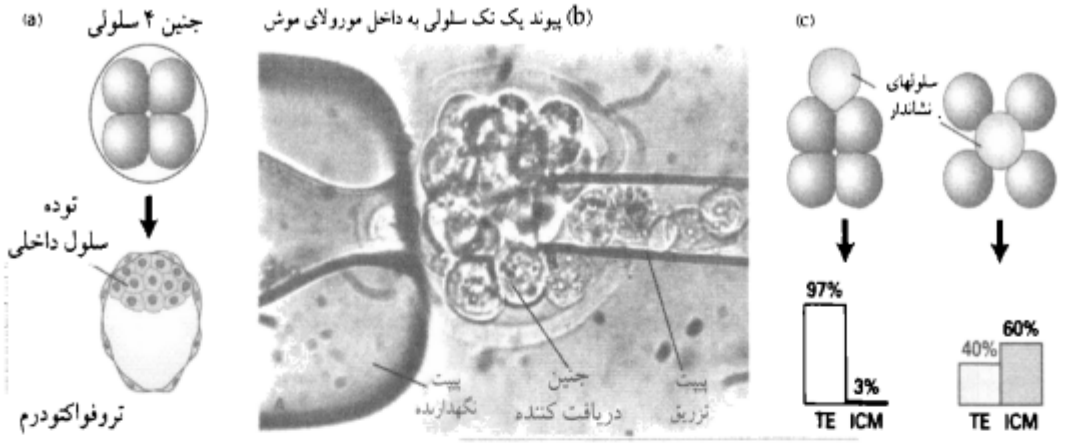
کلونینگ انتقال هسته، به دست می‌آید. در این روش، هسته از یک سلول بالغ (سوماتیک) به تخمک که خودش فاقد هسته شده است وارد می‌شود. سپس تخم دستکاری شده، که شامل تعداد دیپلوئید کروموزوم است و معادل تخم است در داخل یک مادر پرورش دهنده کاشته می‌شود. تنها منبع اطلاعات ژنتیکی برای هدایت تکوین جنین، ژنوم هسته‌ای از سلول سوماتیک دهنده است. نقص مکرر برخی آزمایشات کلونینگ سئوالاتی را درباره این که چطور بعضی سلول‌های بدنی دارای ژنوم فعال هستند، ایجاد می‌کند. حتی در موارد موفقیت، گوسفند کلون شده معروف «دالی» بعضی مسائل پزشکی وجود دارد حتی اگر سلول‌های تمایزیافته دارای ژنوم کامل فیزیکی باشند، به وضوح تنها برخی پروتئین‌های آن از لحاظ نسخه‌برداری فعال هستند (فصل‌های ۶ و ۷). برای مثال یک سلول می‌تواند دارای ژنوم دست نخورده باشد، اما به واسطهٔ وضعیت‌های کروماتینی به ارث رسیده قادر نخواهد بود به صورت صحیح مجدداً فعال شود.

شواهد بیشتر که ژنوم سلول تمایز یافته می‌تواند به داشتن خاصیت پتانسیل تکوینی یک سلول بنیادی جنینی برگشت کند، از آزمایش‌هایی که نورون‌های حسی تمایز یافته بویایی از لحاظ ژنتیکی باپروتئین فلورسانس سبز (GFP) نشاندار شده و سپس به عنوان سلول دهنده استفاده شدند، به دست می‌آید. زمانی که هسته سلول‌های تمایزیافته بویایی به داخل اووسیت بدون هسته موش کاشته می‌شود، ۱۴ درصد اووسیت‌ها به بلاستوسیست‌هایی که GFP تولید می‌کنند، تکوین می‌یابند. این بلاستوسیست‌های نشاندار شده با GFP برای اشتقاق رده‌های سلولی بنیادی جنین (ES) که سپس برای تولید جنین‌های موش استفاده می‌شوند، به کار می‌روند. بعد از کاشت در موش ماده، این جنین‌ها که کاملاً از ژنوم نورون بویایی مشتق شده‌اند، موش‌های سالمی ایجاد می‌کنند. بنابراین ژنوم سلول‌های تمایزیافته می‌تواند به صورت کامل برای تشکیل بافت‌های موش مجدداً برنامه‌ریزی شود.

گاسترولاسیون لایه‌های چندگانه سلولی ایجاد می‌کند که قطبی می‌شوند.

سلول‌های جنینی تشکیل دهنده توده سلولی داخلی بلاستوسیست دارای توانایی‌های مؤثری هستند، اما به سختی شبیه یک جنین به نظر می‌رسند. به زودی بعد از اینکه بلاستوسیست در داخل جدار رحم لانه‌گزینی می‌کند، توده در هم پیوسته سلول‌های ICM به ساختار چندلایه‌ای با قطبیت جلویی – عقبی، سری ـ دمی و چپ ـ راست بر می‌گردد. همانطور که در شکل ۱۰ـ۲۲ شرح داده شد، توده سلولی داخلی به صورت اولیه به دو لایه که هیپوبلاست و اپی‌بلاست نامیده می‌شوند، مجزا می‌شود. اپی‌بلاست جنین کامل را ایجاد خواهد کرد. هیپوبلاست، ساختارهای خارج جنینی که با گردش خون مادر ارتباط برقرار می‌کنند را ایجاد می‌کند. بقیه ساختارهای خارج جنینی، از تروفواکتودرم تشکیل خواهند شد که بعد از لانه‌گزینی، تروفوبلاست نامیده می‌شوند.

در موش که تشکیل مهره‌ها وسیعاً مطالعه شده است، اولین علامت محور جلویی ـ عقبی در روز ۶/۵ نمایان می‌شود (هفته دوم در انسان). در این زمان شیار قابل مشاهده، خط اولیه، در سطح اپی بلاست در ناحیه‌ای که عقب جنین خواهد شد، تشکیل می‌شود. سلول‌ها طی فرآیند گاسترولاسیون در امتداد خط اولیه لایه اپی‌بلاست را ترک کرده و به داخل فضای بین اپی‌بلاست و هیپوبلاست می‌روند (شکل ۱۱ـ۲۲). سلول‌های اولیه به داخل رفته، **آندودرم** جنینی را تشکیل می‌دهند و سلول‌هایی که بعداً می‌رسند، **مزودرم** می‌شوند. سلول‌هایی که به داخل نرفته تا مزودرم یا آندودرم



▲ **شکل ۲۲-۹ موقعیت سلول، سرنوشت سلول را در جنین اولیه معین می‌کند.** (a) یک جنین ۴- سلولی به صورت طبیعی به بلاستوسیست شامل تروفواکتودرم (TE) سلول‌های خارج و ICM سلول‌های داخلی تکوین می‌یابد. (b) برای کشف این که آیا موقعیت، سرنوشت سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، آزمایشات پیوند با جنین موش انجام شد. اول، سلول‌های جنین مرحله مورولا گیرنده برداشته شده و در اتاق برای پیوند نگهداری شدند. سپس جنین مرحله مورولای دهنده توسط رنگی که بین سلول‌ها انتقال نمی‌یابد، خیسانده شدند. سرانجام همان طور که در میکروگراف نشان داده شده است سلول‌های نشاندار از جنین‌های دهنده به داخل ناحیهٔ خارجی جنین‌های گیرنده تزریق شدند. جنین گیرنده در یک جا توسط حفرهٔ کوچک به کار رفته در پیپت نگهدارنده نگهداری می‌شود. (c) سرنوشت بعدی سلول‌های حاصل از سلول‌های نشاندار پیوند شده، کنترل شدند. برای سهولت، سلول‌های گیرنده چهارسلولی رسم شده‌اند، گرچه جنین مرحله مورولا (۱۶ سلولی) به عنوان دهنده و گیرنده استفاده شدند. نتایج خلاصه‌شده در گراف‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های خارج به شدت تروفواکتودرم را تشکیل می‌کنند و سلول‌های داخلی تمایل دارند ICM شوند، اما به صورت قابل ملاحظه‌ای تروفواکتودرم را ایجاد می‌کنند.

را ایجاد نمایند، پشت اپی‌بلاست باقی مانده و **اکتودرم** می‌شوند. جنین کامل بعد از گاسترولاسیون دارای سه لایه قطبی شده در امتداد محور پشتی ـ شکمی و جلویی ـ عقبی است. اکتودرم، سلول‌های پوستی و عصبی را خواهد ساخت، مزودرم، ماهیچه، بافت پیوندی و خون را خواهد ساخت و آندودرم اپی تلیوم روده را خواهد ساخت.

وقتی که سه لایه زایا ایجاد می‌شوند، آنها به جمعیت‌های سلولی با سرنوشت‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند. همچنان که تکوین انجام می‌شود، به نظر می‌رسد که محدودیت پیشرونده‌ای در دامنهٔ انواع سلولی که از سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز می‌تواند به وجود آید، ایجاد می‌شود. همان طور که دیده‌ایم، سلول‌های بنیادی اولیه، می‌توانند هر نوع سلولی را تشکیل دهند. سلول اکتودرمی دارای سرنوشت نورونی یا اپیدرمی می‌باشد؛ پیش‌ساز کراتینوسیت توانایی تشکیل نورون را ندارد بلکه تشکیل پوست را می‌دهد. این مشاهدات دو سؤال مهم را ایجاد می‌کنند: چطور سرنوشت سلول‌ها طی تکوین محدود می‌شود؟ آیا این محدودیت‌ها غیرقابل برگشت هستند؟ سئوالات این چنینی آزمایشات پیوندی را مخاطب قرار می‌دهند، این که یک سلول وقتی به جایگاه غیرطبیعی در جنین حرکت می‌کند،چطور عمل خواهد کرد. آیا سرنوشت جایگاه قبلی را خواهد داشت یا این که سرنوشت اختصاصی جایگاه جدید را به دست می‌آورد؟ برای پاسخ به چنین سئوالاتی، مهم است به خاطر آوریم که چطور یک سلول در جایگاه طبیعی *In Vivo* خود، اگر به صورت تجربی دستکاری شود، ممکن است از سلول دیگر در همان جایگاه متفاوت باشد. بنابراین، محدودیت‌های مشاهده شده در یک سلول ممکن است در نتیجه مکانیسم‌های تنظیمی طبیعی باشد و یا انعکاسی از ناتوانی در یافتن شرایطی باشد که توانایی کامل سلول را بروز دهد.

سرنوشت اجزای متفاوت جنین اولیه در روزهای اولیه جنین‌زایی با نشاندارکردن سلول‌های جنین دوزیستان یا جوجه با جوهر و ردیابی آنها تعیین شد. اخیراً حیوانات کایمر متشکل از سلول‌های جوجه و بلدرچین برای مطالعه و تعیین سرنوشت سلول طی تکوین جنینی استفاده شده است. جنین تشکیل شده از سلول‌های هر دو گونه پرنده به طور طبیعی تکوین پیدا می‌کنند اما سلول‌های مشتق از هر دهنده در زیر میکروسکوپ قابل تشخیص هستند. بنابراین مشارکت سلول‌های متفاوت دهنده به پرنده نهایی می‌توانند معین شوند. علاوه بر این آزمایش که کدام سلول‌ها می‌توانند چه نوع بافتی ایجاد کنند، انعطاف‌ناپذیری سرنوشت سلول را نیز می‌توان آزمایش کرد. زمانی که سلول‌ها از یک لایه زایا به لایه زایای دیگر پیوند می‌شوند، نمی‌توانند سلول‌های

متناسب با جایگاه جدید را ایجاد کنند. بنابراین اکتودرم، مزودرم و آندودرم نه تنها از لحاظ مورفولوژیک متفاوت هستند، بلکه به عنوان انواع سلول مختلف با سرنوشت متفاوت هستند.

در مهره‌داران، پیام‌های پروتئینی ترشح شده به طور مستقیم نه تنها در تشکیل لایه‌های زایا، بلکه در قطبی شدن آنها در طول محور بدن درگیر هستند. در ادامه بخش ۲۲.۳، ما نقش پیام‌های ترشحی و آنتاگونیست‌های آنها را در تکوین اولیه بررسی کردیم.

گرادیان‌های پیام ممکن است سرنوشت‌های متفاوت سلولی را القاء کند.

مطالعات آشکارکننده و گسترده‌ای درباره گاسترولاسیون و تشکیل بافت‌های اولیه در نوزاد **گزنوپوس لویس** (اغلب به عنوان قورباغه توصیف شده است) انجام شده است. با جداکردن و پیوند زدن بافت‌های گزنوپوس، زیست شناسان تکوینی پیام‌های قوی که سرنوشت سلول را به طور مستقیم در جنین اولیه تعیین می‌کنند، مشخص کرده‌اند. بعضی از این پیام‌ها مشخص شد که در روشی مشابه در جنین‌های اولیه پستانداران عمل می‌کنند.

تخمک **گزنوپوس** بزرگ است و در حدود یک میلی‌متر ضخامت دارد. بعد از لقاح، این سلول بزرگ بدون رشد کردن تقسیم پیدا می‌کند و سلول‌های کوچک‌تر از نظر اندازه ایجاد می‌کند. در آغاز جنین توپی از سلول‌ها است، و حفره بلاستوسل در داخل توپ باز می‌شود. سلول‌ها در یک انتهای جنین بزرگ‌تر هستند، این جهت جنین، **قطب گیاهی**[1] نامیده می‌شود، سلول‌ها در انتهای مخالف جنین کوچک‌تر هستند و این جهت به عنوان **قطب حیوانی**[2] شناخته شده است. مارکرهای مولکولی و مورفولوژیکی به وضوح قطبی‌شدن جنین در مرحله بلاستولای میانی را آشکار می‌کنند. برای مثال، پروتئین‌های VegT و Vg-1 مارکرهای قطب گیاهی هستند. پروتئین β-کاتنین در جهتی که قسمت پشتی جنین خواهد شد، در سطوح بالایی جمع می‌شود. موقعیت گردهم آمدن β-کاتنین جایگاه ورود اسپرم را کنترل می‌کند. همان طور که در فصل ۱۶ دیده‌ایم، β-کاتنین به عنوان فاکتور نسخه‌برداری فعال شده با پیام Wnt است (شکل ۳۲-۱۶). حتی در غیاب پیام Wnt، گردهم آمدن β-کاتنین می‌تواند القاء ژن‌های ویژه را راه‌اندازی کند.

انباشتگی β-کاتنین اولین شاخص شناخته شدهٔ محور پشتی شکمی قورباغه است. مهم‌تر این که، β-کاتنین برای تشکیل دو مرکز نشر پیام در جهت پشتی بلاستولای تأخیری: **مرکز نیوکوپ**[3] و مراکز BCNE[4] (**بیان نوگین و کوردین بلاستولایی**) ضروری است (شکل ۱۲-۲۲). **مرکز نیوکوپ** در جایی که Vg-1 و VegT و سطوح بالای β-کاتنین روی هم می‌افتند، به عبارتی در قسمت گیاهی طرف پشتی، تشکیل می‌شود. قسمتی از آندودرم آینده در این جایگاه قرار دارد. مرکز نیوکوپ **پروتئین‌های نودال**[5] که عضوی از خانواده TGFβ از پیام‌های پروتئینی ترشحی هستند، را آزاد می‌کنند (فصل ۱۶). مرکز BCNE جایی را که سلول‌های اکتودرمی-عصبی آینده به وجود خواهد آمد، ایجاد می‌کند. این مرکز از طریق بیان ژن‌های رمزکننده بعضی از فاکتورهای نسخه‌برداری به علاوهٔ **کوردین و نوگین** قابل ردیابی است. این دو پروتئین ترشح شده، آنتاگونیست پروتئین‌های شکل دهنده استخوان (BMPs)[6]، عضو دیگری از خانواده TGFβ، هستند. بنابراین مرکز BCNE به طور ویژه در جلوگیری از عمل BMP درگیر است. کمی بعدتر در ناحیهٔ استوایی، در جنین مرحله گاسترولا، سلول‌های کمربند مرکزی که بین اکتودرم در قطب حیوانی و آندودرم در قطب گیاهی ایجاد می‌شوند به مزودرم تبدیل می‌شوند. طی گاسترولاسیون گزنوپوس، سلول‌های تشکیل دهنده آندودرم و مزودرم آینده با مجموعه فرآیندهای مشابهی که در جنین پستانداران رخ می‌دهد به سمت داخل می‌روند (شکل ۱۱-۲۲).

امروزه می‌دانیم که مزودرم با پیام‌هایی، به ویژه پروتئین‌های پیام‌رسان TGFβ، القاء می‌شود. در جستجو به دنبال فاکتورهای القایی مزودرم، محققین هر چیزی را به ظرف حاوی جنین اولیه قورباغه اضافه کردند. تعداد قابل ملاحظه‌ای از مولکول‌ها برای القاء سلول‌های مزودرم یافت شدند، حتی خیلی از آنها احتمالاً نمی‌توانند القاء کننده طبیعی باشند. برای این که یک مولکول به عنوان القاء کننده طبیعی بررسی شود، سه معیار باید در نظر گرفته شود. ۱) مولکول برای القاء مزودرم، ضروری باشد (بر اساس مداخله یا جهش قرار دارد)، ۲) برای القاء سلولی که سرنوشت مزودرمی ندارد به مزودرم کافی باشد (بر اساس آزمایشهای بیان نابجا[7]، به عبارتی، بیان در جایگاه‌های غیرعادی) و ۳) در زمان و مکان مناسب در جنین طبیعی تولید شده باشد (بر پایه رنگ‌آمیزی با آنتی بادی یا دورگه‌سازی در داخل). مولکول‌های زیادی مناسبند، اما بعضی از

1- Vegetal pole 2- Animal pole
3- Nieuwlkoop
4- Blastula chordin and noggin expression
5- Nodal proteins
6- Bone morphogenetic proteins (BMPs)
7- Ectopic

پروتئین‌های TGFβ آنها را انجام می‌دهند.

در بعضی موارد، در القاء سرنوشت سلول‌ها دو گزینه درگیر است: در حضور یک پیام، سلول به صورت مستقیم یک مسیر تکوینی را انجام می‌دهد: به نظر می‌رسد که در غیاب پیام سلول سرنوشت تکوینی متفاوتی دارد و یا اصلاً در تکوین نقص پیدا می‌کند. بعضی پیام‌ها در **یک روش رله‌ای**[1] عمل می‌کنند. به عبارتی، یک پیام آبشاری القایی برای سلول‌های نزدیک به منبع پیام ایجاد می‌کند که سرنوشت ویژه‌ای را تقبل نموده و در عوض آنها پیام‌های دیگری برای سازماندهی سلول‌های مجاور تولید می‌کنند (شکل ۱۳a-۲۲). منحصراً یک پیام ممکن است بسته به غلظت خود سرنوشت‌های سلولی مختلفی را القاء کند. در این روش گرادیانی، سرنوشت سلول دریافت‌کننده با مقدار پیام دریافتی که وابسته به فاصلهٔ آن از منبع پیام است، تعیین می‌شود (۱۳b-۲۲). هر ماده‌ای که می‌تواند پاسخ‌های متفاوت وابسته به غلظت خود ایجاد کند به عنوان **مورفوژن** اطلاق می‌شود.

غلظتی که یک پیام پاسخ ویژه سلولی را ایجاد می‌کند، **آستانه** نامیده می‌شود. پیام با شیب منظم، یا مورفوژن، چندین آستانه را نشان می‌دهد که هر کدام با پاسخ ویژه‌ای در سلول دریافت کننده مطابقت دارد. برای مثال غلظت پایین پیام القائی، باعث می‌شود یک سلول سرنوشت A را بگیرد و غلظت بالای همان پیام باعث می‌شود آن سلول سرنوشت B را بگیرد. در روش گرادیان پیام‌رسانی، پیام جدیداً ایجاد می‌شود و بنابراین به میزان برابر به همه جا نمی‌رسد. منحصراً، می‌تواند در یک انتهای زمینه سلول‌ها تولید شود و در انتهای دیگر نابود شده و یا غیرفعال شود. (نظریه منبع و ظرف) بنابراین توزیع شیب‌دار حفظ می‌شود.

مطالعات با اکتیوین، (یک پروتئین پیام‌رسان TGFβ که سرنوشت سلول را در جنین‌های اولیه **گزنوپوس** تغییر می‌دهد)، بینش‌هایی درباره این که چطور سلول‌ها غلظت یک پیام القائی دارای شیب را تعیین می‌کنند، فراهم نموده است. اکتیوین به سازماندهی مزودرم در امتداد محور پشتی ـ شکمی حیوان کمک می‌کند. ژن‌های ویژه‌ای به عنوان شاخص‌های تأثیرات پیام‌های ایجادکننده بافت، مانند اکتیوین استفاده می‌شوند. برای مثال، غلظت پایین اکتیوین بیان ژن گزنوپرس براشیوری[2] را در سراسر مزودرم اولیه القاء می‌کند. Xbra یک فاکتور نسخه‌برداری ضروری برای تکوین مزودرم است. غلظت‌های بالاتر اکتیوین بیان ژن (Xgsc) گزنوپوس گوسه کوئید[3] را القاء می‌کند. پروتئین Xgsc قادر به تغییر شکل مزودرم شکمی به پشتی است، بنابراین القاء موضعی Xgsc توسط اکتیوین باعث می‌شود سلول‌های مزودرمی پشتی بجای شکمی در نزدیک منبع اکتیوین شوند.

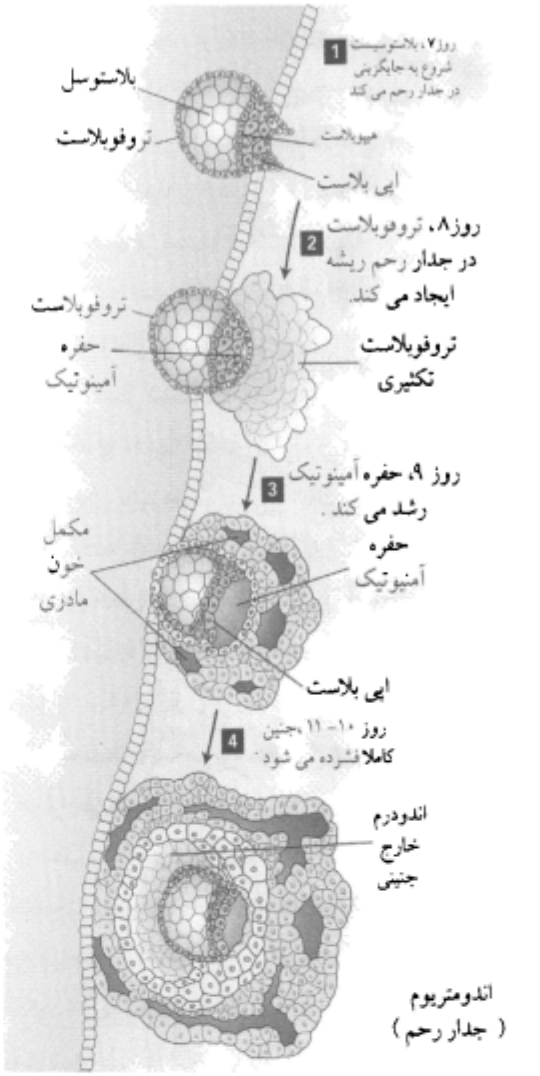
با استفاده از اکتیوین نشاندارشده با S35، دانشمندان نشان دادند که هر سلول بلاستولای گزنوپوس تقریباً ۵۰۰۰ گیرنده نوع II شبه TGFβ را تولید می‌کنند که به اکتیوین متصل می‌شوند. یافته‌ها از آزمایشات بیشتر نشان دادند که حداکثر بیان Xbra وقتی که در حدود ۱۰۰ گیرنده اشغال شوند، به دست می‌آید. در غلظتی از اکتیوین که ۳۰۰ گیرنده اشغال شوند، سلول‌ها شروع به بیان سطوح بالای Xgsc می‌کنند. نتایج مشابهی به صورت تجربی با دستکاری سلول‌های بلاستولا برای تولید هفت برابر بیشتر گیرنده نوع II اکتیوین به دست آمد. این یافته‌ها دلالت بر این دارند که سلول‌های بلاستولا تعداد واقعی گیرنده‌های متصل به لیگاند را بجای نسبت گیرنده‌های متصل شده به متصل نشده اندازه‌گیری می‌کنند و اهمیت غلظت پیام را تأیید می‌کنند.

آنتاگونیست‌های پیام سرنوشت سلول و القاء بافت را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

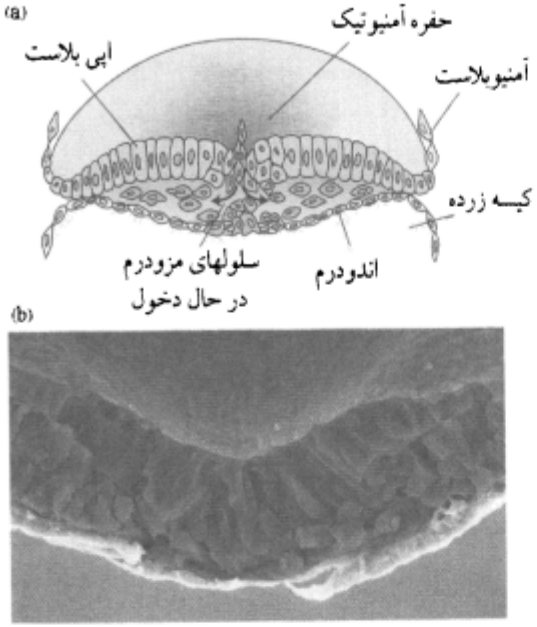
اغلب سلول‌های مزودرم پشتی در گاسترولای اولیه قورباغه به یک مرکز پیام‌رسانی مهم به نام **سازمان‌دهنده اسپمن**[4] تبدیل می‌شوند (شکل ۱۲-۲۲). این سازمان دهنده که توسط اسپمن[5] و مانگولد[6] در سال ۱۹۲۴ گزارش شد، می‌تواند در جنین میزبان پیوند شود، جایی که آن بخشی از جنین میزبان را کنترل می‌کند و باعث تشکیل تقریباً یک محور جدید کامل می‌شود (شکل ۱۴-۲۲). سازمان دهنده اسپمن تحت تأثیر پیام نودال و شاید پیام‌های دیگری از مرکز نیوکوپ تشکیل می‌شود.

سازمان دهنده اسپمن منبع تعداد قابل ملاحظه‌ای از پیام‌های آنتاگونیست ترشحی است. اینها شامل کوردین و نوگین (آنتاگونیست‌های BMP)، Frzb-1، کرسنت[7]، sFRP2 و Dkk-1 (آنتاگونیست‌های Wnt) و آنتاگونیست پیام چندگانه سربروس[8]، که اثرات پیام‌های Wnt و BMP و نودال را خاموش می‌کند، هستند. وقتی که نوگین برای جنین‌هایی که فاقد سازمان دهندهٔ اسپمن عملکردی هستند، به کار می‌روند، جنین‌ها به صورت طبیعی تکوین پیدا می‌کنند. این یافته نشان می‌دهند که خود نوگین می‌تواند اثر سازمان دهندهٔ اسپمن را تقلید کند. یک مرکز پیام‌رسانی

1- Relay mode
2- Xenopus branchyury
3- Xenopus goosecoid
4- Spemann organiser
5- Spemann
6- Mangold
7- Cresent
8- Cerberus



▲ **شکل ۱۰-۲۲ (شکل رنگی) تکوین انسان از روز ۷ تا ۱۱ بعد از لقاح.** لانه گزینی بلاستوسیست در جدار رحم در حدود روز ۷ رخ می‌دهد (شکل ۲۲.۱ را برای مراحل ابتدایی‌تر ببینید). بلاستوسیست قطبی می‌شود، ICM در یک انتها و بلاستوسل (حفره پر از مایع) در انتهای دیگر قرار می‌گیرند، هر دو در سلول‌های تروفواکتودرم که حالا به عنوان ترفوبلاست شناخته می‌شوند، محصور شده‌اند. در روز ۷، ❶ سلول‌های ICM شروع به مجزاشدن به دو لایه می‌کنند (هیپوبلاست، سبز، اپی بلاست، آبی)، اپی بلاست جنین کامل را ایجاد خواهد کرد و هیپوبلاست ساختارهای خارج جنینی (علاوه بر آنهایی که از تروفوبلاست ایجاد می‌شود)، می‌سازند. بعداً سلول‌های تروفوبلاست تکثیر می‌شوند و جدار رحم را مورد تهاجم قرار می‌دهد، ❷ که برای جنین برای دریافت تغذیه از مادر ضروری است ❸ در روز ۹، حفره آمنیوتیک (خاکستری)، که بین اپی‌بلاست و تروفوبلاست تشکیل می‌شود، بزرگ می‌شود ❹ روز ۱۰ تا ۱۱، جنین کاملاً لانه‌گزینی کرده و با سیستم گردش خون مادری حمایت می‌شود. آندودرم خارج جنینی (سفید) از هیپوبلاست مشتق می‌شود و کیسه زرده را ایجاد خواهد کرد، یادگاری از شجره تکاملی ما وقتی که اجدادمان به مقدار مشخصی زرده برای تغذیه جنین نیاز داشتند. دو لایه سلولی جنین لانه‌گزینی شده طی مرحلهٔ بعد (گاسترولاسیون) به سه لایه زایا تغییر شکل می‌دهد.



▲ **شکل ۱۱-۲۲. گاسترولاسیون در حیوانات.** طی گاسترولاسیون، سلول‌های اپی بلاست برای ایجاد سه لایه زایا، آندودرم اکتودرم و مزودرم مهاجرت می‌کنند. سلول‌های موجود در سه لایه مختلف سرنوشت‌های متفاوتی دارند و دودمان‌های سلول متفاوتی را نشان می‌دهند. (a) نقشه ساده‌ای از جنین انسان در حدود ۱۶ روز بعد از لقاح یک تخمک نشان داده شده است. اولین سلول‌های حرکت کننده از اپی‌بلاست، آندودرم داخلی را می‌سازند. سلول‌های بعدی داخل رونده، مزودرم می‌شوند. سلول‌های اپی‌بلاست باقی مانده اکتودرم می‌شوند. (b) میکروگراف الکترونی از برش عرضی جنین در مرحلهٔ مشابه.

در انتهای مخالف مزودرم سازمان دهنده اسپمن چندین پیام شامل BMP4 (یک پیام خانواده IGFB) را ایجاد می‌کند. بنابراین دو مرکز پیام‌رسانی، یکی در قسمت پشتی و دیگری در قسمت شکمی، به نظر می‌رسد که با یکدیگر برای کنترل سرنوشت سلول‌ها در عرض مزودرم در نبرد هستند.

بدون شک توجه کرده‌اید که خیلی از مولکول‌های درگیر در تشکیل بافت در جنین اولیه پیام‌های آنتاگونیست هستند. اثر چنین آنتاگونیستی می‌تواند شدیدتر شود و یا مرز بین انواع سلول‌ها باشد. پتانسیل یک پیام که از منبعی می‌آید با فاصله گرفتن کم شده و به زیر حد آستانه رسیده و بی‌تأثیر می‌شود. اگر یک آنتاگونیست از جهت مخالف بیاید، عمل پیام را حتی در سلول‌هایی که بالای مقدار آستانه دریافت پیام دارند، متوقف خواهد کرد.

یک مثال از این پدیده را در تشکیل سلول‌های عصبی در جلوی جنین قورباغه می‌بینیم. به طور طبیعی، پروتئین‌های ترشح شده

TGFβ از تشکیل سلول‌های عصبی نزدیک قطب جانوری جنین گزنوپوس جلوگیری می‌کنند. زمانی که قطب جانوری برداشته و کشت شود، «**کلاهک جانوری**»[1] نامیده می‌شود. تولید BMP4 (یک پیام از خانواده TGFβ، فصل ۱۶) توسط کلاهک جانوری از تشکیل بافت عصبی در کشت جلوگیری می‌کند. اثر پیام‌ها و بقیه تنظیم کننده‌ها بر القاء عصبی می‌تواند با قراردادن جزئی از کلاهک جانوری از جنین گزنوپوس با پروتئین‌های منفرد امتحان شود و ملاحظه می‌شود که آیا سلول‌های عصبی شکل می‌گیرند یا خیر. این نوع از آزمایشات *In Vitro* اولین بار توانایی کوردین را برای مخالفت باعمل BMP4 و القاء هویت سلول عصبی مشخص کرد. تنها زمانی که پیام‌رسانی BMP4 موفق باشد سلول‌های غیرعصبی می‌تواند تشکیل شود. این داده‌ها منجر به مدل ساده‌ای می‌شود که کوردین از اتصال BMP4 به گیرنده‌اش جلوگیری می‌کند. در اصل مهار می‌تواند با اتصال مستقیم کوردین به گیرندهٔ BMP4 یا خود مولکول آنها رخ دهد. مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهند که کوردین به هموديمر BMP2 یا BMP4 یا هترودیمر BMP4/BMP7 با تمایل بالایی ($K_d=3\times10^{-10}M$) متصل می‌شود و از اتصال آنها به گیرنده‌هایشان جلوگیری می‌کند (شکل ۱۵ـ۲۲). مهار با واسطه کوردین پیام‌رسانی BMP4 توسط پروتئین Xolloid، یک پروتئازی که به طور ویژه کمپلکس کوردین - BMP را می‌شکافد و BMP فعال را آزاد می‌کند تضعیف می‌شود.

سربروس، که آنتاگونیست دیگر ترشح شده از سلول‌های سازمان‌دهنده اسپمن است، دارای سه سر است زیرا به سه نوع مختلف از جایگاه‌های پیام‌های قوی Wnt، نودال و BMP متصل می‌شود. اتصال این پیام‌ها با سربروس از فعال‌سازی گیرنده‌های پاسخ دهنده آنها جلوگیری می‌کند. با غیرفعال کردن پیام‌های Wnt، نودال و BMP که نقش در تکوین تنه و دم دارند، سربروس تکوین سر را آغاز می‌کند.

در گزنوپوس، القاء عصبی به نظر می‌رسد حالت پیش فرضی است که باید به صورت فعال برای تکوین درست انواع دیگر سلولی بلوکه شود اما در جوجه و پستانداران، FGF، BMP و Wnt به نظر می‌رسد پیام‌های ضروری برای القاء بافت عصبی در عقب جنین باشد. در قسمت جلویی، اعمال BMP و Wnt توسط آنتاگونیست‌ها ممانعت می‌شود (شکل ۱۶ـ۲۲). این آنتاگونیست‌ها در ناحیه‌ای که **گره**[2] نامیده می‌شود، و از لحاظ عملکردی برابر با سازمان‌دهنده اسپمن در قورباغه است، تولید می‌شوند. طی گاسترولاسیون، گره یک خاموش کننده در انتهای جلویی خط اولیه است. خط دارای گره به طور آهسته به سوی سر گسترده می‌شود.

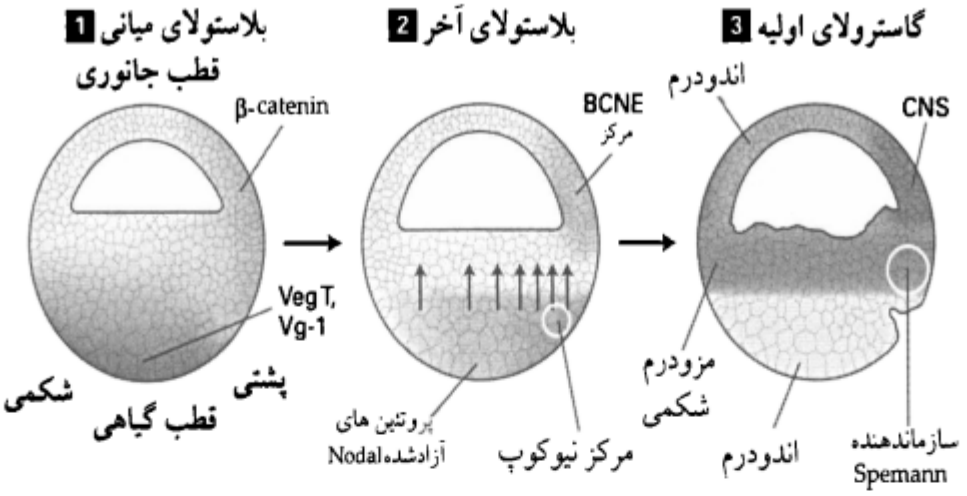
جورکردن همهٔ این پیام‌ها و آنتاگونیست‌ها که در تعیین سرنوشت سلول در طول سه محور بدن درگیر هستند نیاز به تحقیقات بیشتری خواهد داشت. با این وجود، اکنون زیست‌شناسان، اغلب تنظیم کننده‌های قوی را که باعث تشکیل انواع مختلف بافت‌ها در جنین اولیه می‌شوند، (شامل آنهایی که اختلافات بین طرف‌های راست و چپ بدن را کنترل می‌کنند)، مشخص کرده‌اند.

آبشاری از پیام‌ها قسمت چپ و راست را از هم مجزا می‌کنند.

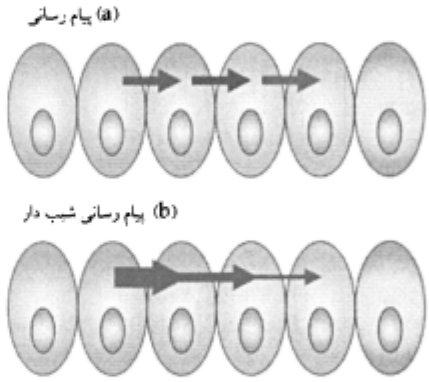
بعد از بحث در مورد تشکیل محورهای جلویی ـ پشتی، و پشتی شکمی به کنترل ژنتیکی محور چپ ـ راست می‌رسیم. رنگ‌آمیزی با آنتی بادی و دورگه‌سازی در داخل بدن برای نگریستن بیان ژنی جنین در آخر گاسترولا استفاده شده است. یکی از چشمگیرترین و جالب‌ترین یافته‌ها این است که بعضی ژن‌ها تنها در سمت چپ و برخی تنها در سمت راست جنین فعالند. این‌ها شامل ژن‌هایی هستند که سه پروتئین پیام‌رسان (سونیک هجهاک[3]، FGF و نودال) را ترشح می‌کنند (شکل ۱۷ـ۲۲). در آزمایشاتی که ژن‌های با این نوع الگوی بیان را خراب کردند، نشان داده است که بعضی ژن‌ها به ندرت به اطلاعات چپ ـ راست پاسخ می‌دهند؛ آنها جزئی از سیستم کنترل کننده الگوی بعدی جنین هستند. یک بافت یا اندام حیوانی ممکن است نامتقارنی چپ ـ راست را به دو طریق نشان دهد: با تشکیل مقدماتی در یک جهت بدن یا با داشتن مورفولوژی نامتقارن. برای دیدن این که چطور نامتقارنی چپ ـ راست می‌تواند طی تکوین ایجاد شود، ما قلب را که در دو مسیر نامتقارن است بررسی می‌کنیم. فرآیند طبیعی تکوین قلب در موش در شکل ۱۸ـ۲۲ نشان داده شده است. جالب‌ترین شکل قلب این است که یک اندام نازک اولیه تشکیل شده در مراحل اول جنین‌زایی که در روز ۲۳ ضربان دارد، می‌باشد (انسان). در این زمان کل جنین در حدود ۲/۵ میلی‌متر طول دارد و همچنان رشد می‌کند تا حدود ۱۲×۸×۶ سانتی‌متر و وزن آن به یک سوم کیلوگرم می‌رسند، قلب به طور پیوسته پمپاژ دارد.

در مراحل اولیه تکوین قلب، ژن Nkx2.5، عضوی از خانوادهٔ ژن‌های Nkx که فاکتورهای نسخه‌برداری هومو دُمین را رمز می‌کند در سلول‌های پیش‌ساز قلب در صفحهٔ جانبی مزودرم بیان می‌شود. اولین نوع ژن Nkx2.5 در جهش یافته مگس سرکه بدون قلب کشف

1- Animal Cap 2- Node
3- Sonic hedhehog



▲ **شکل ۱۲ـ۲۲ (شکل رنگی) مراکز پیام‌رسانی در جنین اولیه گزنوپوس.** برش عرضی از جنین در سه مرحله نشان داده شده است. سه لایه زاینده ـ أندودرم (زرد)، مزودرم (قرمز) و اکتودرم (آبی) ـ مرحلهٔ گاسترولا مشخص شده‌اند. ❸آنها از جنین اولیه مشتق می‌شوند ❶و ❷که توسط VegT (فاکتور نسخه‌برداری) و Vg-1 (پیام TGFβ) برای ایجاد قطب حیوانی و توسط پیام نودال از مرکز نیوکوپ برای ایجاد سلول‌های شکمی به پشتی قطبی می‌شود. مزودرم با پیام‌هایی که از ناحیهٔ گیاهی به مرکز جنین می‌آیند، القاء می‌شود. سرنوشت سلول‌های پشتی ـ شکمی با پیام‌های سازمان‌دهندهٔ اسپمن در گاسترولا کنترل می‌شوند.

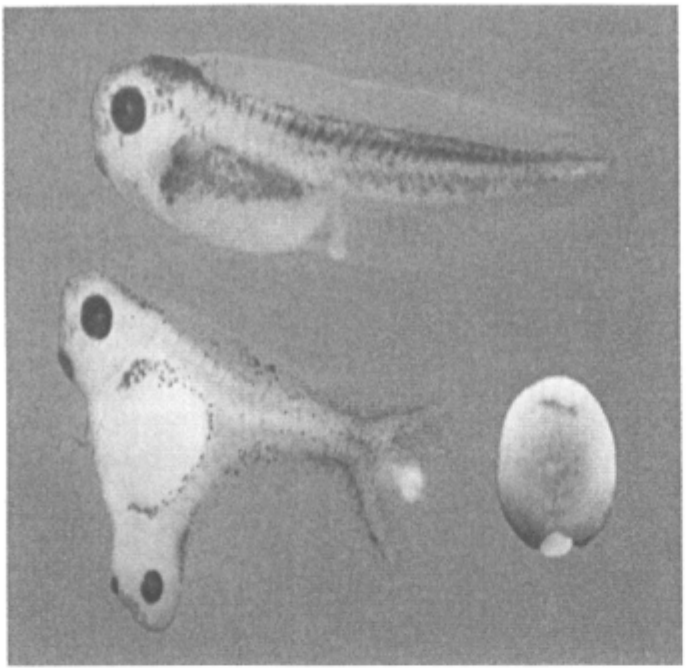


▲ **شکل ۱۳ـ۲۲ (شکل رنگی) دو مدل از پیام‌های القایی.** در مدل رله‌ای **(a)** پیام دامنه کوتاه (پیکان قرمز)، سلول دریافت‌کننده را برای پیام دیگر (بنفش) و به همین ترتیب دورهای دیگر تحریک می‌کند. **(b)** پیام تولید شده در سلول‌های منبع (صورتی)، به سلول‌های همسایه در مقیاس بیشتری نسبت به سلول‌های دیگر می‌رسند. اگر سلول دریافت‌کننده به صورت متفاوت به غلظت‌های متفاوت پیام پاسخ دهد (پیکان‌های عریض)، بنابراین یک پیام ممکن است چندین نوع سلول ایجاد کند.

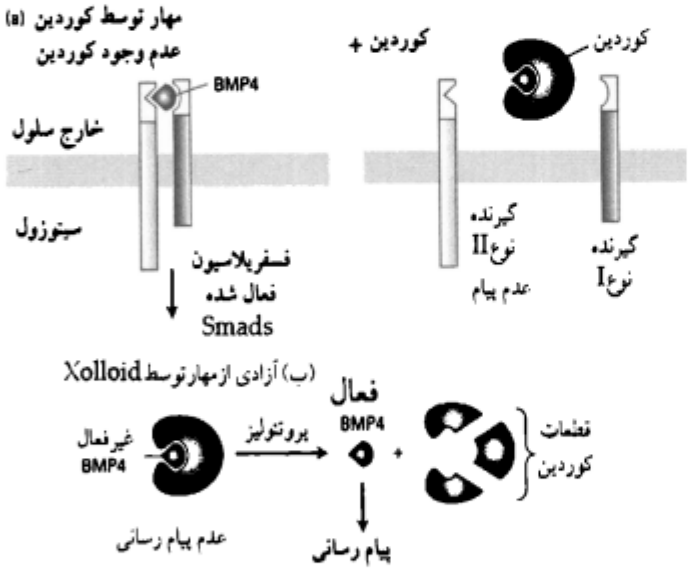
شده بود. جهش یافته موتانت مگس سرکه tinman نامیده شد. انسان‌های با یک نسخه از Nkx2.5 دارای نقص‌های متفاوتی در قلب هستند. شناسایی Nkx2.5 به محققان اجازه ردیابی سلول‌های پیش‌ساز قلب اولیه را که این ژن را بیان می‌کنند، داد. سلول‌هایی که از بقیه سلول‌های جنینی قبل از داشتن نشانگر قوی مشخص نشده بودند (شکل ۱۸ـ۲۲). آزمایشات بعدی با استفاده از این نشانگر ژنی برای شناسایی فاکتورهایی که مراحل اولیه را در تکوین قلب کنترل می‌کنند طراحی شده بود. اکتشافات مشابهی از تنظیم‌کننده‌های اولیه اندام‌ها و بافت‌های دیگر، ابزارهایی برای کشف این که چه پیام‌هایی تشکیل آنها را کنترل می‌کنند، فراهم می‌کنند. قضیه Nkx2.5 یک نمونه از اختصاص فاکتور نسخه‌برداری ویژه به اندام ویژه طی نیم میلیون سال یا به عبارتی واگرایی تکاملی فراهم می‌کند. همچنین ارزش مگس سرکه و بقیه جانداران مدل برای کشف ژن‌های انسانی درگیر در بیماری‌ها را روشن می‌سازد. سرانجام آن نشان می‌دهد که اندام‌هایی که به جای هدف مشابه به کار می‌روند اما واقعاً جدا نگریسته می‌شوند، شبیه قلب حشرات و پستانداران، ممکن است با استفاده از بعضی تنظیم‌کننده‌های مولکولی مشابه ساخته شوند.

به منظور تشکیل و عملکرد پمپی، لوله قلبی پستانداران خم می‌شود و در مسیر غیرمتقارن پیچ می‌خورد. این پیچ‌خوردگی‌ها با همدیگر اتاقک اولیه می‌شوند و در بعضی مسیرها سوراخ‌هایی در بین بعضی از آنها ایجاد می‌شود (شکل d و ۱۸c ـ۲۲). این سوراخ‌ها دریچه‌هایی خواهند شد. پیچ خوردگی و خمش قلب می‌تواند به صورت چپ‌گرد یا راست‌گرد اتفاق بیفتد، همانگونه که خواهیم دید براساس اطلاعات به ارث رسیده از بیان ژنی نامتقارن اولیه صورت می‌گیرد. شکل ۱۹ـ۲۲ یک موش جهش یافته با جهت قلبی معکوس را نشان می‌دهد.

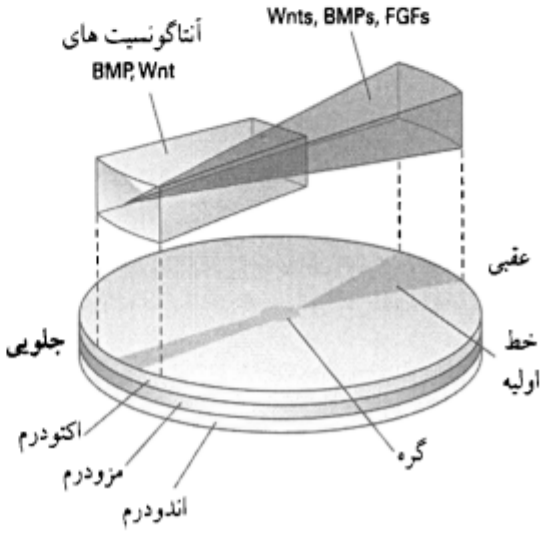
در بین جهش‌هایی که باعث اشتباه چپ ـ راست می‌شوند، بعضی‌ها تشکیل و عملکرد مژک‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. ما



◀ **شکل ۱۴ـ۲۲ (شکل رنگی) سازمان دهندهٔ اسپمن پیوند شده تشکیل یک محور جدید بدنی در جنین میزبان را هدایت می‌کند.** (بالا) جنین طبیعی قورباغه در مرحلهٔ نوزادی شناکننده. (پائین) وقتی که سازمان دهنده اسپمن، (یک مرکز پیام‌رسانی قوی) به داخل جنین میزبان اولیه پیوند می‌شود، بنابراین حال دارای دو سازمان دهنده است (راست، پیوند قسمت سفید در پائین است)، بیشتر محور مزودرمی و عصبی دو برابر شده است (چپ).

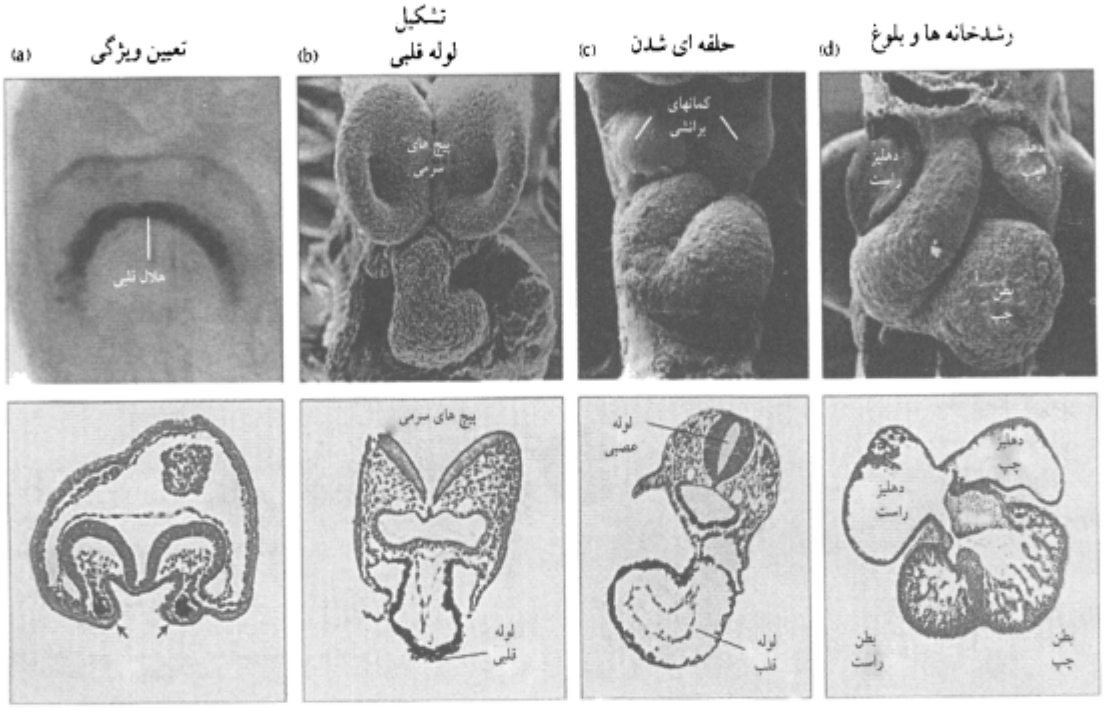


◀ **شکل ۱۵ـ۲۲. تعدیل پیام‌رسانی BMP4 در گزنوپوس توسط کوردین و xolloid.** (a) کوردین به BMP4 یک پیام پروتئین ترشحی خانواده TGFβ متصل شده، و از اتصال آن به گیرنده‌اش جلوگیری می‌کند. مسیر پیام رسانی TGFβ را در شکل ۴ـ۱۶ ببینید. (b) xolloid به طور ویژه کوردین را در ترکیب کوردین ـ BMP4 تجزیه می‌کند و BMP4 را درشکلی که به گیرنده اتصال یافته و پیام را راه‌اندازی می‌کند، آزاد می‌سازد.

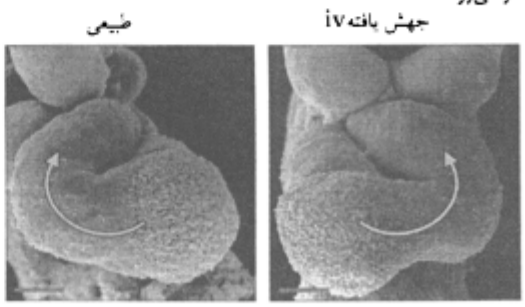


◀ **شکل ۱۶ـ۲۲ (شکل رنگی) تنظیم کننده‌های سرنوشت سلولی جلویی ـ عقبی در جنین موش.** جنین در آخر گاسترولا، که به طور کامل حلقه‌حلقه است، به صورت بیضی مسطح با سه لایه آندودرم، مزودرم و اکتودرم رسم شده است. خط اولیه، جایی که مزودرم آینده طی گاسترولا به داخل خواهد رفت، به صورت یک فضای بنفش رنگ در سطح بیضی نشان داده شده است. گره (دایره سبز)، مرکز پیام‌رسانی است که قبلاً ایجاد شده و سرانجام نوتوکورد می‌شود (شکل ۳۹ـ۲۲ را ملاحظه کنید). پیام‌های تنظیمی که الگودهی جلویی ـ عقبی را کنترل می‌کنند در بالای بیضی مشخص شده‌اند. پروتئین‌های پیام‌رسانی ترشح شدهٔ Wnt، BMP و FGF توسط بافت‌های عقبی‌ساخته می‌شوند و سلول را با سرنوشت عقبی مثل‌بافت عصبی فرض می‌کند. عمل پروتئین‌های BMP4 و Wnt در ناحیهٔ جلویی جنین توسط پروتئین‌های آنتاگونیست که توسط سلول‌های گره ساخته شده و در آنجا جمع می‌شوند، مهار می‌شود.

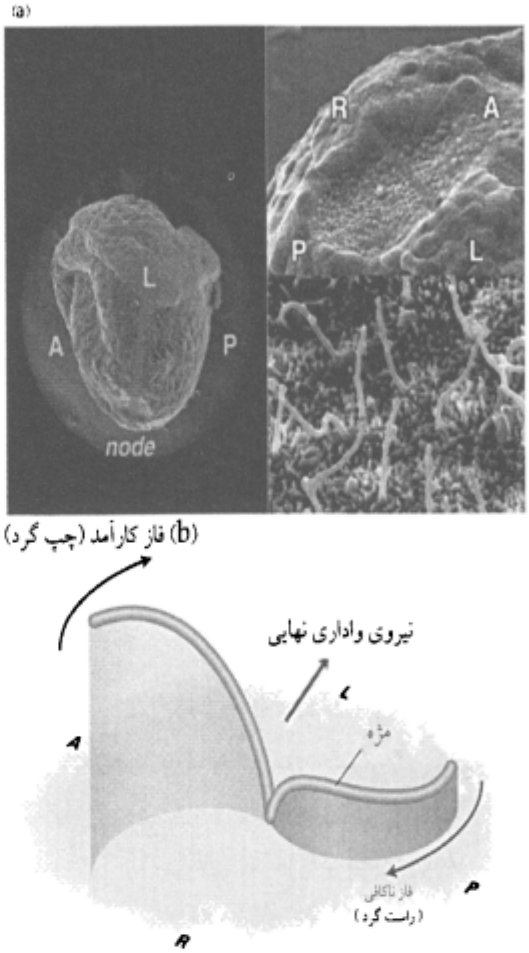
◀ **شکل ۱۷ـ۲۲. پروتئین‌های نودال، تنها در جنین ۸ روزه موش تولید می‌شوند.** در این آزمایش In situ، جنین نفوذپذیر شده و سپس با پروب ویژه mRNAی نودال انکوبه شد. پروب با نوکلئوتیدهای آنالوگ که به آنتی بادی می‌توانند متصل شوند، ساخته شد. بعد از دورگه‌سازی، نمونه در معرض آنتی بادی آنتی پروب که به صورت کووالانس به آنزیم گزارشگر متصل می‌شود، قرار گرفت. بعد از اضافه کردن سوبسترای آنزیمی، رسوب رنگی در جایی که پروب به mRNA نودال باند شد، تنها در یک جهت تشکیل شد. این نوع آزمایش دورگه‌سازی، وسیعاً در مطالعات بیان ژن در جنین به کار رفته است. مطالعات دیگری نشان دادند که طرف تولیدکنندهٔ نودال سرانجام ساختارهای جهت چپ را تشکیل می‌دهند.



▲ **شکل ۱۸ـ۲۲ (شکل رنگی) تکوین قلب در جنین موش از روز ۷/۷۵ تا ۱۲.** عکس کلی و میکروگراف الکترونی در بالا نشان داده شده‌اند؛ مقاطع بافت‌شناسی عرضی در زیر دیده می‌شود. دورگه‌سازی In situ، برای ردیابی ساختارهای اولیه قلب (آبی) به کار رفته است. (a) هلال قلبی، قلب آغازی اولیه تشکیل شده، در روز ۷/۷۵ قابل ردیابی است. (b) لوله‌های قلبی از هلال قلبی در زیر پیچ‌های سری شکل می‌گیرد. (c) لوله قلبی شروع به پیچ خوردن در زیر قوس‌های برانشی می‌کند. (d) رشد و بلوغ خانه‌ها، ایجاد ۴ خانه قلبی در روز ۱۲ می‌کند. رنگ‌آمیزی In situ آبی در برش‌های بافتی پروتئین‌هایی که تحت کنترل ژن‌های کلیدی تنظیم کننده قلب هستند مانند Nkx2.5 را آشکار می‌کند. بعضی ژن‌های تنظیمی برای مطالعه مکانیسم‌های تعیین سرنوشت سلولی اهمیت دارند و همچنین همانطور که در اینجا نشان داده شده، به عنوان مارکر عالی سلول‌های پیش‌سازی که به طریق دیگری نمی‌توانند تشخیص داده شوند به کار می‌روند.



◀ **شکل ۱۹ـ۲۲. قلب طبیعی و معکوس شده.** قلب‌ها به صورت ژنتیکی برنامه‌ریزی می‌شوند تا در مسیر ویژه‌ای پیچ بخورند. در قلب سالم موش که اینجا نشان داده شده است، پیچش قلب در خلاف جهت قلب موش جهش یافته iv همان طور که با پیکان نشان داده شده، می‌باشد. ژن iv پروتئین حرکتی دای‌نئین را رمز می‌کند که برای عدم تقارن چپ و راست قلب مهم است.



▲ **شکل ۲۰ـ۲۲. نقش مژک‌های گره در کنترل قطبیت چپی ـ راستی در جنین‌های پستانداران.** (a) جنین موش در روز ۸ (چپ) و دید بزرگنمایی گره (راست) که مژک‌ها را نشان می‌دهند. A = جلویی، P = عقبی، L = چپ و R = راست. (b) مدل عملکرد مژک‌ها. مژک‌ها به طور مؤثر مایع را حرکت می‌دهند و پروتئین‌های پیام‌رسانی توسط آن به سمت چپ، «با ضربه قدرتی» حرکت می‌کنند. «ضربه بازگردانده» برای حرکت مایع به سمت راست ناکافی است. بنابراین عدم تقارن ذاتی ساختارهای نازک داخلی مژک‌های حرکتی، منجر به عدم تقارن کل بدن ما می‌شود.

قبلاً سندرم کارتاژنر را ذکر کردیم که جهش در پروتئین حرکتی داینئین می‌تواند باعث برعکس شدن چپ ـ راست قلب شده و به علاوه باعث ناباروری به واسطه تاژک غیرمتحرک اسپرم شود. اینها و بقیه یافته‌ها نقش تاژک و مژک در کنترل نامتقارن چپ - راست را پیشنهاد می‌کنند. در موش، تاژک مناسب در گره قرار می‌گیرد (شکل ۲۰ـ۲۲a)، ناحیه‌ای در جنین پستانداران که کم و بیش با سازمان دهنده اسپمن در دوزیستان معادل است. حرکت مورب مژک‌ها در گره باعث می‌شود مایعات و پیام‌ها به سمت چپ جریان یابند (شکل ۲۰ـ۲۲b). هنوز مشخص نیست که عدم تقارن ناشی از مژک‌ها در همهٔ پستانداران یک اختلاف چپی ـ راستی خیلی اولیه باشد، زیرا شواهدی که برای عدم تقارن وجود دارند مقدم بر تشکیل گره هستند. فرضیه مژک‌ها قویاً با آنالیزهای ژنتیکی نقص‌های موجود در تکوین چپ ـ راست حمایت می‌شود.

راز این که چه چیزی توسط مژک‌های گره‌ای حرکت داده می‌شود شاید با کشف اخیر ذرات وزیکولی گره‌ای[1] (NVPs)، که ۰/۳۵ تا ۰/۵ میکرومتر ضخامت دارند حل شده باشد. NVPs حاوی پروتئین سونیک هجهوگ (shh)، و اسید رتینوئیک می‌باشد که هر دو به عنوان تنظیم کننده‌های قوی سرنوشت سلولی شناخته شده‌اند. در پاسخ به پیام FGF، NVPs از سلول‌ها آزاد شده و به طرف چپ گره، جایی که افزایش سطوح Ca^{2+} را تحریک می‌کند، می‌رود که یکی از جنبه‌های «چپی شدن» است. حرکت NVPs و یا مواد دیگر، باعث بیان نامتقارن ژن‌های رمزکننده پیام‌های TGFβ می‌شود و در نتیجه بیان ژن Pitx2، که فاکتور نسخه‌برداری را رمز می‌کند، فقط در چپ روی می‌دهد. این رخدادهای تنظیمی باعث آغاز فرآیندهای تنظیمی می‌شود که باعث نظم سلول‌های مختلف و سرانجام ساختارهای اندام، در جهت چپ و راست می‌شوند.

نکات کلیدی بخش ۲۲.۳

تنوع سلول و الگوبندی در جنین‌های مهره‌داران اولیه

- تخم لقاح یافته، یک سلول چند توان است که همهٔ انواع سلول‌های بدن را می‌تواند ایجاد کند.
- تسهیم تخم لقاح یافته شامل یک سری از تقسیمات سریع است، که به طور اولیه دسته‌ای از سلول‌ها را ایجاد می‌کند که شبیه به هم به نظر می‌آیند (شکل ۸ـ۲۲). زمانی که جنین ۶۴ سلولی در پستانداران شکل می‌گیرد، بعضی سلول‌ها به خارج رانده می‌شوند و تروفواکتودرم را ایجاد می‌کنند، در حالی که بقیه در داخل مانده و ایجاد توده سلولی داخلی را می‌کنند.
- تروفواکتودرم تشکیل بافت‌های خارج جنینی، نظیر جفت را خواهد کرد و توده سلولی داخلی (ICM) خود جنین را به وجود می‌آورد (شکل ۱۰ـ۲۲). ICM منبع سلول‌های بنیادی جنینی است.
- از آنجایی که اغلب سلول‌های سوماتیک دارای ژنوم کامل هستند (دیپلوئید)، تمایز سلولی معمولاً وابسته به از دست رفتن فیزیکی بعضی ژن‌ها نیست. یک استثناء لنفوسیت‌ها هستند، که پروتئین‌های ژنومی نوآرایی می‌شوند و یا طی تکوین از دست می‌روند.

1- Nodal vesicle partieles (NVPs)

■ ICM که توده‌ای از سلول‌های تمایز نیافته است، چند لایه سلولی طی گاسترولاسیون ایجاد می‌کند. ابتدا سلول‌ها دو لایه ایجاد می‌کنند و سپس سلول‌ها در یک لایه به وسط حرکت نموده و لایه سوم را تشکیل می‌دهد. این عامل سه لایه زایا: آندودرم، مزودرم و اکتودرم (شکل ۱۱ـ۲۲) را ایجاد می‌کند.

■ چندین مرکز نشر پیام در جنین اولیه مهره‌داران تشکیل می‌شود (شکل ۱۲ـ۲۲ و ۱۶ـ۲۲). سلول‌هایی که پیام را دریافت می‌کنند، معمولاً آنها را هماهنگ می‌کنند، ژن‌های معینی را فعال می‌کنند. پیام‌های پروتئینی ترشح شده و پیام‌های آنتاگونیست از این مراکز می‌آیند و سرنوشت سلول را در امتدادمحور جلویی ـ عقبی و پشتی ـ شکمی تعیین می‌کنند.

■ پیام‌هایی که سرنوشت سلول را در مسیر وابسته به دُز کنترل می‌کنند، مورفوژن نامیده می‌شوند. در مورد چنین پیام‌هایی، سلول‌های دریافت کننده، یک سرنوشت را در سطوح بالا کنترل می‌کنند، سرنوشت متفاوت در سطوح متوسط و سومی سرنوشت اصلی که در عدم حضور پیام تعیین می‌شود.

■ آنتاگونیست‌های پیام در توقیف و تعادل اثرات پیام‌های القائی قوی مهم هستند (شکل ۱۵ـ۲۲). برای مثال، القاء مزودرم توسط TGFβ در نواحی از جنین که سیستم عصبی تشکیل خواهد شد توسط آنتاگونیست‌های پروتئینی ترشح‌شده که با TGFβ رقابت می‌کنند، جلوگیری می‌شود.

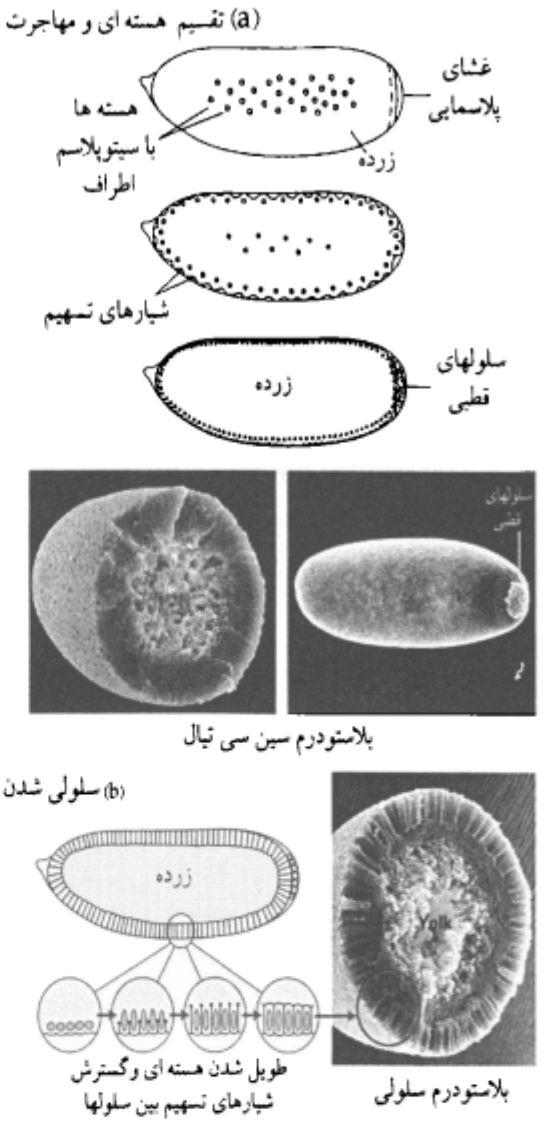
■ طی گاسترولاسیون، تفاوت در بیان ژن از چپ به راست اثبات شده است (شکل ۱۷ـ۲۲). این قطبیت بیان ژنی چپ ـ راست، تا حدودی به مژک‌های گره، یک گودی در ناحیهٔ جلویی خط اولیه، بستگی دارد. به نظر می‌آید که این مژک‌ها پیام‌ها را در یک جهت بیشتر از جهت دیگر حرکت می‌دهند (شکل ۲۰ـ۲۲) باعث تعیین سرنوشت مشخص سلولی در دو جهت جنین می‌شود.

۴ـ۲۲ تنظیم بندبندشدن بدن: طرح‌ها و تنوعات در حشرات و مهره‌داران

تشکیل ساختار و الگو در حیوانات بیشتر در ایجاد انواع بافت و تعیین قطبیت سر به دم، پهلو به پهلو و جلو به پشت است. حشرات، مهره‌داران و خیلی از مخلوقات دیگر دارای قطعات تکراری بدنی هستند. در حقیقت، به خاطر استخوان‌های تکراری (مهره) که ستون نخاعی را می‌سازند، مهره‌داران نامگذاری می‌شوند. بعضی قطعات تکراری بدن معمولاً به صورت ترجیحی یکسان نیستند، بلکه الگوها و تنوعاتی را نشان می‌دهند که برای حیوان عملکردی هستند. برای مثال، بعضی از مهره‌های ما دارای اتصال به دنده هستند و برخی دیگر نیستند. وقتی که در سفر تفریحی یک ملخ را می‌بینید، قطعات بدن آن به وضوح قابل مشاهده‌اند. بعضی قطعات بدن حشرات دارای پا و برخی دیگر فاقد پا هستند. در این بخش ما تنظیم ژنتیکی بندبندی جنین را در یک حشره و یک مهره‌دار برای دیدن دو مسیر مختلف بندبندی شدن برای ایجاد الگوی تکراری بررسی می‌کنیم. سپس به ژن‌هایی که اختلافات بین تکرارها را تنظیم می‌کنند نگاهی خواهیم انداخت. به صورت آشکاری، اختلافات ویژه بندبندی شدن با وجود گذشت نیم میلیون سال یا در زمان زنده بودن جد مشترکشان ، توسط ژن‌های مشابهی در حشرات و مهره داران کنترل می‌شود.

مطالعهٔ زیست‌شناسی سلولی و مولکولی بندبندی بدن با غربال‌گری قدرتمند ژن‌های درگیر در بندبندی شدن مگس سرکه آغاز شد. این نوع غربال‌گری منظم برای شناسایی اجزاء فرآیندهای ویژه‌تر مانند تنظیم نوع جفتی مخمر به کار رفته است، اما هرگز برای تکوین حیوانات پیچیدهٔ بزرگ به کار نرفته است. عمل غربال‌گری در شناسایی ژن‌های بندبندی شدن تا حد زیادی موفق بوده است و عصر جدیدی از آنالیز مولکولی تشکیل الگو، جنبه‌ای از تولید شکل **(مورفوژنز)**، می‌گشاید. اما به طور چشمگیری، غربال موفق بیشتر به دو طریق مورد انتظار صورت گرفت: آن خیلی از ژن‌های درگیر در تکوین بافت‌های داخلی، نه تنها اسکلت خارجی بندبندشده را، مشخص کرد و ژن‌های مشخص شده در مگس سرکه، شاخصی از ژن‌های درگیر در کنترل تکوین جنینی سایر جانوران نیز می‌باشد. از آن زمان به بعد غربال‌گری‌های ژنتیکی در بسیاری از فرآیندهای تکوینی دیگر و فرآیندهای زیست‌شناسی سلولی مانند تکوین عصبی و قلبی، با استفاده از انواعی از موجودات مدل شامل کرم‌ها، مگس سرکه، موش‌ها و zebrafish به کار رفته است (شکل ۲۵ـ۱ را ملاحظه کنید). در نتیجه ژن‌هایی که در چندین پروژه ژنومی شناسایی شده‌اند از نظر عملکردشان، بعلاوه بافت‌ها که قرار دارند، زمان‌های (شان)، و فرآیندهای که نقش دارند، می‌توانند توصیف شوند. آن مرحله اساسی در درک شبکه کلی از تنظیم‌کننده‌هایی است که تکوین را پیش می‌برند.

برای فهمیدن این که چگونه بندبندشدن رخ می‌دهد، ما اول تکوین ابتدایی درزوفیلا را توصیف کرده و سپس انواع و اعمال ژن‌هایی که در غربال‌گری اصلی پیدا شدند را مورد بحث قرار می‌دهیم. سپس فرآیند بندبندشدن را در مهره‌داران بررسی می‌کنیم و سرانجام این بخش را با بررسی تشکیل الگو در گیاهان نتیجه‌گیری می‌کنیم.

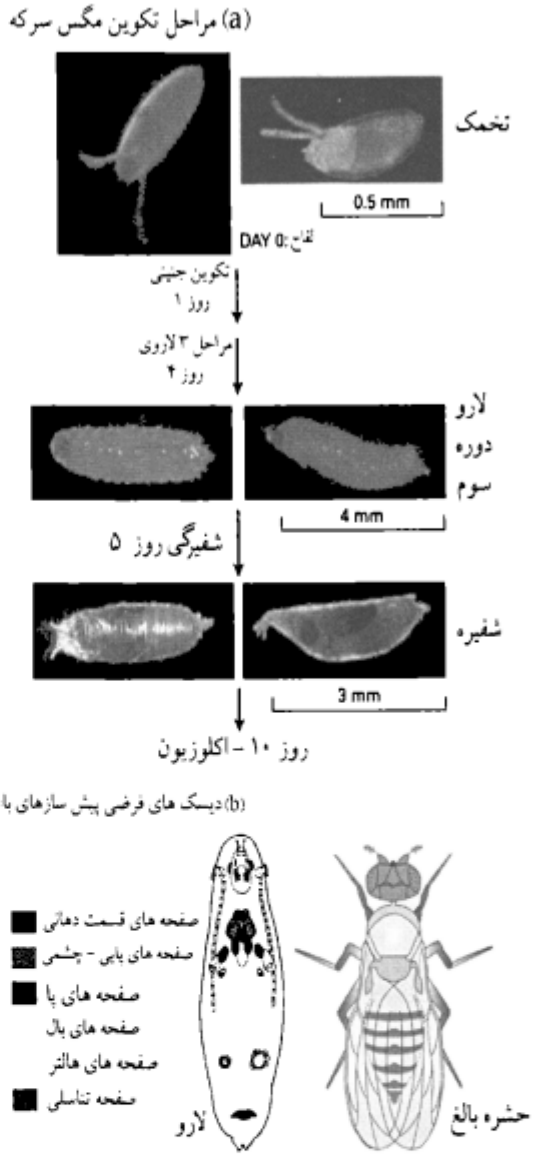


▲ **شکل ۲۱ـ۲۲. تشکیل بلاستودرم سلولی طی جنین‌زایی اولیه دروزوفیلا.** مراحلی از سینسیتیوم (a) به بلاستودرم سلولی (b) در دیاگرام و میکروگراف‌های الکترونی شرح داده می‌شوند. تقسیم هسته‌ای با تقسیم همراه نمی‌شود تا زمانی که حدود ۶۰۰۰ هسته شکل گرفته و به سمت خارج به طرف غشای پلاسمایی مهاجرت کنند. قبل از سلولی شدن، چنین برآمدگی‌های سطحی بر روی سطح، هسته‌های منفرد را نشان می‌دهد که در داخل یک سیتوپلاسم مشترک نگهداری می‌شوند. هیچ غشای دیگر علاوه بر غشایی که کل جنین را احاطه می‌کند، وجود ندارد. بعد از سلولی شدن، غشاهای سلول در اطراف هسته‌های منفرد آشکار می‌شوند. به تفرق هسته‌هایی که سلول قطبی نامیده می‌شوند توجه کنید که سلول‌های رده زایا را در انتهای عقبی بلاستودرم سینسیتال به وجود می‌آورند.

تکوین اولیه دروزوفیلا یک تمرین سریع است.

بعد از لقاح و ادغام پیش هسته‌های نر و ماده در دروزوفیلا، ۱۳ تقسیم هسته‌ای اولیه تخم همزمان و سریع است، هر تقسیم در حدود ۱۰ دقیقه رخ می‌دهد. این همانندسازی DNA سریع‌ترین نوع شناخته شده برای یوکاریوت است، ۱۶۰ مگاباز از DNAی کروموزومی دروزوفیلا در فاز S چرخه سلولی تنها در عرض ۳ دقیقه کپی می‌شود. چون این تقسیمات هسته‌ای با تقسیمات سلولی کامل نمی‌شوند، تخم چندهسته‌ای سلول تخم، سینسیتیوم، با یک سیتوپلاسم و غشای پلاسمایی تولید می‌شود (۲۱a‌ـ۲۲). هم‌چنان که هسته تقسیم‌می‌شود، آن به سمت خارج غشای پلاسمایی مهاجرت می‌کنند. هسته‌ها در حدود ۲ تا ۳ ساعت بعد از لقاح به سطح می‌رسند و **بلاستودرم سینسیتیال** را ایجاد می‌کنند. طی ساعت بعدی و یا بعدتر، غشای پلاسمایی اطراف هسته‌ها تشکیل می‌شود، و بلاستودرم سلولی یا بلاستولا را ایجاد می‌نماید (شکل ۲۱b‌ـ۲۲). همهٔ بافت‌های آینده از ۶۰۰۰ سلول یا سلول‌های اپی‌تلیال در سطح بلاستولا که داخل آن پر از زرده است، مشتق می‌شوند. به زودی بعضی از سلول‌های اپی‌تلیال به داخل حرکت نموده، نسخه حشراتی گاسترولاسیون، و سرانجام به بافت‌های داخلی تکوین پیدا می‌کنند.

در همهٔ جانوران، خیلی از تنظیم کننده‌های مهم کنترل الگوبندی، زمانی که جنین نسبتاً سلول‌های کمتری دارد، عمل می‌کنند. برای مثال بلاستولای مگس در حدود ۱۰۰ سلول طول و ۶۰ سلول در محیط دارد، اما حتی در این مرحله اولیه، قسمت‌های اصلی طرح بدن ایجاد شده‌اند. چون جنین مگس چند ساعت بعد از تکوین سینسیتیوم است، مولکول‌های تنظیم کننده می‌توانند در سیتوپلاسم عمومی بدون داشتن غشاهای پلاسمایی عرضی حرکت کنند. بعضی مولکول‌ها شیب تشکیل می‌دهند که در مراحل اولیه تعیین سرنوشت سلولی در دروزوفیلا، قبل از تقسیم سینسیتیوم به سلول‌های منفرد، استفاده می‌شود. بنابراین فاکتورهای نسخه‌برداری، به علاوه مولکول‌های ترشحی می‌توانند به عنوان مورفوژن در جنین‌سینسیتیایی عمل کنند. طی روز اول لقاح، در زمان کوتاه تعجب‌آوری، کل موجود زنده تشکیل می‌شود، جنین به لارو بندبند (مرحله جوانی) فاقد بال‌ها و پاها تکوین می‌یابد. تکوین طی سه مرحله لاروی (۴ روز کامل) ادامه می‌یابد و روز تقریباً پنجم طی مرحلهٔ شفیرگی، دگردیسی رخ می‌دهد و ساختارهای بالغ ایجاد می‌شود (شکل ۲۲a‌ـ۲۲). در آخر مرحلهٔ شفیرگی، حدود ۱۰ روز بعد از لقاح، پوستهٔ شفیره شکافته شده و مگس بالغ بیرون می‌آید. سلول‌های اولیه معادل جنین سینسیتیال، سریعاً سرنوشت‌های متفاوت را شروع می‌کنند، که منجر به الگوی منظم بسیار خوب از هویت‌های مشخص سلول می‌شود. این رویدادهای الگوبندی اولیه مراحلی را برای تکوین بعدی برقرار می‌کنند و جایگزینی بافت‌های مختلف (مانند ماهیچه، عصب، اپی‌درم) و قطعات بدن، به علاوه



▲ **شکل ۲۲ـ۲۲. مراحل عمده در تکوین دروزوفیلا و موقعیت صفحه‌های فضایی.** (a) تخم لقاح‌یافته به یک بلاستودرم تکوین می‌یابد و طی ساعات کمی سلولی شدن را می‌گذراند. لارو، یک شکل بندبندی، در حدود ۱ روز نمایان می‌شود و سه مرحله در دورهٔ ۴ روزه گذرانده و به پیش‌شفیره تکوین می‌یابد. شفیرگی تقریباً ۴ تا ۵ روزگی رخ می‌دهد و با ظهور مگس بالغ از شفیره پایان می‌یابد. (b) گروهی از سلول‌های اکتودرمی که صفحه‌های فرضی نامیده می‌شوند در جایگاه‌های ویژه‌ای در حفره بدن لارو قرار می‌گیرند. طی شفیرگی اینها ایجاد قسمت‌های تشاندار وسیعی از بدن را می‌کنند. سلول‌های پیش‌ساز دیگر ماهیچه بالغ، سیستم عصبی و ساختارهای داخلی دیگر را ایجاد می‌کنند.

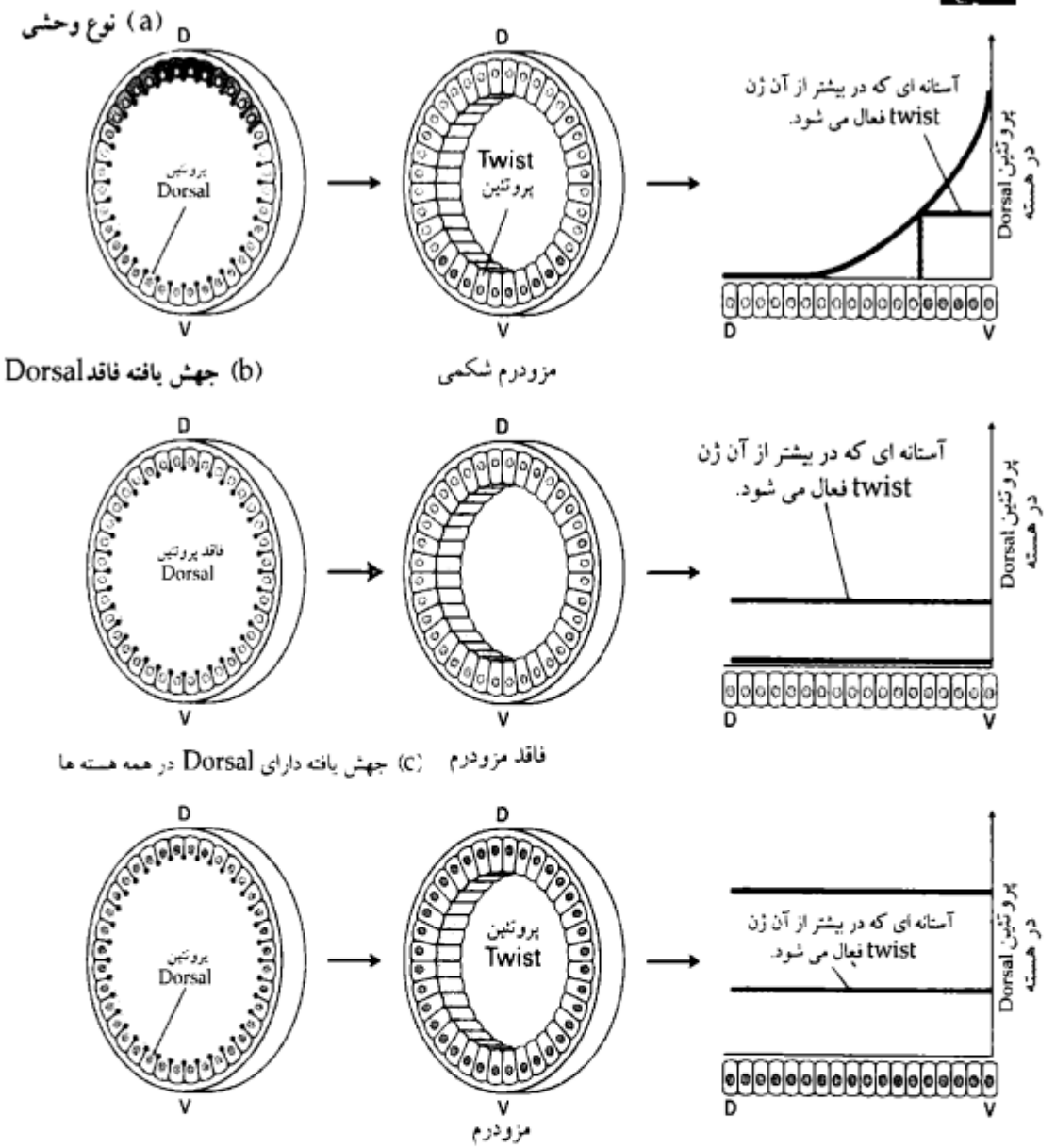
اشکال زوائد و سازماندهی انواع سلول‌ها در داخل آنها را درست می‌کند. جنین اولیه از یک جهت به جهت دیگر متقارن است و اختلافات آغازی بین سلول‌ها در طول مهره‌های پشتی ـ شکمی (پشت ـ جلو) و جلویی ـ عقبی (سر به دم) ایجاد می‌شود. طی مراحل لاروی، گروهی از سلول‌های اکتودرمی که **صفحات فرضی**[1] نامیده می‌شوند، در جایگاه‌های مخصوصی شکل گرفته و طی مراحل اولیه لاروی خاموش می‌مانند (شکل ۲۲ـ۲۲b). هر صفحه طی شفیرگی رشد خواهد کرد و ایجاد ساختارهای بالغ ویژه‌ای را خواهد نمود، یکی بال، یکی پا و مانند آن را ایجاد خواهند کرد.

مجموعه‌های متفاوتی از ژن‌ها در ایجاد سرنوشت سلول‌ها در طول محورهای جلویی ـ عقبی (سر به دم) و پشتی ـ شکمی (پشت ـ جلو) فعال می‌شوند. سرنوشت اولیهٔ هر سلول با تنظیم کننده‌هایی از نوع شبکه دو بعدی عمل کننده جلویی ـ عقبی و عملگر پشتی ـ شکمی اداره می‌شود. هر دو سیستم تنظیم کننده با اطلاعات و مولکول‌های توزیع شده به اووسیت به صورت روش مادری، آغاز می‌شوند. سیستم کنترل پشتی ـ شکمی شامل انتقال فاکتور نسخه‌برداری به نام **دُرسال**[2] به داخل هسته‌های جنین سینسیتیا است. این فاکتور نسخه‌برداری، وابسته به پروتئین NF-kβ، که در حالت غیرفعالش در سراسر جنین سینسیتیا وجود دارد، می‌باشد. غلظت پروتئین پیام‌رسان در جهت شکمی جنین، مسیر پیام‌رسانی NF-kβ را راه‌اندازی می‌کند (شکل ۳۵ـ۱۶)، که منجر به فعال شدن دُرسال و جابجایی آن به داخل هسته‌ها می‌شود. در نتیجه، دُرسال به هسته‌های شکمی در سطح بالایی، و به هسته‌های کناری در سطح متوسطی وارد شده و در هسته‌های پشتی وارد نمی‌شود (شکل ۲۳ـ۲۲).

پس دُرسال در یک مدل شیب‌دار عمل کرده و اگرچه ترشح نمی‌شود، خواص مورفوژنی دارد. ورود متفاوت فاکتور نسخه‌برداری دُرسال به داخل هسته‌ها، که سرنوشت بعدی سلول‌ها را کنترل می‌کند، توسط مراحل پیچیده پیام‌رسانی که طی اووژنز در سلول‌های فولیکولی شروع شده و به جنین در حال تکوین انتقال می‌یابد، اداره می‌شود. ما جزئیات الگوبندی پشتی ـ شکمی را دیگر ادامه نمی‌دهیم و در عوض روی الگوبندی جلویی ـ عقبی متمرکز می‌شویم.

برای رمزگشایی پایه‌های مولکولی تعیین سرنوشت سلولی و الگوبندی در طول سه محور بدن، محققان ژن‌های مشخص شده در غربال جهش‌ها که طرح بدن را تحت تأثیر قرار می‌داد کلون کردند، الگوی مشخص، موقتی و فضایی تولید mRNA برای هر ژن و توزیع پروتئین‌های رمزشده در جنین را تعیین کردند و اثر جهش را در تمایز سلول، الگوی بافت و بیان بقیهٔ ژن‌های تنظیمی برآورد کردند.

1- Imaginal discs 2- Dorsal

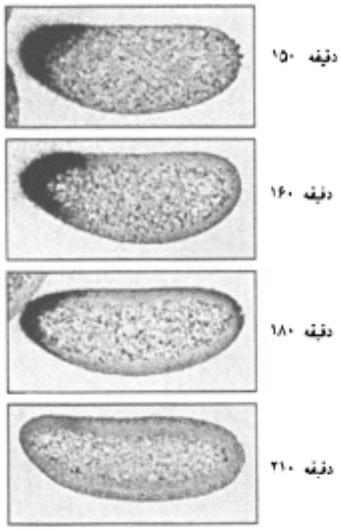


▲ **شکل ۲۳ـ۲۲. شیبی از فاکتور نسخه‌برداری Dorsal سرنوشت سلول پشتی ـ شکمی در جنین اولیه را اداره می‌کند. Dorsal** همولوگ دروزوفیلایی NF-κB مهره‌داران است (شکل ۳۵ـ۱۶). (a) در جنین‌های نوع وحشی، پروتئین Dorsal بیشتری به داخل هسته‌های طرف پشتی وارد می‌شود. در ابتدا در داخل یک هسته، Dorsal ژن هدفی مانند twist را فعال می‌کند که یک فاکتور نسخه‌برداری که تشکیل مزودرم را اداره می‌کند، رمز می‌کند. سپس ورودی افتراقی Dorsal ایجاد قطبیت پشتی ـ شکمی در بیان twist کرده و القاء مزودرم را باعث می‌شود. NF-kB سیتوپلاسمی غیرفعال در سمت پشتی در فعال کردن twist ناتوان است. (b) جهش یافته فاقد Dorsal هیچ سلول مزودرمی نمی‌سازد. (c) برعکس در یک جهش یافته که دارای Dorsal در هستهٔ همه سلول‌ها است، همه سلول‌ها به مزودرم تمایز می‌یابند.

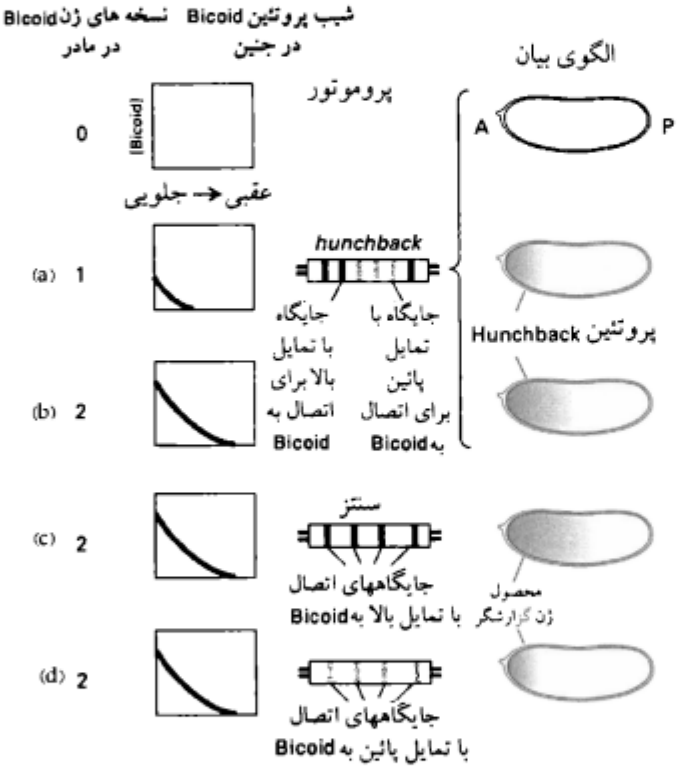
اصول تعیین سرنوشت سلولی و الگوی بافتی که در دروزوفیلا آموخته شد، کاربرد وسیعی را برای تکوین جانوران ایجاد کرد.

کنترل نسخه‌برداری، جلو و عقب جنین را تعیین می‌کند.

اکنون به تعیین محور جلویی ـ عقبی جنین اولیه مگس در حالی که هنوز یک سینسیتیوم است بر می‌گردیم. فرآیند طی اووژنز زمانی که mRNAهای مادری تولید شده توسط سلول‌های پرستار به‌داخل اووسیت انتقال می‌یابند، و در دُمین‌های مجزای فضایی قرار گرفته‌اند، آغاز می‌شود (شکل ۲ـ۲۲). برای مثال، mRNAی **بیکوئید** بیشتر در ناحیهٔ جلویی، یا قطب جلویی، حبس می‌شود (شکل ۲۴ـ۲۲). قرارگیری جلویی mRNAی بیکوئید وابسته به انتهای ′۳ ترجمه نشده‌اش و سه پروتئین مشتق مادری می‌باشد. جنین‌های



◀ شکل تجربی ۲۴ـ۲۲. mRNA بیکوئید مشتق از مادر در ناحیهٔ جلویی جنین‌های اولیه دروزوفیلا قرار دارد. همهٔ جنین‌های نشان داده شده، با موقعیت قسمت جلویی در سمت چپ و سمت پشتی در بالا هستند. در این آزمایش، دورگه‌گیری In situ با پروب ویژه RNA نشاندار رادیواکتیو برای mRNAی بیکوئید، در کل بخش‌های جنین، ۳۵ـ۲۵ ساعت بعد از لقاح انجام می‌شود. این زمان انتقال از بلاستودرم سینسیتیال به آغاز گاسترولاسیون را پوشش می‌دهد. بعد از این که پروب اضافی برداشته می‌شود، پروب دورگه شده با mRNAی بیکوئید مادری (سیاه نقره‌ای خاکستری) با اتورادیوگرافی ردیابی می‌شود. پروتئین بیکوئید یک فاکتور نسخه‌برداری است که به تنهایی و با دیگر تنظیم‌کننده‌ها برای کنترل بیان ژن‌های معین در ناحیهٔ جلویی جنین عمل می‌کند.



◀ شکل تجربی ۲۵ـ۲۲. بیکوئید مشتق از مادر بیان ژن هانچ‌بک (hp) جنینی در امتداد محور جلویی ـ عقبی را کنترل می‌کند. (a-c) افزایش تعداد ژن‌های بیکوئید در مگس سرکه مادر، شیب بیکوئید در جنین اولیه را تغییر داده و منجر به تغییر هماهنگ در شیب پروتئین هانچ بک تولید شده از ژن هانچ‌بک در ژنوم جنین می‌شود. پروموتور هانچ‌بک دارای سه جایگاه اتصالی با تمایل بالا و ۳ جایگاه با تمایل پائین به بیکوئید است. مگس‌های ترانس ژن حامل یک ژن حامل گزارشگر متصل به پروموتور مصنوعی شامل ۴ جایگاه با تمایل بالا یا **(d)** چهار جایگاه با تمایل پائین **(e)** تهیه می‌شوند. در پاسخ به شیب یکسان پروتئین بیکوئید در جنین، بیان ژن گزارشگر که توسط پروموتور حاوی جایگاه اتصال با تمایل بالا کنترل می‌شود نسبت به ژن گزارشگر حامل جایگاه با تمایل پائین بیشتر به سمت عقب کشیده می‌شود. این نتایج نشان می‌دهند که غلظت آستانه بیکوئید که نسخه‌برداری هانچ بک را فعال می‌کند، به تمایل جایگاه اتصال بیکوئید بستگی دارد. بیکوئید بقیه ژن‌های هدف را با یک مدل مشابه تنظیم می‌کند.

تولیدشده توسط مگس‌های ماده که دارای جهش بیکوئید هموزیگوت هستند فاقد قطعات جلویی می‌باشند که اهمیت پروتئین بیکوئید در تعیین سرنوشت سلول‌های جلویی را تصدیق می‌کند.

پروتئین بیکوئید یک فاکتور نسخه‌برداری از نوع هموُدمین است که بیان ژن‌های مختص بخش جلویی که بعداً بحث می‌شوند را فعال می‌سازد. در جنین سینسیتیال مگس، پروتئین بیکوئید در طول محور جلویی ـ عقبی جنین سینسیتیال ایجاد می‌شود. از آن‌جایی که اثربیکوئید وابسته به غلظت است، به عنوان یک مورفوژن عمل می‌کند. شواهدی که در آن‌ها شیب پروتئین بیکوئید ساختارهای جلویی را تعیین می‌کند، از طریق تزریق mRNAی بیکوئید سنتزی در موقعیت‌های مختلف جنین به دست آمد. این تیمار منجر به تشکیل ساختارهای جلویی در جایگاه تزریق شد. در آزمایش دیگری مگس‌هایی که بیکوئید زیادی تولید کردند، ساختارهای جلویی آنها گسترش یافت تا بخش عمده‌ای از جنین را اشغال نمود.

پروتئین بیکوئید نسخه‌برداری ژن **هانچ‌بک**[1] (hb) ژنوم جنین را افزایش می‌دهد. نسخه‌برداری hb در جلوی جنین جایی که‌غلظت بیکوئید بالا است، بیشترین مقدار را دارد. جهش در hb و چند ژن دیگر در ژنوم جنین منجر به ایجاد فاصله بزرگ در الگوی جلویی ـ عقبی جنین اولیه می‌شود: بنابراین این ژن‌ها مجموعاً **ژن‌های شکاف**[2] نامیده می‌شوند. چندین دلیل وجود دارد که پروتئین بیکوئید مستقیماً نسخه‌برداری hb را تنظیم می‌کند. برای مثال، افزایش نسخه‌های ژن بیکوئید شیب پروتئین‌های hb و بیکوئید را در ناحیهٔ عقبی به موازات هم زیاد می‌کند (شکل c و ۲۲a ـ۲۲). آنالیز ژن hb نشان داد که آن دارای سه جایگاه با تمایل پائین و یک جایگاه با تمایل بالا برای پروتئین بیکوئید است. آزمایشات با ژن‌های سنتزی شامل همهٔ جایگاه‌های با تمایل پائین و یا همهٔ جایگاه‌های با تمایل بالا، نشان می‌دهند که تمایل جایگاه غلظت آستانه بیکوئید که نسخه‌برداری از ژن را فعال می‌کند، تعیین می‌کند (شکل e و d ـ۲۲ ـ۲۵). علاوه بر این،تعداد جایگاه‌های اشغال شده اتصالی ـ بیکوئید در غلظت مربوطه، نشان داده شده است که تقویت یا سطح پاسخ نسخه‌برداری را تعیین می‌کند.

مطالعات توانایی بیکوئید برای تنظیم نسخه‌برداری ژن hb را نشان می‌دهند که تنوعات در سطوح فاکتورهای نسخه‌برداری و همچنین در تعداد یا تمایل توالی‌های تنظیمی ویژه ژن‌های مختلف و یا هر دو، در ایجاد الگوهای بیان ژنی متفاوت طی تکوین دروزوفیلا (مگس سرکه) نقش دارند. مکانیسم‌های مشابهی در تکوین موجودات دیگر به کار رفته است.

مهارکننده‌های ترجمه الگوبندی جلویی ـ عقبی را تقویت می‌کند.

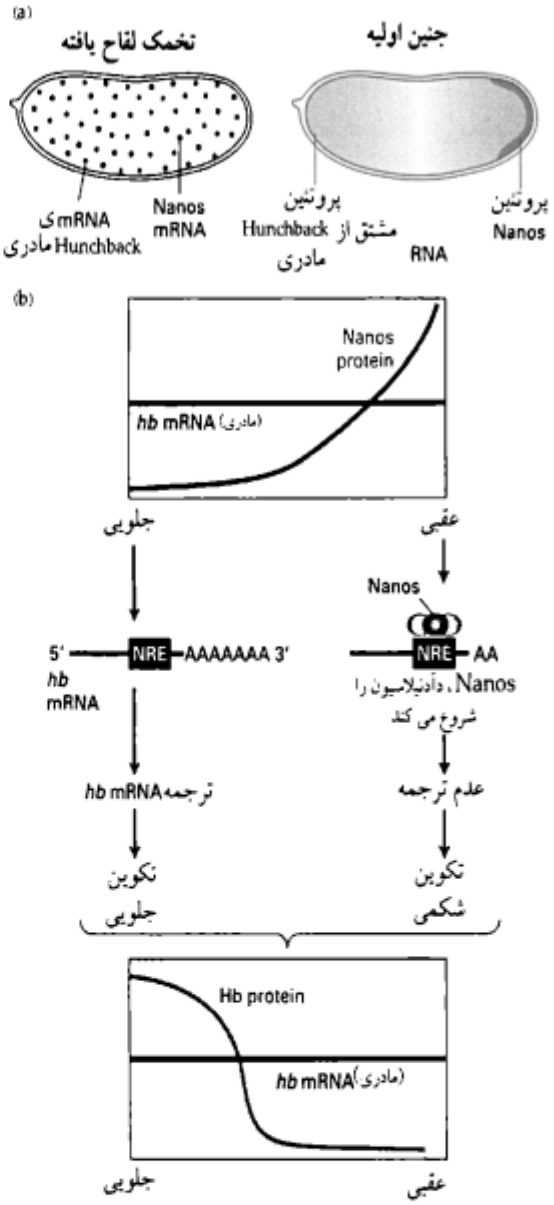
سرنوشت سلول در انتهای عقبی جنین مگس توسط مکانیسم‌های مختلف تعیین می‌شود. کنترل در سطح ترجمه‌ای بیشتر از سطح نسخه‌برداری صورت می‌گیرد. همانطور که بحث شد، نسخه‌برداری ژن hb که سرنوشت سلول‌های جلویی را پیش می‌برد، تولید یک باند hb mRNA و پروتئین hb در قسمت جلو می‌شود که به دلیل شیب جلویی ـ عقبی پروتئین بیکوئید مشتق از مادر می‌باشد. اما علاوه بر این، جنین اولیه دارای mRNAی hb سنتز شده توسط سلول‌های پرستار می‌باشد. گرچه این hb mRNA مادری در سراسر جنین توزیع می‌شود، ترجمهٔ آن در ناحیهٔ عقبی توسط پروتئین مادری دیگری که **نانوس**[3] نامیده می‌شود و در انتهای عقبی جنین واقع می‌باشد، جلوگیری می‌شود. مجموعه‌ای از ژن‌های مورد نیاز برای جایگیری عقبی پروتئین نانوس، همچنین برای تشکیل سلول‌های رده زایا در انتهای عقبی جنین نیاز می‌باشند. یکی از این ژن‌ها (**استوفن**)[4] برای تکوین سلول‌های زاینده اولیه (PGCs) در Zebrafish ضروری است. بنابراین از آنجا که ماهی‌ها و مگس‌ها دارای جدّ مشترکی هستند، حداقل بعضی از تنظیم کننده‌های رده زایا در آنها وجود دارد.

شکل ۲۶ـ۲۲ نشان می‌دهد که چگونه تنظیم ترجمه توسط نانوس به ثبات شیب جلویی ـ عقبی هانچ بک لازم برای تکوین طبیعی مگس کمک می‌کند. سرکوب ترجمه‌ای mRNAی hb توسط نانوس به توالی ویژه‌ای در ناحیهٔ ′۳ـ ترجمه نشده mRNA، (عناصر پاسخ به نانوس (NRE)، بستگی دارد. به همراه دو پروتئین اتصالی دیگر به RNA، نانوس به NRE در mRNA متصل می‌شود. نتایج ژنتیکی و مولکولی پیشنهاد می‌کنند که نانوس دآدنیلاسیون mRNAی hb را پیش می‌برد و بدان وسیله ترجمهٔ آن را کاهش می‌دهد. در غیاب نانوس، گردهم‌آیی پروتئین hb، در ناحیهٔ عقبی جنین منجر به نقص تشکیل طبیعی ساختارهای عقبی شده و جنین می‌میرد. بالعکس، اگر نانوس در جلو تولید شود در نتیجه با مهار تولید Hb از هر دوی mRNAی Hb مادری و جنینی، قطعات جلویی بدن ناقص تولید شده و نتیجتاً کشنده است. کنترل ترجمه‌ای به واسطهٔ عمل یک مهارکننده، جایگیری mRNA یا هر دو، شاید استراتژی رایج برای تنظیم تکوین باشد. برای مثال، mRNA ویژه‌ای در طی تکوین سلول‌های ماهیچه‌ای و طی تقسیمات سلولی در مخمر ساکارومایسس سرویزیه جایگیری می‌شود (شکل ۲۸ـ۲۲ را ملاحظه کنید).

بندبندی شدن حشرات توسط آبشاری از فاکتورهای نسخه‌برداری کنترل می‌شود.

در مهره‌داران و حشرات، محور جلویی ـ عقبی (سر ـ دم) به مجموعه‌های تکراری یا تکرارهای دقیق متنوع تقسیم می‌شود: مهره و گانگلیای همراه در مهره‌داران، قطعات بدنی در حشرات. ژن‌های ویژه‌ای تقسیمات جنین به تکرارها را کنترل می‌کنند، در حالی که ژن‌های دیگر اختلاف بین تکرارها را کنترل می‌کنند. همان طور که قبلاً ذکر شد، همهٔ مهره‌های مهره‌داران دارای دنده نمی‌باشد و همهٔ قطعات بدن حشرات به پا متصل نمی‌باشد. ما ژن‌های کنترل کننده بندبندی حشرات را در این بخش مورد بحث قرار می‌دهیم و

1- hunch back (hb)
2- Gap genes
3- Nanos
4- Staufen



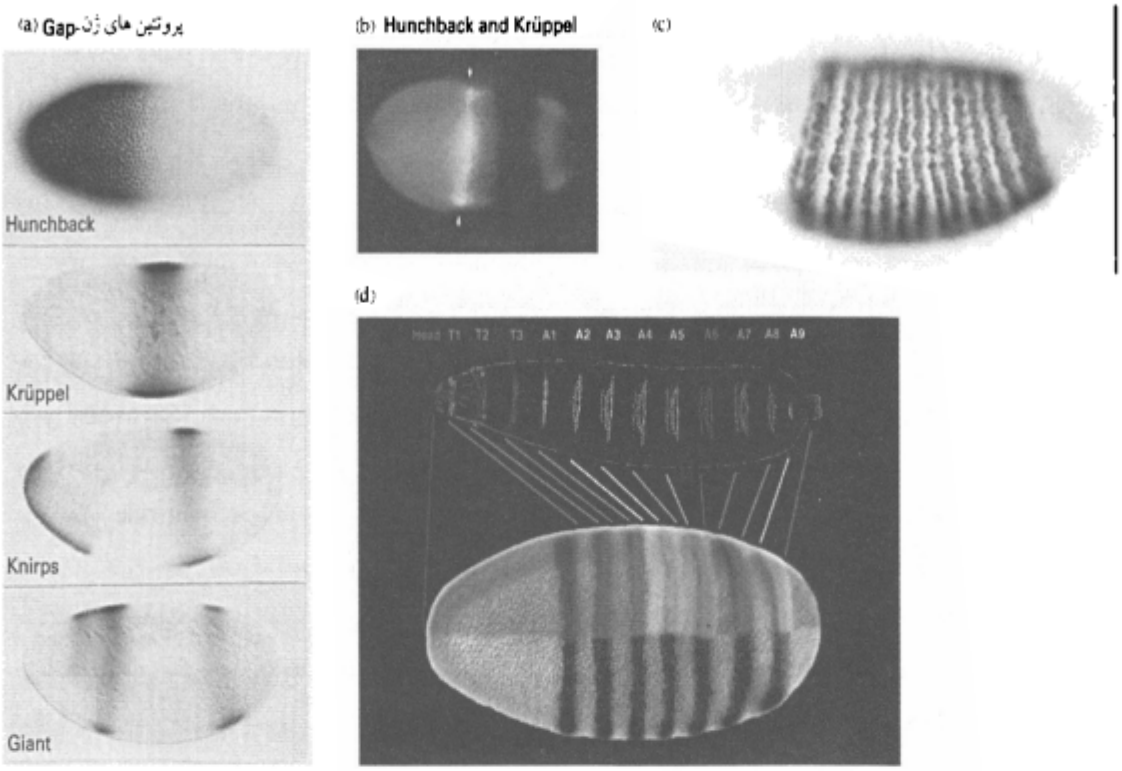
▲ **شکل ۲۲ـ۲۶ (شکل رنگی) نقش پروتئین نانوس در محروم کردن پروتئین Hb مشتق از مادر از ناحیهٔ عقبی جنین‌های دروزوفیلا.** (a) هم mRNAی نانوس (آبی) و هم mRNAی هانچ بک (قرمز) مشتق از مادر به صورت یکنواخت در تخمک لقاح یافته و جنین اولیه توزیع شده‌اند. پروتئین نانوس، که تنها در ناحیهٔ عقب تولید می‌شود، نتیجتاً ترجمهٔ mRNAی hb مادری را در ناحیه عقبی مهار می‌کند. (b) انتشار پروتئین نانوس از جایگاه سنتزش در ناحیهٔ عقبی، شیب جلویی ـ عقبی نانوس را برقرار می‌کند. ترکیبی از نانوس و دو پروتئین دیگر، ترجمهٔ نانوس و hb را مهار می‌کنند. در نتیجه، پروتئین hb مشتق از مادر، در مدل مرتبه‌ای بیان می‌شود که شیب پروتئین Hb حاصل از نسخه‌برداری کنترل شده، با بیکوئید از ژن hb جنین را تقویت و همسو می‌کند.

اختلاف بیشتر انواع تنظیم که بندبندی شدن را تحت‌نظر دارند در فصل بعد بررسی می‌کنیم. سپس در ژن‌هایی که اختلاف بین آنها را کنترل می‌کنند کاوش می‌کنیم.

زمانیکه ژن‌های شکاف به طور صحیح در جنین دروزوفیلا فعال شدند، مرحله بعدی در مسیر بندبندی شدن بدن توسط **آبشار فاکتورنسخه‌برداری** (TF) کنترل می‌شود که در آن یک TF ژن رمزکننده TF دیگر را کنترل می‌کند و آن هم به نوبه خود بیان TF سوم را کنترل می‌کند، در هر مرحله، بیش از یک ژن ممکن است تنظیم شود. یک آبشار TF می‌تواند تولید جمعیتی از سلول‌ها که ممکن است شبیه به نظر آیند بکند اما در سطح نسخه‌برداری فرق می‌کنند. آبشار TF دارای ابعاد دائمی و موقتی است. برای مثال در هر مرحله آبشار بیش از یک ساعت طول می‌کشد، RNA پلی‌مراز و ریبوزوم‌ها فاکتور نسخه‌برداری را از mRNA مربوطه تولید بکنند. فاکتورهای فضایی وقتی وارد عمل می‌شوند که سلول‌ها در موقعیت‌های متفاوت داخل جنین تولید فاکتورهای نسخه‌برداری متفاوتی را می‌کنند.

طرح نادرست سرنوشت سلول‌ها که در جنین سینسیتیال تنظیم می‌شود توسط سیستم دقیق کنترل سرنوشت سلول‌های منفرد پالایش می‌شود. کشف تنظیم کننده‌های مناسب توسط غربال‌گری‌های ژنتیکی جهش‌های تغییردهنده بندبندی‌های بدن جنین حاصل شد. علاوه بر هانچ بک، چهار ژن شکاف دیگر ـ kruppel، knirps، giant و tailles ـ در دُمین‌های فضایی ویژه‌ای در حدود ۲ ساعت بعد از لقاح شروع به نسخه‌برداری می‌کنند (شکل ۲۲ـ۲۷a). بیان این ژن‌ها، شبیه هانچ بک، اول توسط فاکتورهای مادری و سپس توسط برهمکنش عرضی بین ژن‌های شکاف تنظیم می‌شود.

همهٔ پروتئین‌های ژن‌های شکاف فاکتورهای نسخه‌برداری هستند. چون این ژن‌ها در قلّه‌های همپوشان توزیع شده‌اند (شکل ۲۲ـ۲۷b)، هر سلول در امتداد محور جلویی ـ عقبی شامل ترکیب پروتئینی ویژه‌ای از ژن‌های شکاف است که ژن‌های ویژه‌ای را در سلول فعال یا سرکوب می‌کنند. به راستی، چیزی شبیه جنگ رخ می‌دهد چون بعضی پروتئین شکاف نسخه‌برداری ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های دیگر شکاف را سرکوب می‌کنند. گرچه آنها لیگاندهای خارج سلولی شناخته شده‌ای ندارند، بعضی پروتئین‌های شکاف به نظر گیرندهٔ هسته‌ای می‌آیند، که پروتئین داخل سلولی می‌باشند و به لیگاند لیپوفیلیک (مثل هورمون‌های استروئیدی) که قادر به عبور از غشای پلاسمایی است متصل می‌شوند. اغلب کمپلکس‌های گیرنده هسته‌ای ـ لیگاند به عنوان فاکتور نسخه‌برداری عمل می‌کنند (شکل ۷ـ۵۰ را ملاحظه کنید). شباهت توالی بین پروتئین‌های شکاف و



▲شکل تجربی ۲۷ـ۲۲ (شکل رنگی) ژن‌های gap و جفت-قاعده در الگوهای فضایی مشخص در جنین اولیه دروزوفیلا بیان می‌شوند. جنین‌های تثبیت شده و نفوذپذیر شده با آنتی بادی نشاندار فلورسنت برای یک پروتئین ویژه رنگ‌آمیزی شدند. همهٔ جنین‌های نشان داده شده با موقعیت قسمت جلویی، در چپ و پشتی، در بالا قرار دارند. (a) این جنین‌های سینسیتیال به صورت منفرد برای پروتئین رمزشده برای ۴ تا از ۵ ژن gap رنگ‌آمیزی شدند. نسخه‌برداری kruppel، knirps و ژن‌های gap، توسط هانچ‌بک، بیکوئید و کودال تنظیم می‌شود. (b) این جنین سینسیتیال رنگ‌آمیزی دوگانه برای پروتئین هانچ‌بک (قرمز) و کراپل (سبز) شده است. پروتئین هانچ‌بک عقبی در اینجا تنها به سختی در قسمت (a) قابل مشاهده است. ناحیهٔ زرد جایی را نشان می‌دهد که تولیدات این دو پروتئین gap، همپوشانی می‌کنند. در این جنین مرحله بلاستودرم، پروتئین‌های Fushi tarazu (آبی) و Even-skipped (قهوه‌ای) به ترتیب توسط ژن‌های جفت-قاعده، ftz و eve رمز می‌شوند که در نوارها بیان می‌شوند. هر نوار معادل سلول‌های پریموردیال یک قطعه بدن است. روی هم رفته حدود ۱۴ قطعه شکل می‌گیرد. هیچ شاهد مورفولوژیک برای بندبندی در این مرحله دیده نشده است، اما رنگ‌آمیزی برای پروتئین mRNA شروع طرح بندبندی را آشکار کرد. (d) رابطهٔ بین پریموردیای اولیه (جنین کوچک‌تر) و بیان نوارهایی از یک ژن جفت-قاعده (خاکستری تیره) و قطعات لاروهایی که تشکیل شده‌اند (لارو بزرگ‌تر) رسم شده است. رنگ‌ها نشانگر قطعات مختلف هستند، از سر به دم، و این که چگونه آنها از جنین به لارو مرتبط می‌شوند. دقت کنید که هر قطعه از یک پریموردیوم که در حدود ۴ سلول عرض (در مسیر سر به دم) و در حدود ۶۰ سلول دور تا دور آن است، تکوین می‌یابد. نیمی از قطعات از سلول‌هایی تکوین می‌یابند که ژن جفت-قاعده را بیان می‌کنند و نیمی از بین نوارها (Interstripes) که آن را بیان نمی‌کنند.

گیرنده‌های هسته‌ای پیشنهاد می‌کنند که ژن‌های شکاف از ژن‌هایی بیرون می‌آیند که نسخه‌برداری آنها توسط سیگنال‌هایی که می‌توانند از عرض غشا عبور کنند، کنترل می‌شود. استفاده از این چنین ژن‌های کنترل شونده توسط پیام، بجای آبشارهای TF، می‌تواند توضیح دهد که چگونه در حیواناتی که مرحلهٔ سینسیتیال ندارند، تعیین سرنوشت سلولی اولیه عمل می‌کند.

سرنوشت سلول‌های توزیع شده در امتداد محور جلویی ـ عقبی در اوایل تکوین مگس مشخص می‌شود. در همین زمان، سلول‌ها به سیستم کنترلی پشتی ـ شکمی پاسخ می‌دهند. بنابراین هر سلول به صورت فردی در امتداد هر دو محور مشخص قرار می‌گیرد. اگر هر یک از پنج ژن شکاف در بخش خودشان در جنین در غلظت مناسب، بیان شوند، تنها پنج نوع سلول می‌تواند شکل بگیرد. موقعیت‌های واقعی اجازه تنوع بیشتری در سلول‌ها می‌دهد. میزان هر پروتئین شکاف از **پایین تا بالا تا پایین** در امتداد محور جلویی ـ عقبی تغییر

می‌کند و بیان دُمین‌های مختلف ژن‌های شکاف همپوشانی می‌کند. این پیچیدگی، ترکیباتی از فاکتورهای نسخه‌برداری ایجاد می‌کند که‌منجر به ایجاد بیش از پنج نوع سلول می‌شود. به طور آشکار، مرحله بعدی درتکوین دروزوفیلا یک الگوی تکراری از انواع سلول‌ها نسبت به الگوی غیرتکراری آشفته دُمین‌های بیان ژن شکاف تولید می‌کند.

اولین علامت بندبندی در جنین مگس، یک الگوی نوارهای تکراری از نسخه‌برداری هشت ژن که مجموعاً **ژن‌های جفت-قاعده‌ای**[1] نامیده می‌شوند، است (شکل ۲۷c-۲۲). بدن لارو مگس از ۱۴ بند تشکیل شده است و هر **ژن** جفت-قاعده‌ای در نیمهٔ اولیه (جلویی) بند، بیان می‌شود یا از ۷ نوار که توسط نوار بینابینی جایی که ژن pair-rule نسخه‌برداری نمی‌شود جدا می‌شوند (شکل ۲۷d-۲۲). جنین جهش یافته که فاقد عملکرد ژن‌های جفت قاعده هستند دارای قطعات بدنی ادغام شده با یکدیگر به صورت جفت می‌باشد. نوارهای بیانی هر ژن جفت-قاعده‌ای به طور جزئی با دیگر ژن‌های جفت-قاعده‌ای همپوشانی می‌کند، بنابراین هر ژن باید در مسیر واحدی به ژن شکاف و بقیهٔ تنظیم کننده‌های اولیه پاسخ دهد.

نسخه‌برداری ژن‌های جفت-قاعده‌ای توسط فاکتورهای نسخه‌برداری رمزشده توسط ژن‌های مادری و شکاف کنترل می‌شود چون ژن‌های مادری و شکاف در بیرون بیان می‌شوند، نوارهای غیرتکراری، سئوالی را ایجاد می‌کنند: چطور اینچنین الگوی غیرتکراری از فعالیت ژن‌ها یک الگوی تکراری مانند بیان نواری ژن‌های جفت-قاعده‌ای را می‌تواند اعطا نماید؟ برای پاسخ به این سئوال، ما نسخه‌برداری ژن **even-skipped (eve)** را در نوار ۲ که توسط پروتئین مشتق از مادر، بیکوئید و پروتئین‌های gap، krupple و Giant کنترل می‌شود، بررسی می‌کنیم. هر چهار فاکتور نسخه‌برداری به یک مجموعه دسته‌بندی شده از جایگاه‌های تنظیمی یا افزاینده متصل می‌شوند که در بالا دست پروموتور eve قرار دارند (۲۸a-۲۲). هانچ بک و بیکوئید نسخه‌برداری eve را در دُمین مجزای خارجی فعال می‌کنند، بنابراین مرزهای بخش عقبی و بخش جلویی را به صورت تیز در آورند. اثرات ترکیبی این پروتئین‌ها که هر کدام شیب واحدی را در امتداد محور جلویی ـ عقبی دارند، به صورت اولیه مرز بیان نوار ۲ را نشان‌گذاری می‌کند (شکل ۲۸b-۲۲).

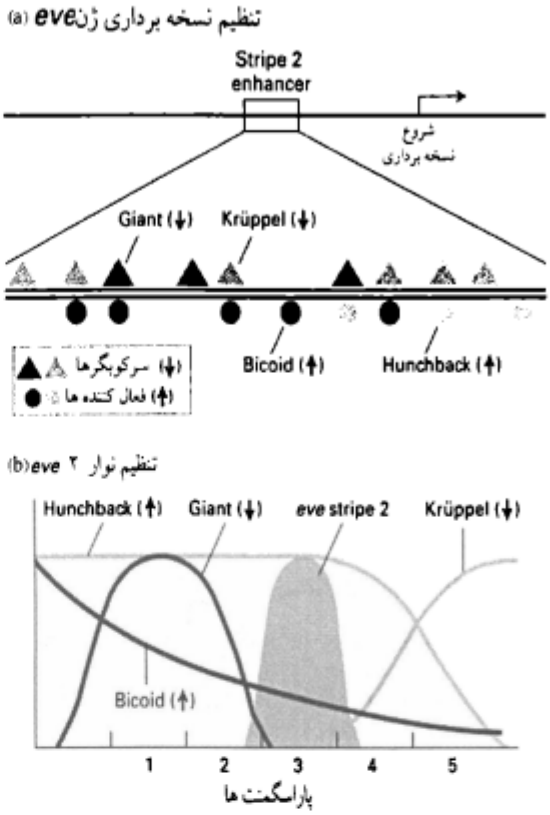
همچنین بیان نوارهای دیگر eve به افزاینده‌های[2] ویژه‌ای بستگی دارد. هر نوار بیان eve در پاسخ به یک ترکیب متفاوت تنظیم کننده‌های نسخه‌برداری عملگر بر یک افزاینده ویژه تشکیل می‌شود، بنابراین توزیع غیرتکراری تنظیم کننده‌ها الگوهای تکراری برای سرکوب و فعال کردن ژن جفت-قاعده ایجاد می‌کند. حتی اگر یک افزاینده به یک ترکیب فعال کننده تنظیم نسخه‌برداری متصل شود حضور افزاینده‌های دیگر غیرفعال، حالت «خاموش» (به تنظیم کننده متصل نیست) نخواهد توانست از نسخه‌برداری جلوگیری کند. برای مثال در نوار ۳، eve ترکیب درست و مقادیر کافی از هانچ بک و بیکوئید حالت «روشن» را ایجاد می‌کند که نسخه‌برداری را فعال می‌کند، گرچه بقیه افزاینده‌ها در حالت غیرفعال وجود دارند. در هر نوار، حداقل یک افزاینده به ترکیب فعال کننده تنظیم کننده‌ها متصل می‌شود. توجه کنید که این سیستم کنترل ژنی انعطاف‌پذیر است و می‌تواند برای تولید الگوهای غیرتکراری از نسخه‌برداری اگر برای موجود مفید باشد، استفاده شود.

پاسخ‌های مشابهی به پروتئین‌های شکافی و مادری، الگوهای نواری نسخه‌برداری دو ژن دیگر جفت-قاعده‌ای، runt و hairy را اداره می‌کنند. چون افزاینده‌های runt و hairy به طور جزئی یکی با دیگری همپوشانی می‌کند و هر نوار برای هر کدام از ژن‌ها از نوار ژن دیگر افست می‌شود، نتیجتاً، ژن‌های جفت-قاعده‌ای دیگر شامل Fushi tarazu (ftz) و paired، در پاسخ به پروتئین‌های Eve، Runt و Hairy که فاکتورهای نسخه‌برداری هستند و به علاوه در پاسخ به پروتئین‌های شکافی و مادری فعال می‌شوند. نتیجهٔ این آبشار فاکتور نسخه‌برداری، یک الگوی نوارهای همپوشان است.

الگوی آغازی نوارهای جفت-قاعده‌ای، که خیلی صریح و دقیق نیست، توسط خودتنظیمی دقیق می‌شود. برای مثال، پروتئین Eve، به ژن خود متصل شده و نسخه‌برداری را در نوار افزایش می‌دهد، و یک حلقه خودتنظیمی مثبت ایجاد می‌شود. این افزایش در لبهٔ نوارها جایی که غلظت اولیه پروتئین Eve پائین است رخ نمی‌دهد، بنابراین مرز بین **نوار** و **بین نوار** به خوبی سازگار می‌شود.

ژن‌های جفت-قاعده‌ای تشکیل مرزهای بندبندی جنین را اداره می‌کنند. از آنجایی که هر ژن جفت-قاعده‌ای در نوارها بیان می‌شود و هر نوار با مرز یک بند همپوشانی می‌کند، هر ژن جفت-قاعده‌ای در نیمی از مرز قطعه توزیع می‌شود. با عملکرد توأم همه، ژن‌های جفت-قاعده‌ای همهٔ مرزهای بند (قطعه) شکل می‌گیرد و دیگر عناصر الگو در داخل هر بند کنترل می‌شود. در جنین اولیه هر قطعه آغازین در امتداد محور جلویی ـ عقبی به اندازه چهار سلول پهنا دارد که به شکل تقریبی با عرض نوارهای بیان جفت-قاعده‌ای منطبق است. با ژن‌های فعال جفت-قاعده‌ای در الگوی ۴ تا خاموش ۴ تا روشن، واحد تکراری در حدود ۸ سلول است.

1- Pair-rule genes 2- Enhancers



▲ **شکل ۲۸ـ۲۲. کنترل نوار ۲ (eve) even-skipped در جنین دروزوفیلا.** تنها یکی از ژن eve نوارها نشان داده شده است. درداخل هر نوار eve مرز قطعه بعداً تشکیل خواهد شد. بنابراین عملکرد eve نصف مرز قطعات را در جنین ایجاد می‌کند. (a) دیاگرامی از افزاینده ۸۱۵ جفت بازی کنترل کننده نسخه‌برداری ژن جفت-قاعده در نوار ۲. این ناحیهٔ تنظیمی شامل جایگاه‌های اتصال برای پروتئین‌های بیکوئید و هانچبک است که نسخه‌برداری eve را فعال می‌کنند، و برای پروتئین‌های kruppel و Giant که آن را غیرفعال می‌کنند، افزاینده با همهٔ جایگاه‌های اتصال اشغال شده است، اما در جنین اشغال جایگاه‌ها در امتداد محور جلویی ـ عقبی بسیار متنوع خواهد بود. (b) شیب غلظت ۴ فاکتور نسخه‌برداری که نوار ۲ eve را تنظیم می‌کند. اثرات هماهنگ دو سرکوبگر (↓) و دو فعال کننده (↑) مرزهای دقیق نوار eve جلویی دوم را تعیین می‌کنند. تنها در ناحیه نارنجی ترکیب تنظیم کننده‌ها برای ژن eve که در پاسخ به عنصر کنترل نوار ۲ نسخه‌برداری می‌شود، درست است. در ناحیه جلوتر Giant، eve را خاموش می‌کند، در ناحیهٔ عقبی‌تر سطح فعال کننده بیکوئید برای غلبه بر سرکوب kruppel بسیار پائین است. بیان نوارهای دیگر به صورت مستقل با ترکیبی از فاکتورهای نسخه‌برداری که به افزاینده‌هایی که در قسمت (a) رسم نشده‌اند، متصل می‌شوند، تنظیم می‌شود.

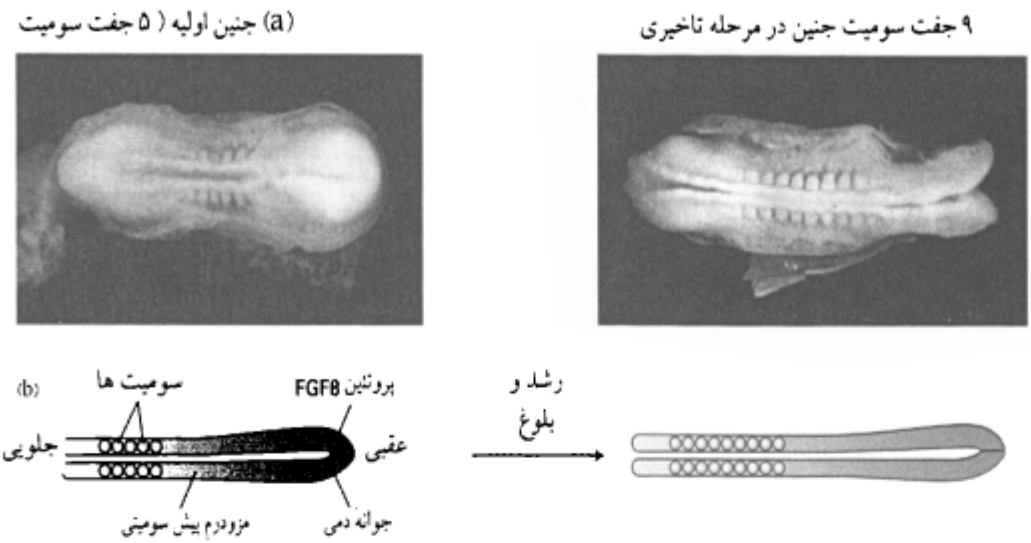
هر سلول ترکیبی از فاکتورهای نسخه‌برداری را بیان می‌کند که می‌تواند آن را از هر کدام از ۷ سلول مجزا کند. تحت کنترل پروتئین‌های جفت-قاعده‌ای و **ژن‌های قطبیت بند**[1] که دیرترفعال می‌شوند، مورفولوژی تکرار قطعات ظهور پیدا می‌کند؛ و در حدود ۱۰ ساعت بعد از لقاح کامل می‌شود. همانطوری که تعیین سرنوشت سلول در جنین مگس پیش می‌رود، انواعی از پیام‌های پروتئینی نقش بازی می‌کنند. اینها شامل هجهوگ و Wnt هستند که توسط ژن‌های قطبیت بند کد شده و در نوارها، (هر نوار در داخل یک بند)، تحت کنترل محصولات ژن‌های جفت-قاعده‌ای تولید می‌شوند. نوارهای پهن‌تر و اولیه‌تر با بیان ژن جفت-قاعده‌ای در نواحی معینی همپوشانی می‌کنند و آن جایی است که ترکیبات ویژه فاکتورهای نسخه‌برداری جفت-قاعده‌ای الگوی مناسبی از نوارهای ژن قطبیت بند را ایجاد می‌کنند. توجه کنید که شروع کنترل‌های مبتنی بر پیام به سلول‌ها اجازه می‌دهد تا به این که چگونه با سلول‌های همسایه رفتار کند و اتصالاتی بسازد پاسخ دهد. به عبارتی قسمت‌هایی از الگو ممکن است از دست رفته یا دوبرابر شود.

از شیب گسترده بیکوئید مادری تا دقت تک سلول ژن‌های قطبیت بند، جنین مگس به صورت پیش‌رونده‌ای به واحدهای تکراری تقسیم می‌شود. می‌توان تصور کرد که چطور تغییر در افزاینده‌های ویژه نوار، مقادیر فاکتورهای نسخه‌برداری و دامنهٔ پیام‌های تکوین خواهند توانست الگوی بندبندی در موجودات مختلف را تغییر دهد.

بندبندی شدن مهره‌داران با بیان چرخه‌ای ژن‌های تنظیمی کنترل می‌شود.

حالا به مهره‌داران بر میگردیم تا بررسی کنیم چگونه بندبندی در این حیوانات قابل مقایسه با حشرات می‌شود. بعد از این که سه محور بدن در جنین مهره‌داران برقرار شدند، تغییرات مهیج در امتداد آنها اتفاق می‌افتد. یکی از قابل مشاهده‌ترین تغییرات آغاز الگوی بندبندی‌شدن است که بعداً باعث ایجاد مهره‌ها و دنده‌ها می‌شود. این یک الگوبندی در امتداد محور جلویی (سر) عقبی (دم) است. در موش‌ها و انسان‌ها، اولین نشانه مهره در مزودرمی که زیر خط اولیه جمع می‌شود، نمایان می‌شود. تشکیل مزودرم را به خاطر آورید که با یک گذر مزانشیم ـ اپی تلیا سلول‌ها در امتداد خط اولیه جدا شده و به داخل مهاجرت می‌کنند (شکل ۱۱ـ۲۲).

1- Segment - Polarity genes



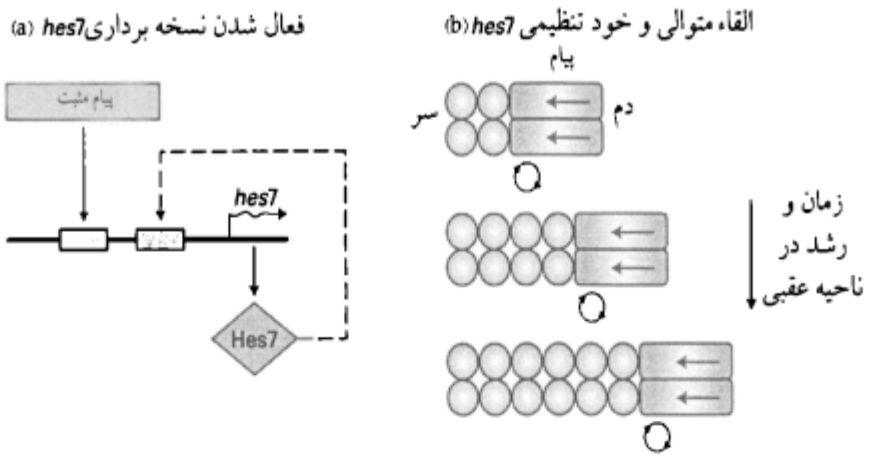
▲ **شکل ۲۹ـ۲۲. تشکیل پیش رونده سومیت‌ها در جنین‌های انسان:** (a) پنج جفت سومیت در جلوی جنین اولیه در سمت چپ تشکیل شده‌اند. تشکیل سومیت به سمت ناحیهٔ عقبی انجام می‌شود و در جنین بعدی در سمت راست، ۹ جفت تشکیل شده است. در هر دو میکروگراف، سر در حال تکوین در سمت چپ و جوانه‌دمی در سمت راست است. (b) شیب‌های FGF8، یک پروتئین ترشحی که در جوانه دم تشکیل می‌شود، و رتینوئیک اسید از سر، تشکیل سومیت را از مزودرم پیش سومیتی کنترل می‌کند که در ابتدا از جوانه دمی شروع می‌شود. سطوح بالای FGF8 از بلوغ سلول‌های پیش سومیتی به سومیت در ناحیهٔ عقبی جلوگیری می‌کند، در حالی که سطوح بالای رتینوئیک اسید تشکیل سومیت‌ها را تحریک می‌کند.

در هر سمت محور میانی، مزودرم متشکل از سلول‌های سست مزانشیمی شروع به گردشدن نموده تا ایجاد سلول‌های جفت اپی‌تلیای مارپیچی که **سومیت** نامیده می‌شوند، را بکنند. سومیت‌ها به صورت اولیه در جلو ایجاد می‌شوند و پی در پی در جهت پشتی، جفت جفت به نظر می‌آیند (شکل ۲۹a ـ۲۲). این مورد برجسته از گذر اپی‌تلیا ـ مزانشیم نتایج ژرفی‌برای جنین دارد. از سومیت‌ها، مهره‌ها و دنده‌ها، ماهیچه‌های دیواره بدن و اعضا و درم (پوست داخلی) پشت بدن ایجاد می‌شوند. بدون سومیت‌ها (شکل بدن) ما حباب‌مانند بود.

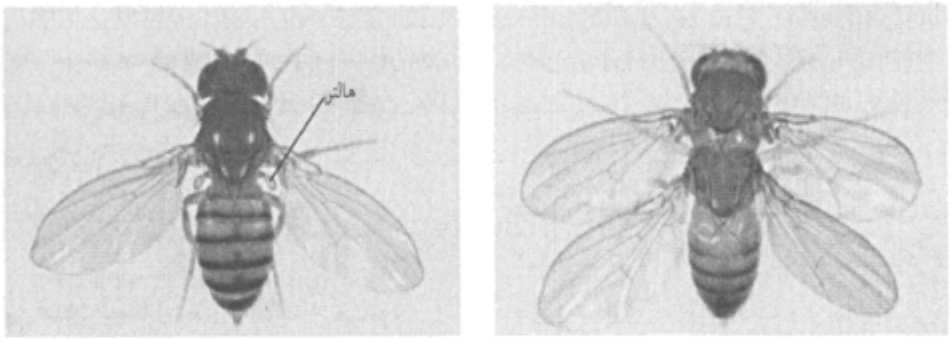
مزودرمی که هنوز سومیت‌ها را ایجاد نکرده است، مزودرم **پیش‌سومیتی**[1] نامیده می‌شود. همچنان که گاسترولاسیون در جهت عقبی منتشر می‌شود، سومیت‌ها از مزودرم پیش سومیتی ایجاد شده و مزودرم پیش سومیتی بیشتری به صورت عقبی تشکیل می‌شود. فعل و انفعال چهار سیستم پیام‌رسانی در محدوده جلویی مزودرم پیش سومیتی، تشکیل سومیت را کنترل می‌کند: یک پیام FGF از دم، یک پیام رتینوئیک اسید از ناحیهٔ سری و پیام‌های Wnt و نوتچ در مزودرم پیش سومیتی. ژن fgf8 در مزودرم پیش سومیتی جایی در نزدیکی انتهای عقبی جنین بیان می‌شود. چون fgf8 mRNA ناپایدار است، بیشترین سطح پروتئین FGF8 در عقب ساخته شده و شیبی در جهت جلو ایجاد می‌کند. سطوح بالای FGF8 از بلوغ سلول‌ها در داخل سومیت‌ها در عقب جلوگیری می‌کند. متقابلا، رتینوئیک اسید در ناحیهٔ سر جنین در مدل شیب‌دار عمل می‌کند، بیشترین مقدار در مزودرم پیش‌سومیتی جلویی، تا تشکیل سومیت‌ها را تحریک می‌کند (شکل ۲۹b ـ۲۲).

فوق‌العاده‌ترین جنبه تنظیم تشکیل سومیت در مهره‌داران در مطالعهٔ ژن hairy1 جوجه که در ارتباط با یکی از ژن‌های بندبندی جفت-قاعده‌ای دروزوفیلا است، کشف شد. دورگه‌سازی در In situ تکوین سومیت‌ها در جنین جوجه نشان داد که رونوشت hairy1 در چرخه‌هایی تولید می‌شود که هر چرخه به اندازه زمان تشکیل یک سومیت می‌باشد (۹۰ دقیقه در جوجه و طولانی‌تر در پستانداران). موج بیان hairy1 در مزودرم پیش سومیتی (غیربندبندی) از عقب به جلو حرکت می‌کند. تحقیقات بعدی ژن‌های بیشتری که چرخه‌های بیانی را می‌گذرانند آشکار کرد و معلوم شد همه وابسته به مسیر پیام‌رسانی Wnt و نوتچ هستند. جهش در هر مسیر باعث نقص مؤثری در تشکیل سومیت می‌شود. برای نمونه در انسان‌ها، جهش‌هایی که ترکیبات مسیر نوتچ را تحت تأثیر قرار می‌دهند، باعث سندرم آلاژیله و سندرم ژارکو-لوین می‌شوند، که هر دو باعث ناقص‌الخلقه بودن مهره‌ها می‌شود.

1- Presomitic



▲ **شکل ۲۲-۳۰. کنترل بیان چرخه‌ای ژن در سومیت‌های در حال تکوین.** (a) یک انفجار آغازی از نسخه‌برداری hes7 توسط یک پیام مثبت، احتمالاً FGF8، شروع می‌شود. همان‌طور که پروتئین hes7 (جزئی از مسیر نوتچ) تجمع می‌یابد، سرانجام به ژن خود متصل شده و نسخه‌برداری را خاموش می‌کند. این فرآیند، در آغاز تشکیل هر سومیت، ناحیهٔ عقبی مزودرم پیش سومیتی تکرار می‌شود. (b) پیام FGF8 در انتهای عقبی است، بنابراین مزودرم پیش سومیتی عقبی بیشتری راه‌اندازی می‌شود تا برنامه‌های بیان چرخه‌ای Wnt و نوتچ و حلقه‌های فیدبک منفی که آنها را خاموش می‌کنند نشان می‌دهند.



جهش یافته *Ubx* — طبیعی

▲ **شکل ۲۲-۳۱. فنوتیپ‌های ژن Hox.** مانند دیگر ژن‌های Hox، ژن اولترابی توراکس (Ubx) سازماندهی سلول‌ها را در داخل ناحیه‌ای که در آن بیان می‌شود، کنترل می‌کند. عمل طبیعی آن جلوگیری از تشکیل بال است، به طوری که مگس‌های نرمال یک جفت بال دارند. جهش در ژن‌های Hox اغلب منجر به تشکیل قطعات در جایی که به صورت طبیعی نباید باشد، می‌شود. در مگس جهش یافته فقدان عملکرد Ubx از قطعه سوم سینه‌ای اجازه‌می‌دهد بال‌ها در جایی که به صورت طبیعی باید هالترها در آنجا تشکیل می‌شدند، ایجاد شوند.

برای هر دو مسیر نوتچ و Wnt، حلقه‌های فیدبک برقرار شده‌اند که باعث بیان چرخه‌ای موقتی می‌شوند، برای مثال ژن hes7 فاکتور نسخه‌برداری را رمز می‌کند و در میسر پیام‌رسانی Notch درگیر است. زمانی که نسخه‌برداری hes7 توسط پیام FGF از مزودرم پیش سومیتی عقبی تحریک می‌شود، یک انفجاری از تولید پروتئین Hes7 اتفاق می‌افتد (شکل ۲۲-۳۰a). پروتئین Hes7، درعوض بیان ژن‌های هدف را کنترل می‌کند که در تشکیل سومیت مشارکت می‌کنند. به خاطر این که Hes7 همچنین به عنوان گیرنده برای ژن خود عمل می‌کند، به ژن خود متصل می‌شود و آن را خاموش می‌کند، تجمع پروتئین hes7 وقتی به سطح کافی و بالا رسید سرکوب نسخه‌برداری hes7 اتفاق می‌افتد. سپس این خود تنظیمی منفی مدت بیان hes7 را محدود می‌کند. هر قسمت از مزودرم پیش سومیتی به نوبه خود چنین عملی را انجام می‌دهد: نسخه‌برداری hes7 روشن، تجمع پروتئین hes7 و سپس نسخه برداری hes7 خاموش می‌شود (شکل ۲۲-۳۰b) همچنین زمانی که منبع پیام FGF در نزدیک سر شروع می‌شود و در ناحیهٔ عقبی عقب‌نشینی می‌کند، hes7 اول در جلویی‌ترین نواحی نسخه‌برداری می‌شود و سپس در نواحی عقبی‌تر پیش می‌رود. یک سیستم فیدبک مشابه در پیام‌رسانی Wnt عمل می‌کند، و دوباره باعث انفجار بیان ژن گویی سومیت تشکیل می‌شود، انفجار دیگر در سلول‌هایی که بعداً سومیت خواهند شد، رخ می‌دهد. اگر حلقهٔ فیدبک Wnt یا نوتچ بلوکه شود،

سومیت‌ها شدیداً غیرطبیعی می‌شوند، اما جزئیات این که چطور دو مسیر شکل‌دهی سومیت‌ها را کنترل می‌کنند ناشناخته است.

ما حالا فهمیدیم که دو استراتژی مختلف تشکیل قطعات تکراری بدن در حشرات و مهره‌داران را کنترل می‌کنند. در دروزوفیلا، تنظیم برای هر قطعه بدن فرق می‌کند، ترکیبات متفاوت فاکتورهای نسخه‌برداری شکافی، در نواحی ویژه‌ای در امتداد محور جلویی ـ عقبی با اثرات مادری فعال می‌شود، نوارهای ژن جفت-قاعده‌ای را تنظیم می‌کند و فاکتورهای نسخه‌برداری جفت-قاعده‌ای به منظور تنظیم نوارهای ظریف‌تر روی نسخه‌برداری ژن قطبیت قطعه ترکیب می‌شوند. هر نوار دارای یک تاریخچه تنظیمی مشخص درگیر در پروتئین‌های جفت-قاعده‌ای و gap متفاوت است. بنابراین تشکیل تکرار توسط تفاوت‌های فضایی کنترل می‌شود. در مقابل، سومیت‌های تکراری مهره‌داران توسط مراحل تنظیمی مشابه که دوباره و دوباره در حال رخ دادن هستند، تشکیل می‌شوند. یک سیستم فیدبک بارز، ایجاد یک ساعت چرخه‌ای را می‌کند که باعث می‌شود ژن‌های مسئول ساخت سومیت‌ها به صورت انفجاری بیان شوند. بنابراین تشکیل تکراری توسط اختلافات **زمانی** (زمان) کنترل می‌شود.

اختلاف بین قطعات توسط ژن‌های Hox کنترل می‌شود

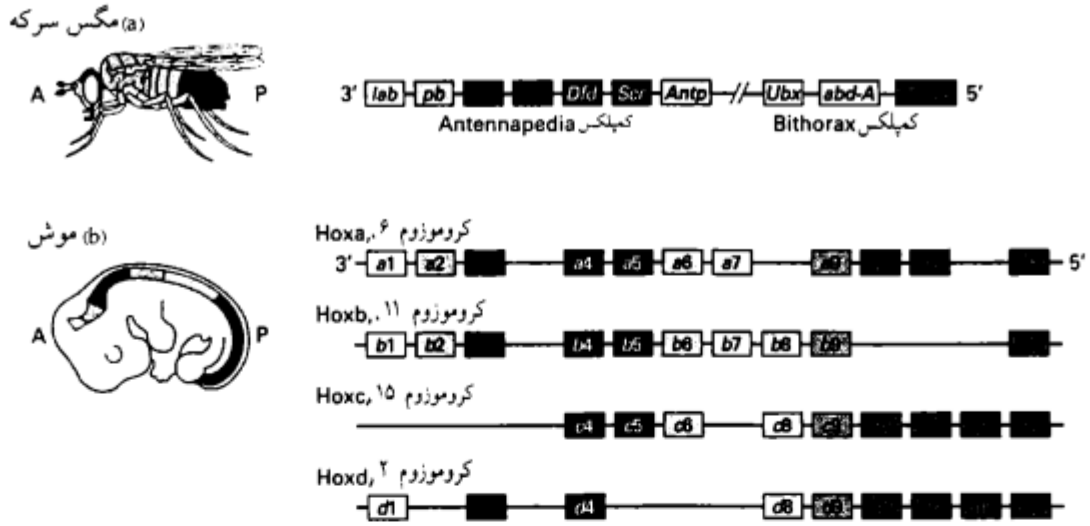
با وجود اختلاف در این که چطور قطعات تکراری بدن در حشرات و مهره‌داران شکل می‌گیرد، دو گروه از جانوران در بکارگیری خانواده مشابهی از ژن‌ها برای ایجاد تنوع در بین تکرارها یکپارچه می‌شوند. این ژن‌ها، **ژن‌های Hox** نام دارند که اختلاف در هویت سلول‌ها را کنترل می‌کنند و در حقیقت هویت کل قطعات بدن یک جانور در امتداد محور جلویی ـ عقبی را کنترل می‌کنند. این تفاوت‌ها تکرار طبیعی و اساسی بعضی بافت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. ژن‌های Hox فاکتورهای نسخه‌بردای خیلی وابسته بهم شامل موتیف **هومئودُمین**[1] را رمز می‌کنند (فصل ۷). در واقع، چیزی که کل گروه پروتئین‌های Hox را متحد می‌کند، یک توالی مشابه هومئودمین اتصالی به DNA است، این پروتئین‌ها در نواحی دیگر خودشان تشابه کمتری دارند. توالی‌های هومئودُمین همچنان پایه طبقه‌بندی ژن‌های Hox هستند.

جهش‌ها در ژن‌های Hox اغلب باعث **هومیوسیز**[2] می‌شود. هومیوسیز به معنی تشکیل یک قطعه بدنی دارای صفات طبیعی یافت شده در جایگاه متفاوت می‌باشد. برای مثال، در بعضی جهش یافته‌های مگس به جای آنتن‌ها سر در پاها رشد می‌کند. فقدان عملکرد ژن ویژه Hox در محلی که به صورت نرمال فعال است باعث هومیوسیز می‌شود. اگر یک ژن Hox متفاوت در آنجا سرکوب شود، در نتیجه سلول‌ها و صفات ساختاری ژن‌های سرکوب شده شکل می‌گیرند. ژن Hoxای که به صورت طبیعی در جایی که غیرفعال است بیان می‌شود می‌تواند جانشین شود و مسیر تکوین مناسب خود را در جایگاه جدید تحمیل کند (شکل ۳۱ـ۲۲).

سازماندهی ژن‌های Hox: مطالعات ژنتیکی کلاسیک در دروزوفیلا منجر به کشف اولین ژن‌های Hox شد (مانند Antennapedia و Ultrabithorax). ژن‌های مرتبط با عملکردهای مشابه (ارتولوگ‌ها) در اغلب گونه‌های جانوری مشخص شده‌اند. هر ژن Hox در ناحیه ویژه‌ای در امتداد محور جلویی ـ عقبی در آرایش بارزی نسخه برداری می‌شود، بطوریکه در آنجا ترتیب ژن‌ها در امتداد کروموزوم ترتیب ژن‌هایی است که در محور جلویی ـ عقبی بیان می‌شوند (شکل ۳۲aـ۲۲). ژن‌های Hox در مگس در دو جایگاه کروموزم یکسان قرار دارند اما در واقع یک دسته هشت‌تایی از ژن‌های Hox هستند. در یک انتهای دسته ژن‌های «سری» هستند، که به طور ویژه در ناحیه سر نسخه‌برداری می‌شوند و برای تشکیل ساختارهای ناحیه سری ضروری هستند. در کنار آنها ژن‌ها فعال و عملکردی در سینه هستند و در انتهای دیگر دسته ژن‌های شکمی هستند. این نظم مضاعف‌شدگی‌ها تکاملی ژن را منعکس می‌کند و چون ژن‌ها در توالی‌های تنظیمی مانند افزاینده‌ها شرکت می‌کنند حفظ می‌شود (فصل ۷). بیان دُمین ژن‌های Hox می‌تواند روی هم بیفتد، بنابراین تکوین ساختارهای ویژه بدن می‌تواند وابسته به بیش از یک ژن باشد.

در دروزوفیلا، الگوی فضایی نسخه‌برداری ژن‌های Hox توسط فاکتورهای نسخه‌برداری مادری gap و جفت-قاعده‌ای تنظیم می‌شود. پروتئین رمز شده توسط یک ژن ویژه Hox سازماندهی سلول‌ها در داخل ناحیه‌ای که ژن Hox بیان می‌شود را کنترل می‌کند. برای مثال، یک پروتئین Hox می‌تواند تولید موضعی پروتئین‌های پیام‌رسانی ترشحی، گیرنده‌های سطح سلولی یا فاکتور نسخه‌برداری که برای ساختن یک زائده در یک قطعه ویژه بدن لازم است، را هدایت یا ممانعت کند. پروتئین‌های Hox دروزوفیلا نسخه‌برداری ژن‌های هدفی که پروتئین‌هایی رمز می‌کنند که تنوع مورفولوژیک قطعات بدن را تعیین می‌کنند، کنترل می‌کنند.

1- Homeodomain 2- Homeosis

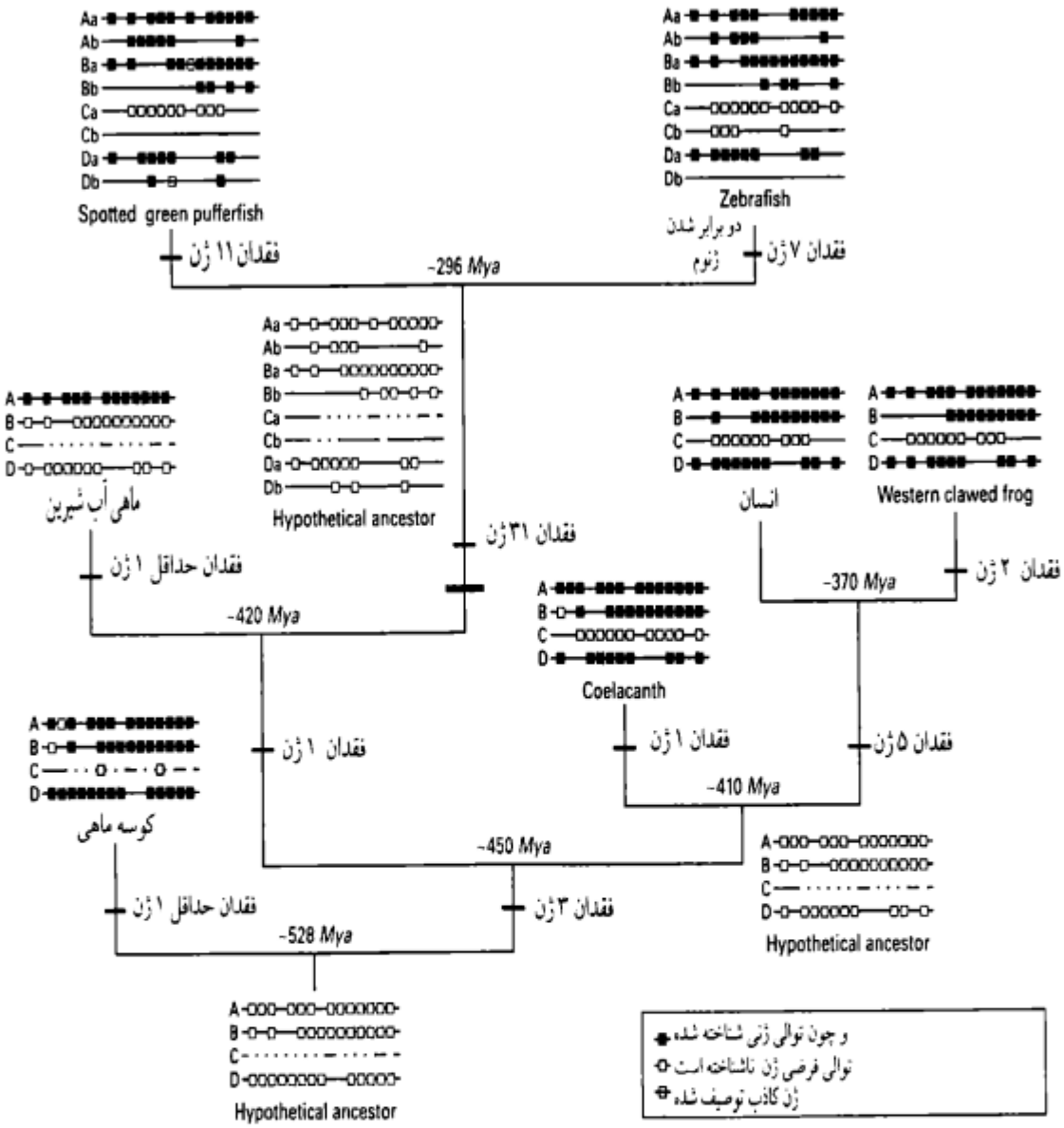


▲ **شکل ۲۲ـ۳۲ (شکل رنگی) روابط بین دسته‌های ژن Hox در دروزوفیلا و پستانداران. (a)** یک دسته منفرد ژن Hox دروزوفیلا در دو جایگاه کروموزومی شکافته می‌شود، یک گروه ژنی کمپلکس Antennapedia و دیگری کمپلکس بی‌توراکس است. ژنی که تشکیل سر را کنترل می‌کند در انتهای 3′ دسته (سایه‌های زرد/قرمز) و آنهایی که تشکیل شکم را کنترل می‌کنند در انتهای 5′ (سایه‌های سبز/آبی) هستند و ژنی که در بین آنها است، ساختارهای سینه‌ای (بنفش) را کنترل می‌کند، همانطور که در نقشهٔ مگس دیده می‌شود، جایگاه بیان ژن‌های مختلف را نشان می‌دهد. **(b)** نظم ژن‌ها در دسته‌های ژنی Hox انسان مشابه با دروزوفیلا است اما ۴ دسته هستند و هر دسته یک مجموعه از ژن‌ها را ندارد. برای مثال، دسته ۱ ژن Hox موش و انسان مشابه با ژن lab دروزوفیلا بر اساس توالی پروتئین‌های رمزکننده است. در دسته‌های Hox a و b و d یک کلاس ۱ ژنی وجود دارد، اما در دستهٔ C وجود ندارد. در مقابل، ژن دسته ۴ در همهٔ دسته‌های پستانداران نشان داده می‌شود. اختلاف دیگر بین حشرات و پستانداران، نسخه‌های اضافی ژن‌های عقبی (۹ به بالا) است که با ژن‌های نوع abd در مگس‌ها در ارتباطند. نقشه‌های جنین‌های موش و مگس نشان می‌دهد که جایی که نسخه‌برداری ژن Hox دیده می‌شود نظم آن طی نیم میلیون سال از زمانی که جد مشترک داشتند، حفظ شده است. نقشه‌های مختصرسازی هستند، در حالی که در خیلی از موارد یک ژن به صورت مرز شدید در سر بیان می‌شود و هم دارای الگوی بیان شیبی به سمت دم است و الگوهای بیان بین بافت‌های مختلف، متفاوت است.

هنوز درباره این که چطور مورفولوژی توسط این ژن‌های هدف کنترل می‌شود مشخص نیست. اما بعضی ژن‌های هدف پیام‌های قوی Wnt و TGFβ را رمز می‌کنند. اتحاد پروتئین‌های Hox با جایگاه‌های گیرنده روی DNA توسط کوفاکتورهایی که به هر دو DNA و پروتئین‌های Hox متصل می‌شوند با اضافه کردن ویژگی و تمایل به این برهمکنش‌ها، مساعدت می‌شود.

در مورد مهره‌داران چطور؟ در مقایسه با مگس‌ها، که یک دسته‌منفرد ژن Hox دارند، پستانداران ۴ نسخه از دستهٔ Hox (a-d) واقع در کروموزم‌های متفاوت دارند (شکل ۲۲ـ۳۲b). در داخل هر دسته، ژن‌ها انتهای سری از ۱ تا انتهای دمی که ۱۳ نامگذاری می‌شوند. نسخه‌های متفاوت از ژن‌های ویژه (مثل Hox4) در ۴ دسته به توالی دیگر ژن Hox در رده نامگذاری دیگر نزدیک هستند. گرچه ژن‌های Hox پستانداران به وضوح به ژن‌های Hox مگس مرتبط هستند، بیان ژن‌های نوع abd مگس در مهره‌داران گسترش یافته است (رده‌های Hox ۸ تا ۱۳). در داخل هر دسته بعضی ژن‌ها از دست رفته‌اند، از قرار معلوم به خاطر این است که ۲ یا ۳ نسخه دیگر کافی هستند. آزمایشات با موشهایی که یک یا چند ژن Hox را از یک دسته نامگذاری شده از دست داده‌اند تکرار اضافی قابل ملاحظه‌ای در بین کل ۳۹ ژن نشان می‌دهد.

تکامل دسته‌های ژنی Hox: دسته‌های Hox اغلب مهیج‌ترین نمونه از حفظ ژن‌های گروه‌های ژنی در میان دامنه وسیعی از حیوانات هستند. سازماندهی آنها بسیار چشمگیر است که آنها به عنوان ابزارهای مفید برای مطالعه تکامل به کار می‌روند. دسته منفرد Hox در دروزوفیلا ۴ برابر در پستانداران نمایان می‌شوند (شکل ۲۲ـ۳۲ را ملاحظه کنید). مقایسه توالی‌های ژنوم وابسته‌های مهره‌داران آشکار کرد که نسخه‌های دسته‌های Hox کامل نیستند. طی تکامل، بعضی گونه‌ها یک یا بیشتر ژن Hox را از دست می‌دهند، در گونه‌های دیگر، ژن‌های Hox در داخل یک دسته دو برابر شده‌اند. انتقالات بین دسته‌های مختلف و از دست رفتن‌ها و به دست آوردن ژن‌ها Hox منفرد در بین موجودات امروزی اجازه می‌دهند که اشکال اجدادی استنتاج شوند (شکل ۲۲ـ۳۳). برای مثال، در حدود ۳۷۰ میلیون سال قبل، زمانی که قورباغه‌ها و انسان‌ها اجداد مشترکی داشتند، قورباغه‌ها ژن Hox b12 و Hox b13 را از دست دادند. همچنان که مطالعات بیشتر برای چگونگی کنترل مورفولوژی بدن توسط ژن‌های Hox انجام می‌شود، جالب است که احتمال این می‌رود که تغییرات تکاملی در



▲ **شکل ۲۲.۳۳ (شکل رنگی). تکامل دسته‌های Hox پستانداران.** پروژه‌های ژنوم که همهٔ ژن‌های از موجودات مختلف تعیین توالی می‌شوند، به علاوه تمرکز مطالعات بر روی ژن‌های Hox، دیدگاهی را برای تکامل دسته‌های Hox فراهم می‌کند. دسته‌های Hox نشان داده شده در اینجا سبز تیره، آبی، زرد و قرمز بر پایه تعیین توالی ژنوم از ارگانیسم‌های امروز، هستند. مقایسه توالی‌های مهره‌داران مختلف آشکار نمود که نسخه‌هایی از دسته‌های Hox کامل نیستند، در بعضی گونه‌ها، یک ژن یا بیشتر از دست رفته است، در حالی که در دیگری ژن‌های در یک دسته دوبرابر شده‌اند. از آنجایی که فسیل‌شناسی و مطالعات حفظ توالی DNA روابط بین موجودات نشان داده شده در اینجا را برقرار نمودند، استنتاج نظم ژن‌های Hox در اجداد فرضی (ژن‌ها در رنگ روشن) و از بازسازی خلاصه رویدادهای اتفاق افتاده در دسته‌های ژنی Hox امکان دارد. فاصله تقریب زمانی تقریبی (mya: میلیون سال قبل)، از آنجایی که یک جفت گونه جد مشترکی داشتند به صورت قرمز نشان داده می‌شود. البته نه همهٔ اجداد در اینجا نشان داده شده‌اند و نه هر مرحله استنتاج شده است. همچنین مطالعات بیشتر انجام شده برای این که چطور ژن‌های Hox مورفولوژی بدن را کنترل می‌کنند، بررسی رابطهٔ احتمالی بین تغییرات تکاملی در ژن‌های Hox و الگوها تشکیل جنینی که آن را کنترل می‌کنند، جالب خواهد بود.

ژن‌های Hox در ارتباط است با الگوی تشکیل جنینی که آنها تشکیل آن را کنترل می‌کنند. این دیدگاه ژنومیک با ادامه تعیین توالی ژنومی در بررسی تکامل، جزئیات بیشتری درباره سابقه زیستی فراهم می‌کند.

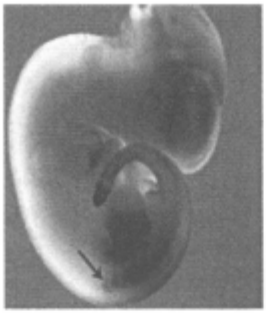
عملکرد پروتئین‌های Hox در مهره‌داران: پروتئین‌های Hox مورفولوژی‌های متفاوت مهره‌ها، قطعات تکراری مغز عقبی و انگشت‌های اعضاء را کنترل می‌کنند. جهش‌ها اغلب بعضی از ژن‌های Hox موجود در قسمت عقبی انسان که باعث سندرم‌های وراثتی که درگیر پلی داکتیلی (انگشت‌ها یا پنجه‌های اضافی) و سین داکتیلی (ادغام انگشت‌ها) هستند، تحت تأثیر قرار می‌دهند. ژن‌های Hox ویژه همچنین در خیلی از بافت‌های دیگر فعال هستند. مانند مگس، پروتئین‌های Hox پستانداران اغلب با ترکیب کنترل ژن‌های هدف عمل می‌کنند و کوفاکتورهایی شبیه آنهایی که در مگس استفاده می‌شود، به کار می‌برند. جهش‌ها بعضی از این کوفاکتورها را که در سرطان انسان دخالت دارند، تحت تأثیر قرار می‌دهند.

شبیه مگس بیان دُمین‌های ژن Hox در جنین اولیه مهره‌داران ظاهراً مسئول مرزهای نامرئی هستند که بعداً با انتقالات بین واحدهای تکراری بدن در ارتباط هستند. هر ژن Hox در بعضی مواقع بیان می‌شود اما بقیه بیان نمی‌شوند (شکل ۳۴ـ۲۲). آنها اول در مزودرم پیش سومیتی بیان می‌شوند، جایی که مورفولوژی مهره‌ها را که بعداً شکل می‌گیرند کنترل می‌کنند.

مهره‌ها بر طبق مورفولوژی و موقعیت‌شان در امتداد محور جلویی عقبی به دو گروه تقسیم می‌شوند. تأثیر جهش‌های Hox در تکوین مهره‌ای توسط جهش‌یافته‌های مهره‌ای موشی مهندسی شده مطالعه شده است. در یکی از آزمایش‌های سخت، موش‌هایی تولید شدند که فاقد ژن‌های Hoxa10، Hoxc10 و Hoxd10 بودند (Hoxb10 وجود ندارد). این موش‌های تغییر شکل شگفت‌انگیز الگوهای مهره‌ای را نشان دادند. مهره‌های کمری و حتی خاجی، که در حالت طبیعی هیچ دنده‌ای ندارند، با درجات متفاوت از دنده‌های جزئی تکوین پیدا کردند (شکل ۳۵ـ۲۲). نتیجه این است که نقش طبیعی فاکتورهای نسخه‌برداری ژن Hox10، جلوگیری از تکوین دنده‌ها می‌باشد.

بیان ژن Hox توسط مکانیسم‌های متنوعی حفظ می‌شود.

زمانی که ژن‌های Hox روشن می‌شوند، نسخه‌برداری آنها باید برای حفظ خواص سلول در موقعیت‌های ویژه ادامه یابد. همچنین در حدود جفت-قاعده ژن even-skipped، مناطق تنظیمی بعضی



▲ **شکل ۳۴ـ۲۲. بیان ژن Hoxc10 موشی در سومیت‌ها.** مرز جلویی بیان Hoxc10 (پیکان) به وضوح در جنین روز ۹ قابل مشاهده است.

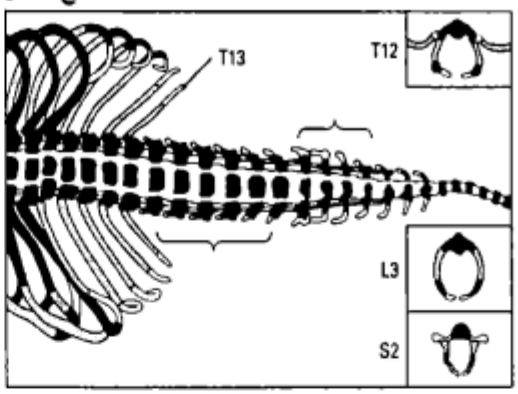
ژن‌های Hox دارای جایگاه‌های اتصال برای پروتئین‌های رمزشدهٔشان هستند. بنابراین پروتئین‌های Hox می‌توانند به حفظ بیان خودشان در خیلی از نسل‌های سلولی با استفاده از یک حلقهٔ خودتنظیمی کمک کنند.

مکانیسم دیگر برای حفظ الگوهای طبیعی بیان ژن‌های Hox نیاز به پروتئین‌هایی دارد که ساختار کروماتین را تنظیم می‌کنند. این پروتئین‌ها توسط دو دسته از ژن‌ها با عنوان گروه **تری‌توراکس**[1] و گروه **پلی‌کمپ**[2] رمزگذاری می‌شوند. الگوی بیان ژن Hox به صورت اولیه در جهش یافته‌های گروه پلی‌کمپ طبیعی است، اما سرانجام نسخه‌برداری ژن Hox در جایگاه‌هایی که ژن باید غیرفعال شود، سرکوب می‌شود. نتیجه، تغییر شکل‌های هومئوتیک چندگانه است، که دلالت بر این دارد که عملکرد طبیعی پروتئین‌های پلی‌کمپ حفظ ژن‌های Hox در حالت غیرفعال از لحاظ نسخه‌برداری است. نتایج مطالعات ایمونوهیستولوژیکی و بیوشیمیایی نشان دادند که پروتئین‌های پلی‌کمپ به موقعیت‌های کروموزومی چندتایی متصل می‌شوند و کمپلکس‌های بزرگی شامل پروتئین‌های مختلف گروه پلی‌کمپ را تشکیل می‌دهند. دیدگاه اخیر این است که سرکوب موقت ژن‌ها توسط پروتئین‌های الگودهی در مراحل اولیه تکوین توسط پروتئین‌های پلی‌کمپ قفل می‌شود. این سرکوب پایدار وابسته به پلی‌کمپ ممکن است در نتیجهٔ توانایی این پروتئین‌ها برای گردهم‌آیی ساختارهای کروماتین غیرفعال باشد (فصل ۷). ترکیبات پلی‌کمپ شامل پروتئین‌های زیادی مانند هیستون داستیلازها هستند و به نظر می‌رسد نسخه‌برداری را با اصلاح هیستون‌ها به منظور شروع خاموشی ژن غیرفعال می‌کنند.

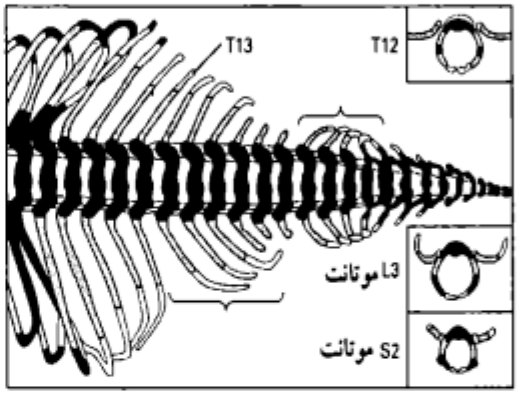
در حالی که پروتئین‌های پلی‌کمپ بیان ژن‌های Hox معین را

1- Trithorax 2- Polycomb

نوع وحشی



جهش یافته Hox10 (فقدان همه ژنهای Hox10a.c و ژنهای d)



سرکوب می‌کنند، پروتئین‌های رمزشده توسط گروه تری‌توراکس ژن‌ها برای حفظ بیان ژن‌های Hox ضروری هستند. مانند پروتئین‌های پلی‌کمپ، پروتئین‌های تری‌توراکس به جایگاه‌های چندگانه کروموزومی متصل می‌شوند و ترکیبات چند پروتئین بزرگی تشکیل می‌دهند، بعضی‌ها تقریباً 2×10^6Da جرم دارند که، در حدود نصف اندازهٔ ریبوزوم هستند. بعضی پروتئین‌های گروه تری‌توراکس با پروتئین‌های مخمری SWI/SNF همولوگ هستند، که برای فعال سازی نسخه‌برداری خیلی از ژن‌های مخمری ضروری هستند. پروتئین‌های تری‌توراکس بیان ژن را با اصلاح دوباره ساختار کروماتین در جایگاه‌های معین برای تشکیل نسخه‌برداری فعال تحریک می‌کند (شکل ۴۳ـ۷). هسته هر کمپلکس یک ATPase است و اغلب از کلاس Brm پروتئین‌ها است. شواهدی وجود دارد که خیلی یا اغلب ژن‌ها چنین کمپلکس‌هایی برای انجام نسخه‌برداری نیاز دارند.

خیلی از تنظیم کننده‌های بیان ژن Hox در لوسمی درگیر هستند. جابجایی کروموزومی که ژن‌های رمزکننده این تنظیم‌کننده‌ها را به توالی‌های تازه ادغام می‌کند، بعضی اوقات باعث می‌شود یک ژن رمزکننده کایمریک تشکیل شود، که مکرراً در پروتئین‌های لوکمی پیدا می‌شود. برای مثال، بعضی عملکردها می‌توانند انکوژن‌هایی ایجاد کنند که باعث می‌شود سلول‌های سفید خونی به صورت کنترل نشده رشد کنند (شکل ۵۰ـ۲۵ را ملاحظه کنید). ژن‌های Hox در سلول‌های خونی فعال هستند، گرچه اعمال Hox در آن سلول‌ها کاملاً مشخص نشده است.

ژن‌های هومئوتیک ـ به عبارتی، ژن‌هایی شبیه Hox که تکوین کل اجزای بدن را کنترل می‌کنند ـ در تکوین نیز همانطور که در زیر آمده است، اهمیت دارند.

◀ شکل تجربی ۳۵ـ۲۲ (شکل رنگی). ژن Hoxc10 شکل مهره‌ها را تنظیم می‌کند. موش‌های دچار نقص ژنی مجزا تولید شدند، که هر کدام فاقد یکی از پروتئین‌های c و Hox 10a و یا d بودند. هر یک از این ژن‌ها روی یک کروموزوم متفاوت قرار دارند. در هر مورد، ژن‌های هتروزیگوت چون یک کپی ثانویه، نوع وحشی، را داشتند زنده ماندند. موش‌ها برای تولید جهش‌یافته‌های هتروزیگوت در هر سه جایگاه ژنتیکی کراس شدند. کراس این موش‌ها با همدیگر جنین‌هایی با جهش‌یافته هتروزیگوت فاقد دو کپی از سه تا ژن Hox10 ایجاد می‌کند. استخوان از جنین‌های جهش‌یافته ۱۸/۵ روزه و نوع وحشی جدا شد و برای آشکارکردن جزئیات اسکلت رنگ‌آمیزی شدند. این دیاگرام‌ها نتایج برش عرضی و نگاه از بالا، بر پایه رنگ‌آمیزی اسکلت، را نشان می‌دهند. در موش‌های نوع وحشی، مهرهٔ سینه‌ای (T)، دارای دنده و اغلب دنده‌های عقبی بر روی T13 هستند. مهره‌های کمری (آبی) و خاجی (قرمز) دنده ندارند. جهش‌یافته‌های هموزیگوت برای هر سه ژن دارای دنده بر روی مهره‌های کمری (مانند L3) که به صورت نرمال فاقد دنده است و حتی دنده‌های خاجی (مانند S2) دارند. بر طبق این نتایج ما می‌توانیم استنباط کنیم که پروتئین‌های Hox10 به طور نرمال برای سرکوب تشکیل دنده در تکوین مهره‌های کمری و خاجی نیاز هستند. از آنجایی که ژن‌های Hoxb به صورت نرمال در این نواحی جنین بیان می‌شوند، این نتیجه به دست می‌آید. اگر هیچ کدام از ژن‌های Hox10 عملکرد نداشته باشند، دنده اضافی دیده نمی‌شود یا تنها به صورت نادر دیده می‌شود، بنابراین ژن‌های Hox10 حداقل دارای عملکرد نسبتاً تکراری اضافی هستند.

تکوین گل نیاز به تولید تنظیم شده فضایی فاکتورهای نسخه برداری دارد.

به نظر می‌رسد با یک پرش بزرگ از بندبندی جانوران به گیاهان، به جزء در مورد مولکول‌هایی که تشکیل الگو را کنترل می‌کنند، خیلی از اصول مشابه است. گل‌ها مانند بندهای مهره‌دار یا حشره، دارای بخش‌های تکراری هستند. مکانیسم‌های پایه کنترل تکوین در گیاهان بیشتر شبیه آنهایی‌اند که در دروزوفیلا است: تولید افتراقی فاکتورهای نسخه‌برداری، در مکان و زمان کنترل می‌شود و سرنوشت سلول‌ها را مشخص می‌کند.

دانسته‌های ما از کنترل هویت سلول در گیاهان تا حد زیادی از انتخاب **آرابیدوپسیس تالیانا**[1] به عنوان ارگانیسم مدل می‌باشد. این گیاه خیلی از مزایای مشابه مگس و کرم‌ها را برای استفاده به عنوان سیستم مدل دارد: آسان رشد می‌کند، جهش‌یافته‌ها می‌تواند به دست آید و ارگانیسم‌های ترانس ژن می‌تواند ایجاد شود. ما بر مکانیسم‌های کنترل نسخه‌برداری معین تنظیم کننده تشکیل هویت سلول‌ها در گل‌ها تمرکز می‌کنیم. این مکانیسم‌ها شدیداً مشابه با کنترل نوع سلول و تعیین نواحی پشتی جلویی در مخمر و حیوانات است.

اندام‌های گل: یک گل شامل چهار اندام متفاوت به نامهای کاسبرگ، گلبرگ، پرچم‌ها و پرچه هست که در دایره‌های هم‌مرکز که حلقه نامیده می‌شوند، آرایش پیدا می‌کنند. حلقه ۱ خارجی‌ترین و حلقه ۴ داخلی‌ترین است. آرابیدوپسیس دارای یک مجموعهٔ کامل از اندام‌های گل شامل ۴ کاسبرگ در حلقهٔ ۱، ۴ گلبرگ در حلقه ۲، ۶ پرچم در حلقه ۳ و ۲ برچه شامل تخمدان در حلقه ۴ است (شکل ۲۲ـ۳۶a). این اندام‌ها از سلول‌های تمایز نیافته و غیرقابل تشخیص از لحاظ مورفولوژیک که مریستم گل نامیده می‌شود، رشد می‌کنند. سلول‌ها در مرکز مریستم تقسیم می‌شوند، ۴ حلقه هم‌مرکز پریموردیا مکرراً شکل می‌گیرند. حلقه پریموردیوم خارجی، که تبدیل به کاسبرگ می‌شود در ابتدا شکل می‌گیرد، به دنبال آن پریموردیوم گلبرگ ایجاد می‌کند و سپس پرچم و پریموردیوم برچه شکل می‌گیرد.

ژن‌های هویت اندام[2] **گل** مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که تکوین طبیعی گل نیاز به سه دسته از ژن‌های هویت اندام گل، که A، B و C هستند، دارد. جهش در اینها تولید فنوتیپ هایی برابر با آنهایی که ارتباط با جهش‌های هومئوتیک در مگس و پستانداران است، می‌کند؛ به عبارتی یک جزء بدن با دیگری جایگزین می‌شود. در گیاهان فاقد عملکرد A، B و C، اندام گل مانند برگ تکوین می‌یابد (شکل ۲۲ـ۳۶b چپ را ملاحظه کنید).

جهش‌های فقدان عملکردی که منجر به شناسایی کلاس‌های ژنی A، B و C می‌شوند، در شکل ۲۲ـ۳۶b (راست) خلاصه شده‌اند. براساس فنوتیپ‌های هومئوتیک مشاهده شده، دانشمندان یک مدل برای توضیح چگونگی کنترل ژنی هویت اندام گل توسط این سه دسته پیشنهاد می‌کنند. برطبق مدل ABC برای تعیین اندام گل، ژن‌های کلاس A هویت کاسبرگ در حلقه ۱ را تعیین می‌کنند، و به دسته ژنی B یا C نیاز ندارند. مشابهاً، ژن‌های کلاس C هویت برچه در حلقهٔ ۴ را مشخص می‌کنند و مستقل از ژن‌های کلاس B و C عمل می‌کنند. در مقایسه با این ساختارها، که تنها با یک دسته ژنی مشخص می‌شوند، گلبرگ‌ها در حلقه ۲ توسط ژن‌های دسته A و B مشخص می‌شوند و پرچم‌ها در حلقه ۳ توسط ژن‌های دسته B و C مشخص می‌شود. این مدل بیان می‌کند که ژن‌های A ژن‌های C را در حلقه ۱ و ۲ و بالعکس ژن‌های C، ژن‌های A را در حلقه ۳ و ۴ سرکوب می‌کنند.

برای تعیین این که آیا بیان واقعی الگوهای ژنی کلاس A، B و C سازگار با این مدل است، محققان این ژن‌ها را کلون کردند و بیان الگوهای mRNA آنها را در ۴ حلقه گیاهان آرابیدوپسیس نوع وحشی و جهش یافته‌های فاقد عملکرد برآورد کردند (شکل ۲۲ـ۳۷a و b). در توافق با مدل ABC، ژن‌های A در حلقه ۱ و ۲ بیان شدند، ژن‌های B در حلقه ۲ و ۳ و ژن‌های C در حلقه ۳ و ۴ بیان شدند. علاوه بر این، در جهش یافته‌های A، همچنین دسته C در اندام پریموردیای حلقه ۱ و ۲، و مشابها در جهش یافته‌های C، ژن‌های A در پریموردیای حلقه ۳ و ۴ بیان می‌شوند. این یافته‌ها سازگار با تغییر شکل‌های هومئوتیک مشاهده شده در این جهش یافته‌ها است.

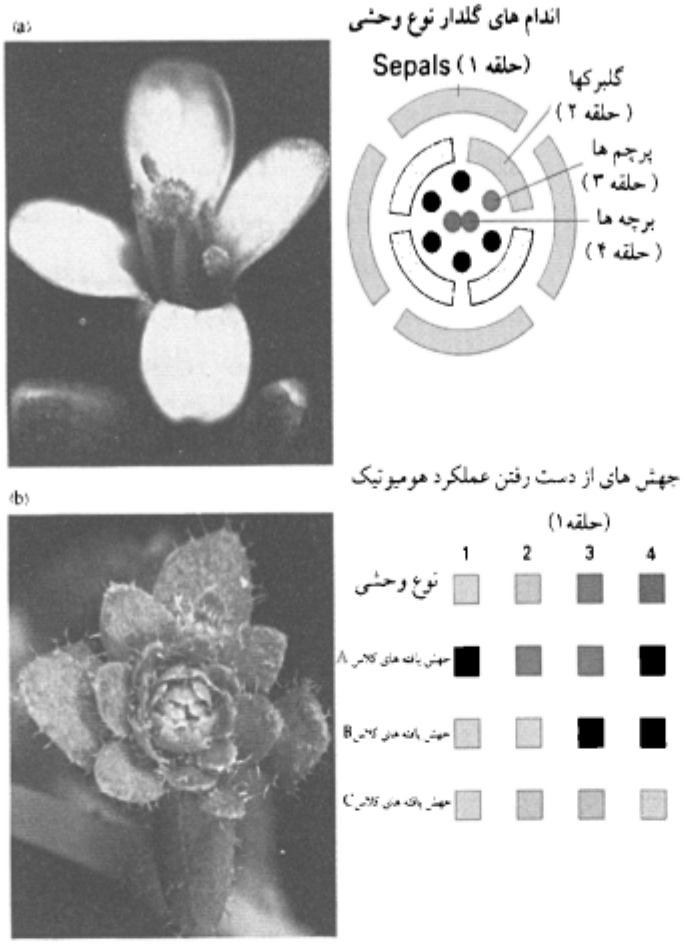
برای آزمایش این که آیا این الگوهای بیان از لحاظ عملکردی اهمیت دارند، دانشمندان گیاهان آرابیدوپسیس ترانس ژن تولید کردند که در آنها ژن‌های تعیین هویت اندام گل در حلقه‌های غیراختصاصی بیان شدند. برای مثال، دخول یک ترانس ژن حامل ژن دسته B متصل به پروموتور دسته A منجر به بیان فراوان ژن B در تمام حلقه‌ها می‌شود (شکل ۲۲ـ۳۷c). در چنین ترانس ژن‌ها، حلقهٔ ۱، تحت کنترل ژن‌های دسته A و B، به جای کاسبرگ به گلبرگ تکوین می‌یابد، مشابهاً، حلقه ۴ تحت کنترل هر دو دسته ژن B و C به جای برچه، ایجاد پرچم می‌کند. این نتایج از اهمیت عملکردی مدل ABC برای تعیین هویت گل حمایت می‌کنند.

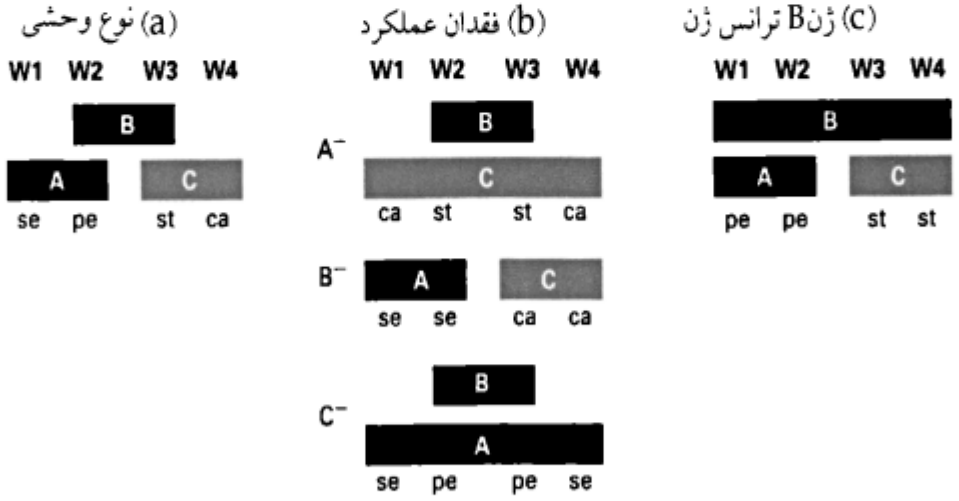
تعیین توالی ژن‌های هویت اندام گل آشکار کرد که خیلی از پروتئین‌های رمزشده به خانواده فاکتورهای نسخه‌برداری MADS تعلق دارند که دیمرهای هترو و همو تشکیل می‌دهند. بنابراین هویت اندام گل شاید توسط یک مکانیسم ترکیبی مشخص شود که در آن فعالیت متفاوت اشکال هترو و همو دایمر پروتئین‌های متنوع A، B و C بیان ژن‌های تابع پایین دست لازم برای تشکیل انواع سلولی مختلف در هر اندام را تنظیم می‌کند. فاکتورهای نسخه‌برداری دیگر MADS در تعیین ویژگی تیپ سلولی مخمر و ماهیچه عمل می‌کنند (فصل ۲۱).

1- Arabidopsis thaliana

2- Organ-identity

◀ **شکل ۲۲ـ۳۶ (شکل رنگی). اندام‌های گلی و اثرات جهش‌ها در ژن‌های هویت اندام.** (a) گل‌های تیپ وحشی آرابیدوپسیس تالیانا دارای ۴ کاسبرگ در حلقه ۱، ۴ گلبرگ در حلقه ۲، ۲ پرچم در حلقه ۳ و ۲ پرچم در حلقهٔ ۴ هستند. اندام‌های گل در حلقه‌های هم‌مرکز در سمت راست ترسیم شده‌اند. (b) در آرابیدوپسیس دارای جهش‌هایی در هر سه دسته ژن‌های هویت اندام گل، اندام‌های ۴ تایی گل به برگ تغییر شکل می‌یابند (چپ). با آنالیز فنوتیپی جهش‌یافته‌ها سه دسته ژن که تعیین اندام گل را در آرابیدوپسیس کنترل می‌کند شناسایی شد (راست). جهش‌های دسته A هویت اندام را در حلقه‌های ۱ و ۲ تحت تأثیر قرار می‌دهند، کاسبرگ‌ها، (سبز) برچه (بنفش) می‌شوند و گلبرگ‌ها، (نارنجی) پرچم (قرمز) می‌شوند. جهش‌های دسته B باعث تغییر شکل حلقه‌های ۲ و ۳ می‌شوند. گلبرگ‌ها، کاسبرگ می‌شوند و پرچم‌ها، برچه می‌شوند. در جهش‌های دسته C، حلقه ۳ و ۴ تغییر شکل می‌یابد: پرچم‌ها تبدیل به گلبرگ و برچه‌ها تبدیل به کاسبرگ می‌شوند.





▲ **شکل ۲۲ـ۳۷ (شکل رنگی). الگوهای بیان ژن‌های کلاس A، B و C، مدل ABC تعیین اندام گل را حمایت می‌کند.** الگوهای بیان مشاهده شده ژن‌های تعیین هویت اندام گل در آرابیدوپسیس جهش یافته، ترانس ژن و نوع وحشی در اینجا ترسیم شده است. میله‌های رنگی mRNAی A و B و AC را در هر حلقه (W1، W2، W3) نشان می‌دهد. اندام گل مشاهده شده در هر حلقه به صورت زیر مشخص شده است، کاسبرگ = Se، گلبرگ = Pe، پرچم = St، برچه = Ca. برای بحث بیشتر متن را ببینید.

نکات کلیدی بخش ۲۲.۴

کنترل بندبندی بدن: طرحها و تنوعات در حشرات و مهره‌داران

■ بندبندی شدن یک شکل رایج از تشکیل ساختار در خیلی از حیوانات است، همچنان که توسط مهره‌های ما و قطعات بدن حشرات نشان داده شد.

■ در دروزوفیلا، تکوین اولیه جنینی با حدود ۶۰۰۰ سلول در یک ورقه در سطح آن ایجاد می‌کند (شکل ۲۱ـ۲۲). چون جنین اولیه سینسیتیوم است، فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین‌های ترشحی هر دو به عنوان تنظیم کننده‌های گرادیانی، مورفوژن عمل می‌کنند.

■ یک سیستم از ژن‌ها و پروتئین‌ها، سازماندهی جلویی ـ عقبی جنین مگس را کنترل می‌کنند، و سیستم دیگری الگودهی پشتی ـ شکمی را کنترل می‌کند. بنابراین یک سلول در هر موقعیت به خصوص در جنین با دو نوع پیام‌های اطلاعاتی در هم می‌آمیزد. RNA و پروتئین نامتقارن مادری در اووسیت عدم تقارن آغازی در جنین را ایجاد می‌کند (شکل‌های ۲۳ـ۲۲ و ۲۴ـ۲۲ را ملاحظه کنید).

■ سه دسته از ژن‌ها به طور متوالی عمل می‌کنند تا جنین مگس را در امتداد محور جلویی ـ عقبی به قطعاتی تقسیم کنند. ژن‌های gap در اول بیان می‌شوند، سپس ژن‌های جفت-قاعده و سرانجام ژن‌های قطبیت بند بیان می‌شوند (شکل ۲۷ـ۲۲). ژن‌های gap و جفت-قاعده فاکتورهای نسخه‌برداری را رمز می‌کنند، ژن‌های قطبیت بند ترکیباتی از مسیر پیام‌رسانی Wnt و هجهوگ را رمز می‌کنند.

■ الگوهای نواری بیان ژن‌های جفت-قاعده مانند even-skipped توسط افزاینده‌هایی که نسخه‌برداری را زمانی که با اتصال به ترکیبات ویژه پروتئین‌های ژن gap فعال می‌کنند، کنترل می‌شود (شکل ۲۸ـ۲۲). هر طناب در جایی که ترکیب پروتئین gap رخ می‌دهد، در یک موقعیت معین در طول محور جلویی ـ عقبی تشکیل می‌شود. مشابهاً پروتئین‌های جفت-قاعده با ژن‌های تنظیم کننده قطبیت بدن ترکیب می‌شوند.

■ بندبندی مهره‌داران با تشکیل بلوک‌های تکراری مزودرم که سومیت نامیده می‌شوند، آغاز می‌شود، اول در نزدیک سر و سپس متوالیاً در نواحی عقبی‌تر (شکل ۲۹ـ۲۲).

■ در مهره‌داران، تشکیل سومیت با بیان چرخه‌ای ژن‌هایی مانند hes7 در امتداد محور جلویی ـ عقبی کنترل می‌شود. این الگوی بیان ژن به پیام‌های پیوسته و یکنواخت FGF از دنباله در حال تکوین و خودتنظیمی منفی ژن‌های درگیر در تشکیل سومیت بستگی دارد (شکل ۳۰ـ۲۲).

■ در مگس‌ها، انسان‌ها و خیلی از حیوانات دیگر، الگوهای متفاوت بندبندی در امتداد محور جلویی ـ عقبی توسط ژن‌های Hox کنترل می‌شود (شکل ۳۲ـ۲۲). برای مثال، اختلاف در شکل مهره‌ها توسط محصولات ژن Hox تنظیم می‌شود.

■ ژن‌های Hox فاکتورهای نسخه‌برداری را رمز می‌کنند که این فاکتورها ژن‌هایی که مورفولوژی بافت و سلول را کنترل می‌کنند تنظیم می‌کنند. ژن‌های Hox در خیلی از انواع بافت‌ها عمل می‌کنند، الگوهای بیان آنها با عمل مثبت و منفی پروتئین‌های کروماتین حفظ می‌شود. جهش در ژن‌های Hox باعث می‌شود قطعات بدن در جایگاه نامناسب تشکیل شوند.

■ شکل و الگوی گلبرگ‌ها، پرچم‌ها، برچه‌ها و کاسبرگ‌ها توسط عمل ترکیبی فاکتورهای نسخه‌برداری MADS که توسط سه دسته **ژن‌های هویت اندام گل** رمز می‌شوند، کنترل می‌شود. در گیاهان با جهش‌هایی در هر سه دسته ژنی، به جای گل‌ها، برگ‌ها تکوین می‌یابند (شکل ۳۶b ـ۲۲). که یادآور تغییرشکل جهش Hox در جانوران است.

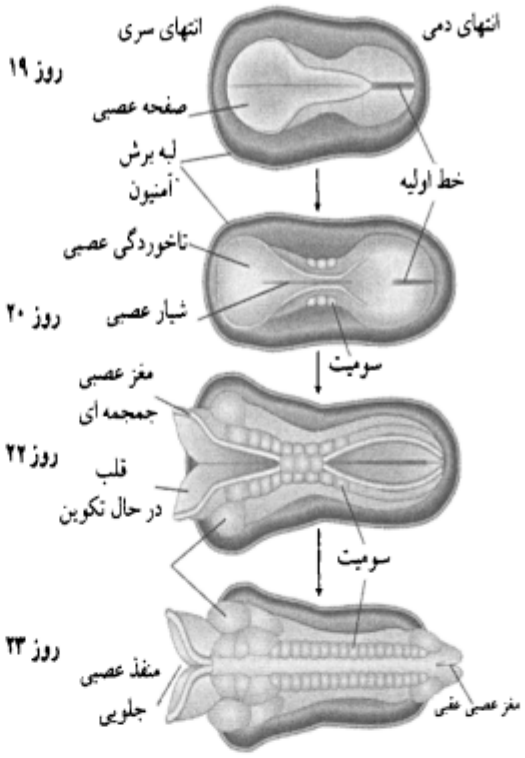
۲۲-۵ تعیین نوع سلول در تکوین اولیه عصبی

در انتهای گاسترولاسیون، جنین حیوان سه لایه زایا دارد و سه محور آن ـ سر به دم، جلو به پشت و چپ به راست ـ به آسانی قابل ردیابی هستند. اکتودرم و آندودرم صفحه‌های اپی‌تلیال بزرگی هستند و یک توده سست سلول‌های مزودرم مزانشیمی را در بر گرفته‌اند. جنین به منظور ایجاد سیستم عصبی در امتداد محور مرکزی اکتودرم عقبی حال شروع به تاخوردگی می‌کند که این پدیده **نورولاسیون**[1] نامیده می‌شود (شکل ۳۸ـ۲۲).

نورولاسیون، تشکیل مغز و طناب نخاعی را آغاز می‌کند.

پیام‌هایی که هنوز خوب شناخته نشده‌اند، سلول‌ها را در امتداد خط میانی و همچنین بافت عصبی آینده اختصاصی می‌کنند. بهترین شواهد تا امروز از موش‌ها و دوزیستان نشان می‌دهند که BMP4 از القاء عصبی جلوگیری می‌کند، در حالی که آنتاگونیست‌های BMP4 مثل نوگین، کوردین و سربروس می‌توانند سرنوشت سلول عصبی را

1- Neurulation



▲ **شکل ۳۸ـ۲۲. نورولاسیون در جنین انسان.** در این طرح، غشای آمنیوتیک برداشته شده تا جنین آشکار شود، که در این مرحله جنین نورولا نامیده می‌شود. تاخوردگی اکتودرم در مرکز جنین شروع به عصبی شدن در در حدود روز ۲۱ تکوین جنینی می‌کند و به سوی هر دو انتها گسترش یافته و لوله عصبی را تشکیل می‌دهند. در این زمان (زمان مشابه)، سومیت‌ها به طور پیشرونده‌ای در مزودرم تشکیل می‌شوند. منفذ عصبی جمجمه‌ای در انتهای سری لوله عصبی در حدود روز ۲۴ تکوین رویانی انسان بسته می‌شود؛ لوله عصبی در انتهای دمی (منفذ عصبی کودال) در روز ۲۶ تکوین می‌شود. نقص در بسته شدن لوله عصبی منجر به انواع نارسایی‌های ارثی حین تولیدمثل نارسایی نخاعی می‌شود.

با مقابله کردن با BMP4 القاء کنند. همچنین پیام رسانی Wnt ممکن است سرنوشت عصبی را با عمل اولیه و جلوگیری از بیان BMP4 در سلول‌های معین القاء کند. هیچ گونه مجموعه دقیقی از رویدادهای تنظیمی سلول‌های عصبی آینده در صفحهٔ سلول‌های اکتودرمی همراه با سلول‌های حفظ شده در کناره‌ها که سرانجام اپیدرم می‌شوند، وجود ندارد. در چگونگی ایجاد ستون فقرات، یک بخشی از صفحهٔ اکتودرمی (صفحه عصبی) به سمت داخل برای ساخت گودی U شکل تا می‌خورد (شکل ۳۹a ـ۲۲). این شروع **لوله عصبی**[1] است. تاخوردگی صفحهٔ عصبی نتیجهٔ تغییرات فوق‌العاده سازماندهی شده در اسکلت سلولی سلول‌های شرکت کننده است. آرایش دوباره میکروفیلامنت‌ها در بعضی سلول‌های صفحهٔ عصبی، سلول‌ها را گوه‌ای شکل کرده و باعث تاخوردگی صفحهٔ اکتودرمی می‌شود (شکل ۳۹a ـ۲۲). این یک مثال واضح از این است که چگونه تغییرات در سلول‌های منفرد می‌توانند در تغییرات شکل سازماندهی شده از ساختارهای جنینی بزرگ شرکت کنند. هر سلول باید دارای اطلاعات کافی و کامل برای شرکت در تشکیل بافت باشد.

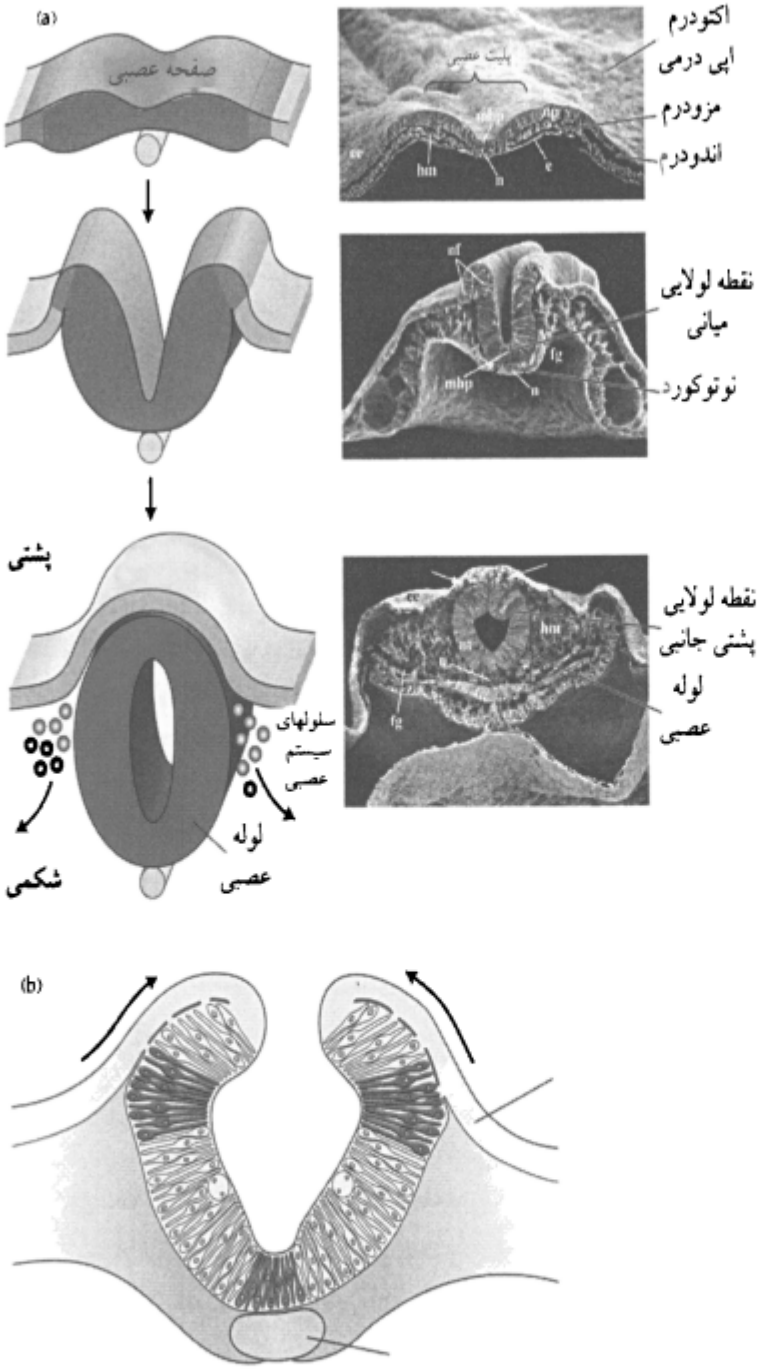
تشکیل لوله عصبی همچنین به میکرو **RNA**ها **(miRNAs)** بستگی دارد، این‌ها RNAهای کوچکی هستند که بیان ژن را با کنترل عملکرد mRNA یا مهار ترجمه تحت تأثیر قرار می‌دهند (شکل‌های ۲۶ـ۸ و ۲۷ـ۸ را ملاحظه کنید). شواهد دخالت میکرو RNAها در نورولاسیون از مطالعات zebrafish که در آن دایسر جهش یافته است، (آنزیمی که میکرو RNAها را پردازش می‌کند) به دست آمده است، بنابراین فعالیت مؤثر همهٔ میکرو RNAها حذف می‌شود. جنین‌های حاصله محور کامل دارند اما نورولاسیون را نمی‌گذرانند. برای توضیح این که mRNAs و نه بقیهٔ مولکول‌های تأثیر قرار گرفته توسط دایسر، مسئول این مسئله هستند، دانشمندان تلاش کردند تا جهش یافته‌های جنین ماهی را با تزریق آنها با یک دسته غالب از میکرو RNAهای دوتایی رهایی دهند. این امر تا حد زیادی پیش رفت، و بیشتر تکوین عصبی ناقص اصلاح شد. در آینده درک این که چگونه میکرو RNAها مورفوژنز لوله عصبی را کنترل کنند، جالب خواهد بود.

شیب پیام و فاکتورهای نسخه‌برداری، نوع سلول‌ها در لوله عصبی و سومیت‌ها را مشخص می‌کنند.

همانطور که قبلاً دیدیم، پیام‌های تکوینی می‌توانند در مدل رله عمل کنند یک نوع همکاری که هر سلول یک پیام را دریافت می‌کند و به دیگری انتقال می‌دهد، یا در یک مدل شیب‌دار عمل می‌کنند، که غلظت‌های متفاوت یک پیام سرنوشت‌های مختلف سلولی را القاء می‌کنند (شکل ۱۳ـ۲۲). پیام‌های شیب‌دار، یا مورفوژن‌ها، در مشخص کردن سرنوشت سلول در قسمت‌های مختلف لوله عصبی اهمیت دارند: نورون‌های حرکتی در بخش شکمی، تنوعی از نورون‌های بینابینی در بخش‌های جانبی و نورون‌های حسی در بخش پشتی. انواع مختلف سلولی می‌توانند قبل از تمایز مورفولوژیک، با پروتئین‌هایی که تولید می‌کنند، تشخیص داده شوند.

غلظت‌های شیب‌دار سونیک هجهوگ (Shh)، معادل در درزوفیلا، سرنوشت نهایی چهار نوع سلول لوله عصبی شکمی جوجه را تعیین می‌کند. این سلول‌ها در موقعیت‌های متفاوت در امتداد محور

1- Neural tube

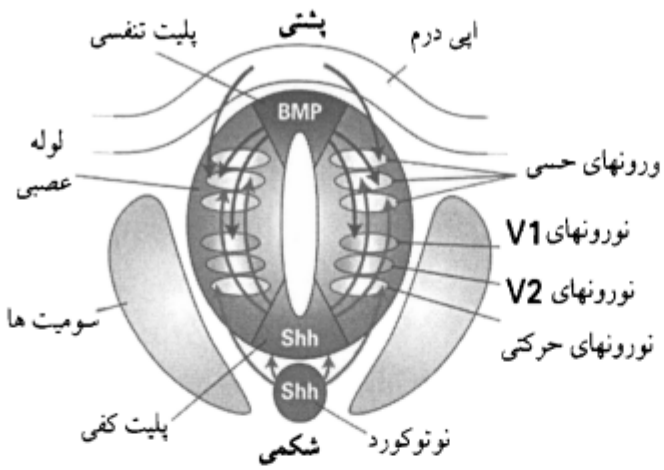


◀ **شکل ۳۹ـ۲۲. نورولاسیون در جوجه.** (a) طرح سمت چپ اکتودرم را نشان می‌دهد که به سلول‌های عصبی آینده (آبی و قرمز) و سلول‌های اپیدرمی (خرمایی) تقسیم می‌شود. پریموردیوم عصبی (پلیت عصبی) شروع به تا خوردن می‌کند و سرانجام تارهای عصبی با هم ادغام شده و لوله عصبی را می‌سازد. قسمتی از مزودرم زیری متحمل گذر اپتلیال ـ مزانشیمی می‌شود تا نوتوکورد میله‌ای شکل را تشکیل بدهد. (که از آن اصطلاح کوردات مشتق می‌شود). یک جمعیت از سلول‌های نزدیک جایگاه ادغام (قرمز) انتقال مزانشیمی ـ اپیتلیالی را گذرانده و به دور از لولهٔ عصبی مهاجرت می‌کند. این سلول‌های ستیغ عصبی در دریچه‌های قلب، اغلب استخوان‌های صورت، سیستم عصبی مرکزی و ملانوسیت‌ها که رنگدانه را در پوست تشکیل می‌دهند، مشارکت می‌کنند. طی نورولاسیون، اپیدرم پیوستگی خود را به بافت عصبی از دست داده و در بالای آن ادغام می‌شود. میکروگراف‌های الکترونی نمایه‌ای جنین‌های جوجه را در همان مراحل نورولاسیون نشان می‌دهد. (b) در مدل تعاونی نورولاسیون (نقطهٔ لولایی)، آرایش دوباره میکروفیلاقت‌ها باعث گوه‌ای شدن سلول‌های نورواپیتلیالی در داخل دو نقطهٔ لولایی پشتی - جانبی (آبی) و یک نقطهٔ لولایی وسطی (قرمز) می‌شود. پیکان‌ها گسترش میانی جانبی اکتودرم اپیدرمی را نشانی می‌دهند.

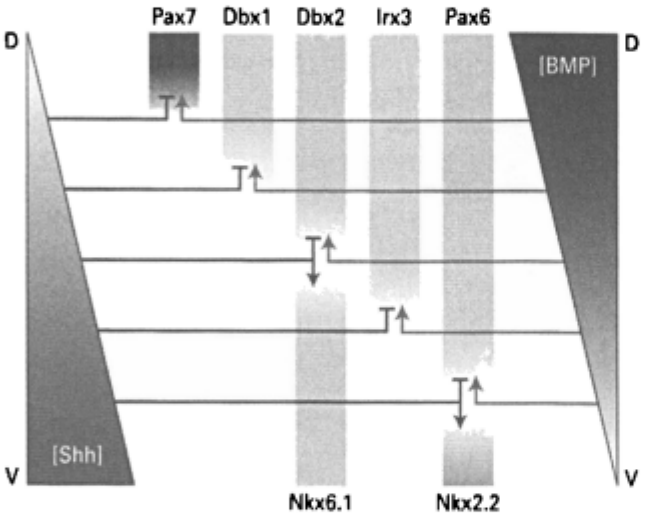
پشتی شکمی به ترتیب زیر از شکم به پشت یافت می‌شوند: سلول‌های پلیت کف، نورون‌های حرکتی، اینترنورون‌های V2، و اینترنورون‌های V1. طی تکوین، shh در سطوح بالا در نوتوکورد تولید می‌شود که مستقیماً با شکمی‌ترین ناحیهٔ لولهٔ عصبی تماس دارد (شکل ۴۰ـ۲۲a). shh نوتوکورد، اغلب سلول‌های شکمی لوله عصبی را به سلول‌های پلیت کف، نوعی سلول‌های غیر نوروگلیایی القاء می‌کند (فصل ۲۳). سلول‌های پلیت کف همچنین shh تولید می‌کنند و یک مرکز پیام‌رسانی shh در شکمی‌ترین ناحیهٔ لوله عصبی ایجاد می‌کنند. آنتی بادی ضد shh، تشکیل سلول‌های مختلف لوله عصبی شکمی را در جوجه بلوکه می‌کند و این نوع از سلول‌ها در موش‌های جهش‌یافته هموزیگوت برای ژن shh نمی‌توانند تشکیل شوند.

برای تعیین این که آیا القاء ناشی از shh سلول‌های لوله عصبی شکمی از طریق مکانیسم رله‌ای یا شیب‌دار است، دانشمندان

القاء تدریجی انواع سلول مختلف در لوله عصبی توسط (a) پیامهای shh و BMP



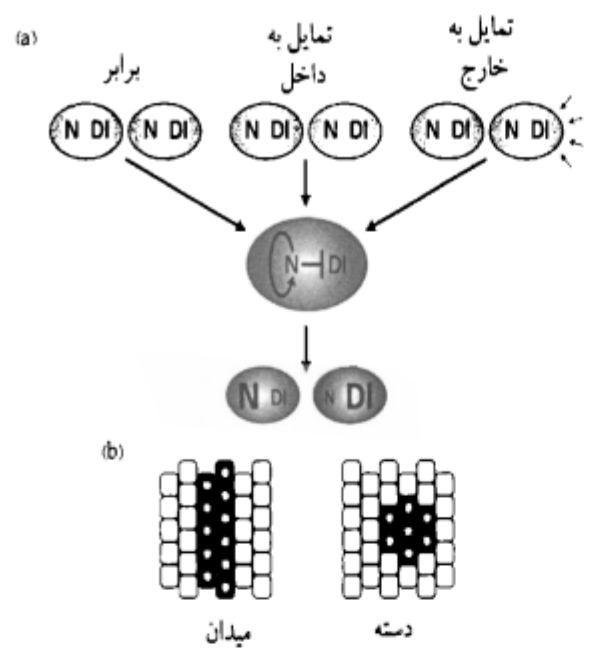
پاسخ سلولهای لوله عصبی به پیامهای shh و BMP (b) در طول محور پشتی شکمی



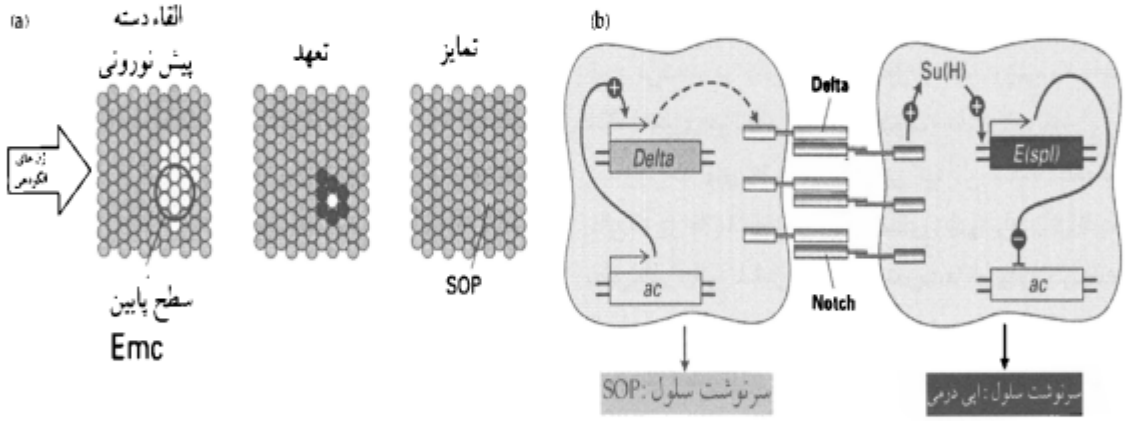
◀ **شکل ۲۲.۴۰ (شکل رنگی). تنظیم سرنوشت سلول عصبی در مهره‌داران.** (a) shh ترشح شده توسط سلول‌های نوتوکورد تکوین پلیت کف را القاء می‌کند. در عوض پلیت کف shh را تولید می‌کند که یک شیب شکمی ـ پشتی تشکیل می‌دهد که سرنوشت سلول‌های اضافی را القاء می‌کند. در ناحیه پشتی، پروتئین‌های BMP (پیام‌های نوع TGFb) از سلول‌های اکتودرمی قرار گرفته در کف و سرانجام از سلول‌های کف پلیت ترشح می‌شوند. (b) غلظت‌های نسبی shh و BMP با شیب رنگی شناخته می‌شوند. سرنوشت سلول در لولهٔ عصبی می‌تواند با تولید افتراقی همهٔ فاکتورهای نسخه‌برداری نشان داده شده بین شیب‌ها ردیابی شوند. سطوح بالا تا متوسط shh بیان ژن‌های Nkx2.2 و Nkx6.1 (Å) را القا می‌کند اما تولید پنج فاکتور نسخه‌برداری نشان داده شده در بالا را بلوکه می‌کند (T). حتی سطوح پایین shh می‌تواند بیان Dbx1 و Pax7 را بلوکه کند. اینها دو ژنی هستند که بیانشان با پیام BMP که از سلول‌های پشتی لوله عصبی می‌آید شروع می‌شود. مرز بین Pax6 و Nkx2.2 و بین Dbx2 و Nkx6.1 با برهم کنش‌های سرکوبگر متقابل تیزتر می‌شود؛ هر پروتئین، رمزدهی پروتئین دیگر را خاموش می‌کند. نتیجهٔ همهٔ اینها مجموعه‌ای از سرنوشت‌های مختلف سلولی (مثلاً نورون‌های حرکتی یا نورون‌های حسی) در امتداد محور پشتی ـ شکمی می‌باشد. هر نوع سلول شامل ترکیب واحدی از فاکتورهای نسخه‌برداری می‌باشد که بیان ژن‌های دیگری را کنترل می‌کنند که خواص واضحی را به آن نوع سلول می‌دهند.

غلظت‌های متفاوتی از shh را به برون‌کاشت‌های لوله عصبی جوجه اضافه کردند. در غیاب shh، سلول‌های عصبی شکمی تشکیل نمی‌شوند. در حضور غلظت‌های خیلی بالای shh، سلول‌های پلیت کف تشکیل می‌شوند، در حالی که در غلظت‌های نسبتاً پائین shh، نورون‌های حرکتی تشکیل می‌شوند. وقتی که سطح shh دوبرابر دیگر کاهش یافت، تنها نورون‌های V2 شکل گرفتند و سرانجام نوون‌های V1 وقتی که غلظت shh دوبرابر دیگر کاهش یافت، تکوین یافتند. این داده‌ها قویاً پیشنهاد می‌کنند که در لوله عصبی در حال تکوین، انواع سلول‌های متفاوت لوله عصبی در پاسخ به شیب شکمی به پشتی shh تشکیل می‌شوند، گرچه دقیقاً زمان تکوین پیام که تأثیرش را می‌گذارد ناشناخته است. داده‌های حاصل از مطالعات پیام شیب‌دار نمی‌تواند پیام‌های اضافی دیگر رله‌ای که هنوز کشف نشده‌اند، را رد کند.

سرنوشت سلول‌ها در ناحیهٔ پشتی لولهٔ عصبی توسط پروتئین‌های BMP (مانند BMP4 و BMP7)، که به خانواده TGFβ تعلق دارند تعیین می‌شود. به خاطر آورید که پیام‌های نوع TGFβ و آنتاگونیست‌های آنها در تعیین سرنوشت سلول‌های پشتی در جنین‌های اولیه قورباغه اساسی هستند. یک پیام TGFβ دروزوفیلا که Dpp نامیده می‌شود، همچنین در تعیین سرنوشت سلول‌های پشتی در جنین اولیه مگس عمل می‌کنند. به راستی پیام‌های TGFβ به نظر می‌رسند که یک تنظیم کنندهٔ قدیمی الگوهای پشتی شکمی هستند. در جنین‌های مهره‌داران، پروتئین‌های BMP ترشحی سلول‌های اکتودرم موجود در جهت پشتی لوله عصبی، تشکیل سلول‌های پشتی نورون‌های حسی را



◀ **شکل ۲۲.۴۱ (شکل رنگی). بسط یک تمایل اولیه ایجاد انواع مختلف سلول را با مهار جانبی میانجیگری شده توسط نوتچ می‌کند.** (a) اختلاف بین دو سلول برابر اولیه ممکن است به صورت تصادفی به وجود آید (چپ). منحصراً برهم کنش سلول‌ها ممکن است دارای تمایل ذاتی یا داخلی (مرکز) یا یک تمایل بیرونی (راست) باشد. برای نمونه سلول‌هایی که پروتئین‌های مختلفی را در تقسیم سلولی نامتقارن دریافت کرده‌اند تمایل به درون خواهند داشت، آنهایی که پیام‌های مختلف (نارنجی) دریافت کرده‌اند تمایل به بیرون خواهند داشت. بدون توجه به این که تمایلات اولیه کوچک چطور آغاز می‌شوند، نوتچ در یکی از دو سلول غالب شده بیان خودش را شروع نموده و تولید لیگاندش یعنی دلتا را سرکوب می‌کند. در سلول دیگر تولید دلتا غالب است. نتیجه تقویت اختلاف آغازی کوچک است. (b) مهار جانبی میانجیگری شده با نوتچ ممکن است ایجاد یک مرز صریح در میدان اولیه سلول‌ها مثلاً در امتداد لبهٔ بال‌های در حال تکوین دروزوفیلا بکند یا یک سلول مرکزی را از دستهٔ سلولی احاطه کننده مانند برقراری پیش‌سازهای عصبی مجزا کند.



▲ **شکل ۲۲.۴۲. نقش مهار جانبی میانجیگری شده با نوتچ در تشکیل پیش‌سازهای اندام حسی (SOPs) در دروزوفیلا.** (a) ملکول‌های پیام‌رسان خارج سلولی و فاکتورهای نسخه‌برداری رمزشده با ژن‌های الگوبندی اولیه، الگوی دقیق فضایی و زمانی پروتئین‌های bHLH مانند آکاته و اسکوته (زرد) را کنترل می‌کند. اغلب سلول‌ها در داخل میدان Emc (نارنجی)، یک پروتئین وابسته که آنتاگونیست آکاته و اسکوته می‌باشد را بیان می‌کند. گروه کوچکی از سلول‌ها، یک دسته پیش نورونی، تولید پروتئین‌های bHLH پیش‌نورونی را می‌کنند. ناحیه‌ای از یک دستهٔ پیش‌نورونی که یک SOP را تشکیل خواهد داد، سطوح پایین‌تری از Emc را بیان می‌کند این سلول‌ها تمایل به تشکیل SOP را دارند. برهمکنش بین سلول‌ها با میانجیگری پیام‌رسانی نوتچ منجر به گردآوری پروتئین‌های سرکوب کنندهٔ E (spl) تنظیمی توسط نوتچ در سلول‌های همسایه (آبی) می‌شود که تشکیل SOP را به یک سلول منفرد محدود می‌کند (سبز). (b) به صورت اولیه، آکاته (ac) و ژن‌های پیش‌نورونی دیگر در همهٔ سلول‌ها در داخل یک دستهٔ پیش‌نورونی نسخه‌برداری می‌شوند، همچنین نوتچ و دلتا نیز وجود دارند. ac و بقیهٔ پروتئین‌های bHLH پیش نورونی بیان دلتا را افزایش می‌دهند. زمانی که یک سلول به صورت تصادفی تولید بیشتر ac (چپ) را می‌کند تولید دلتا افزایش می‌یابد و منجر به پیام‌رسانی قوی‌تر نوتچ در همهٔ سلول‌های همسایه (راست) می‌گردد. در سلول‌های دریافت‌کننده مسیر پیام‌رسانی نوتچ یک فاکتور نسخه‌برداری معروف Su(H) که به نوبه خود بیان ژن‌های E(spl) را تحریک می‌کند، فعال می‌کند. بیان E(spl) در سلول‌های با مقدار دلتا، پایین می‌ماند (چپ). که باعث سرنوشت نورونی به عبارتی Sop می‌شود. در سلول راست پروتئین‌های E(spl) به صورت ویژه نسخه‌برداری ac و بقیهٔ ژن‌های پیش‌نورونی را سرکوب می‌کند. نتیجهٔ کاهش ac منجر به کاهش در دلتا می‌شود، بنابراین اختلاف تصادفی اولیه در بین سلول‌ها افزایش می‌یابد. همچنین در نتیجهٔ این برهمکنش و بقیه، یک سلول از یک دستهٔ پیش‌نورونی به عنوان Sop انتخاب می‌شود، و بقیه پتانسیل نورونی را از دست داده و به عنوان سلول‌های اپیدرمی تکوین پیدا می‌کند.

شروع می‌کند (شکل ۴۰a-۲۲). بنابراین، سلول‌ها در لوله عصبی پیام‌های چندگانه‌ای دریافت می‌کنند که در موقعیت‌های مخالف محور پشتی شکمی سرچشمه می‌گیرند. با برهمکنش سلول‌ها از هر دو منشأ، هر سلول، مبادرت به یک مسیر تمایزی ویژه می‌کند.

شیب‌هایی از shh و TGFβ منتشر شده از طرف‌های پشتی و شکمی لوله عصبی، تولید فاکتورهای نسخه‌برداری ویژه در سلول‌های لوله عصبی در موقعیت‌های متفاوت در امتداد محور پشتی ـ شکمی را فعال یا سرکوب می‌کنند (شکل ۴۰b-۲۲). وقتی که این فاکتورهای نسخه‌برداری در ابتدا ساخته شدند، مرز بین آنها نامعلوم هستند اما بعضی از مرزها به واسطه تنظیم عرضی سرکوب‌گر دقیق هستند.

مکانیسم‌های مشابهی سرنوشت سلول‌ها را در سومیت‌ها تعیین می‌کنند که باعث ایجاد ماهیچه‌های جدار بدن (**میوتوم**)، لایه داخلی پوست که درمیس نامیده می‌شود (**درماتودرم**) و مهره (**اسکلروتوم**) می‌شوند. سرنوشت‌های متفاوت سلولی توسط پیام‌هایی از بافت‌های احاطه کننده القاء می‌شود. برای مثال، shh که از نوتوکورد می‌آیند، اسکلروتوم را القاء می‌کنند. بنابراین پیام مشابه shh، نورون‌های حرکتی را در لوله عصبی و استخوان پریموردیا را در سومیت‌ها القاء می‌کند. سلول‌های دریافت کننده از قبل برنامه‌ریزی شده‌اند تا در مسیرهای متفاوتی به القاء کننده مشابه بسته به تاریخ قبلی، پاسخ دهند. سومیت‌ها همچنین پیام‌هایی را از مسیرهای دیگر مانند Wnt از لوله عصبی پشتی که زیرمجموعه متفاوتی از سلول‌ها را القاء می‌کنند، دریافت می‌دارند.

اغلب نورون‌های موجود در مغز از لوله عصبی میانی ناشی می‌شوند و به خارج مهاجرت می‌کنند.

کورتکس مغز یک صفحهٔ نازک از سلول‌های سازماندهی شده در داخل چندین لایه است. این بخش از آناتومی‌ها ـ که برای توانایی‌های فکری پیشرفته نیاز است ـ منبع بزرگ‌ترین غرور ما و احساسات عجیب و غریب، بهتر یا بدتر، بالاتر از موجودات زنده دیگر است. تکوین لوله عصبی که به صورت اولیه یک تک لایه سلولی ضخیم است، در داخل مغز به تولید هم تعداد زیادی سلول‌های پیش‌ساز جدید از سلول‌های بنیادی و هم سازماندهی آنها در داخل لایه‌های سلولی جدید نیاز دارد.

سلول‌های جدید اساساً در ناحیه ساب ونتریکولار، داخلی‌ترین لایه لوله عصبی قرار گرفته و در نزدیکی بطن ، که حفره‌های پر از مایع در داخل مغز هستند و از داخل لوله عصبی به وجود می‌آیند، تشکیل می‌شوند. سلول‌هایی که موقعیت‌های نهایی خود را به طور ساده از داخل به خارج کسب می‌کنند، اول داخلی‌ترین لایه شکل می‌گیرد و سپس به صورت فزاینده‌ای لایه‌های خارجی شکل می‌گیرند (شکل ۱۲-۲۱). بنابراین نورون‌هایی که بعداً متولد می‌شوند باید بعد از سلول‌هایی که قبلاً موقعیت‌های خود را اشغال کرده‌اند مهاجرت کنند. مهاجرت اغلب سلول‌ها شامل برهمکنش با گلیال‌های شعاعی است، سلول‌های حامی که طویل شده و فاصلهٔ فضای ساب ونتریکولار تا لایه خارجی کورتکس را دور می‌زنند. علاوه بر این بعضی سلول‌ها مهاجرت مماسی آشکاری در زاویه‌های درست از صفحه بطن به سطح را انجام می‌دهند.

دانشمندان از میکروسکوپ تایم لاپس برای مشاهدهٔ رفتارهای نورون‌ها استفاده کرده‌اند. حرکات آنها یکنواخت و پیوسته نیست. در عوض، زمانی با قدرت حرکت می‌کنند، متوقف می‌شوند و زایده‌ها را گسترش می‌دهند و سپس حرکت خود را در مسیر اصلی یا مسیر دیگری از سر می‌گیرند. در بعضی مواقع به نظر می‌رسد نورون‌ها بر روی یکدیگر حرکت می‌کنند. در مورد دیگر، آنها فرآیندهای سلول‌های گلیا را دنبال می‌کنند. سلول‌های مهاجر به تنوع وسیعی از علائم راهنمایی در شکل مولکول‌های سطحی و پیام‌های ترشحی پاسخ می‌دهند، در حالی که هر سلول از نظر درونی تغییرات شگفت‌انگیزی در شکل متحمل می‌شوند.

وقتی که نورون‌ها به مقاصد نهایی خود می‌رسند، و اغلب در حالی که در حال انتقال هستند، زایده‌های زیادی برای ارتباط با سلول‌های دیگر، تشکیل می‌دهند: **دندریت‌ها** که پیام را دریافت می‌دارند و **آکسون‌ها** که پیام را انتقال می‌دهند، در بعضی مواقع بیشتر از یک متر فاصله دارند. ما در فصل ۲۳ توضیح خواهیم داد که چگونه الگوی عصب‌رسانی تصحیح می‌شود (تا حدی که درک شده است).

مهار جانبی میانجیگری شده با پیام‌رسانی نوتچ باعث می‌شود سلول‌های عصبی اولیه متمایز شوند.

تکوین سیستم عصبی یک نمونه مکانیسم عمومی مهم برای تضمین ساخته شدن ساختارهای ضروری می‌باشد. این مکانیسم **مهار جانبی** نامیده می‌شود که عبارتست از ماهیت ارتباط یک سلول با سلول احاطه کننده «من انجام دهنده این کارم، شما کار دیگری باید انجام دهید». سلول‌های مجاور با پتانسیل برابر یا غیربرابر در این مسیر به سوی سرنوشت مجزا هدایت می‌شوند. آنالیز ژنتیک تکوین عصبی دروزوفیلا در ابتدا نقش مسیر فوق‌العاده حفظ شده نوتچ/دلتا در مهار جانبی را آشکار کرد. در این مسیر پیام‌رسانی پروتئین‌های نوتچ و دلتا در دروزوفیلا به ترتیب فنوتیپ گیرنده و لیگاند هستند، هر

دو از پروتئین‌های بزرگ عرض غشایی هستند که دُمین‌های خارج سلولی آنها شامل تکرارهای چندتایی شبه EGF و جایگاه‌های اتصال برای دیگر پروتئین‌ها هستند. گرچه دلتا شکافته می‌شود تا یک نسخه قابل حل از دُمین خارج سلولی‌اش را بسازد، یافته‌های مطالعات ژنتیک موزائیک دروزوفیلا نشان داده‌اند که پیام دلتا تنها به سلول‌های مجاور می‌رسد.

برهمکنش بین دلتا و نوتچ شکافت پروتئولیتیک نوتچ را شروع می‌کند و قطعهٔ سیتوزولیک آن را آزاد می‌کند که به هسته تغییر مکان داده و نسخه‌برداری ژن‌های ویژه‌ای را تنظیم می‌کند (شکل ۳۶ـ۱۶). به طور ویژه، پیام رسانی نوتچ نسخه‌برداری خود Notch را فعال می‌کند و نسخه‌برداری دلتا را سرکوب می‌کند و بدان وسیله اختلاف بین سلول‌های برهمکنش کننده را تشدید می‌کند (شکل ۴۱a ـ۲۲). پیام میانجیگری شده با نوتچ می‌تواند باعث شود یک مرز صریح بین دو جمعیت سلولی به وجود آید یا یک سلول را می‌تواند از یک دستهٔ سلولی جدا کند (شکل ۴۱b ـ۲۲). پیام‌رسانی نوتچ سرنوشت سلول‌ها را در اغلب بافت‌ها کنترل می‌کند و نتیجتاً باعث تمایز، تکثیر، ایجاد نامتقارنی در سلول و آپوپتوز می‌شود. اینجا ما دو نمونه از پیام‌رسانی نوتچ در تعیین سرنوشت سلول را توصیف می‌کنیم.

جهش‌های از دست رفتن عملکرد ژن‌های نوتچ و یا دلتا طیف وسیعی از فنوتیپ‌ها را در دروزوفیلا تولید می‌کند. یک نتیجه اینچنین جهش‌هایی در هر ژن، افزایش تعداد نوروبلاست‌ها در سیستم عصبی مرکزی است. در جنین‌زایی دروزوفیلا، صفحهٔ سلول‌های اکتودرمی به دو جمعیت سلولی تقسیم می‌شود. آنهایی که به داخل جنین حرکت می‌کنند به نوروبلاست‌ها تکوین می‌یابند که نورون ایجاد می‌کنند، آنهایی که در خارج باقی می‌مانند اپی‌درم و کوتیکول را تشکیل می‌دهند (شکل ۲۹ـ۲۱). همچنین بعضی از سلول‌ها بزرگ شده و سپس از صفحهٔ اکتودرمی جدا شده تا نوروبلاست شوند، آنها به سلول‌های اطراف پیام می‌رسانند تا از تشکیل آنها به نوروبلاست جلوگیری کنند ـ یک مورد از مهار جانبی. پیام‌رسانی نوتچ/دلتا برای این مهار استفاده می‌شود، در جنین‌های فاقد گیرنده نوتچ یا لیگاند آن، همهٔ سلول‌های پیش‌ساز اکتودرمی، عصبی می‌شوند.

نقش پیام‌رسانی نوتچ در مشخص نمودن سرنوشت سلول عصبی وسیعاً در تکوین سیستم عصبی محیطی دروزوفیلا مطالعه شده است. در مگس‌ها، اندام‌های حسی زیادی از دسته‌های سلولی پیش نورونی ایجاد می‌شوند که فاکتورهای نسخه‌برداری bHLH مثل آکائه و اسکوته تولید می‌کنند که سرنوشت سلول عصبی را القاء می‌کند. در تکوین طبیعی، یک سلول در داخل یک دسته پیش نورونی تا حدی احاطه شود تا یک پیش‌ساز اندام حسی (SOP)[1] شود. در سلول‌های دیگر دسته، پیام‌رسانی نوتچ منجر به سرکوب ژن‌های پیش نورونی شده و بنابراین سرنوشت نورونی مهار می‌شود. این سلول‌های انتخاب نشده باعث ایجاد اپی‌درم می‌شوند (شکل ۴۲ـ۲۲). جهش‌های حساس به حرارت که باعث فقدان عملکردی نوتچ یا دلتا می‌شوند، منجر به تکوین SOPهای اضافی از یک دسته پیش‌نورونی می‌شوند. در مقابل در تکوین مگس‌هایی که فرم فعال نوتچ (به عبارتی در غیاب لیگاند فعال است) را تولید می‌کنند، همهٔ سلول‌ها در دسته پیش‌نورونی به سلول‌های اپیدرمی تکوین پیدا می‌کنند.

برای برآورد نقش مسیر نوتچ طی نوروژنز اولیه مهره‌داران، دانشمندان mRNAی رمزکننده اشکال مختلف نوتچ و دلتا را به داخل جنین‌های گزنوپوس تزریق کردند. تزریق mRNAی رمزکننده قطعهٔ سیتوزولیک فعال نوتچ تشکیل نورون‌ها را مهار کرد. در مقابل، تزریق mRNAی رمزکننده یک شکل تغییریافته از دلتا که از فعال‌سازی نوتچ جلوگیری می‌کند، منجر به تشکیل نورون‌های خیلی زیاد می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که در مهره‌داران، مانند دروزوفیلا، مهار جانبی میانجیگری شده با پیام رسانی نوتچ سرنوشت سلول پیش‌ساز عصبی را کنترل می‌کند. مشابهاً در کرم الگانس، پیام‌رسانی نوتچ طی تکوین حفرات در تشکیل انواع سلول مجاور مجزا توسط مهار جانبی استفاده می‌شود. مسیر پیام‌رسانی نوتچ طی تشکیل خیلی از اندام‌ها و بافت‌ها استفاده می‌شود، اما همیشه برای مهار جانبی استفاده نمی‌شود.

نکات کلیدی بخش ۲۲.۵

تخصصی شدن نوع سلول در تکوین اولیه عصبی

- سیستم عصبی مهره‌داران از سلول‌های اکتودرمی تکوین می‌یابد، که به صورت اولیه در یک صفحه طی گاسترولاسیون تشکیل می‌شوند. تا خوردن این صفحهٔ اکتودرمی (صفحهٔ عصبی) ابتدا باعث تشکیل لوله عصبی طی فرآیند نورولاسیون می‌شود (شکل ۳۸ـ۲۲ و ۳۹ـ۲۲ را ملاحظه نمائید).
- نوتوکورد، یک میله مزودرمی قرار گرفته در زیر (شکمی) لولهٔ عصبی، مبناء پروتئین‌های پیام‌رسانی است که سرنوشت سلول‌ها را در بافت‌های احاطه کننده القاء می‌کند. برای مثال، shh از نوتوکورد سرنوشت سلول‌های اطراف لوله عصبی،

1- Sensory organ precurson (SOP)

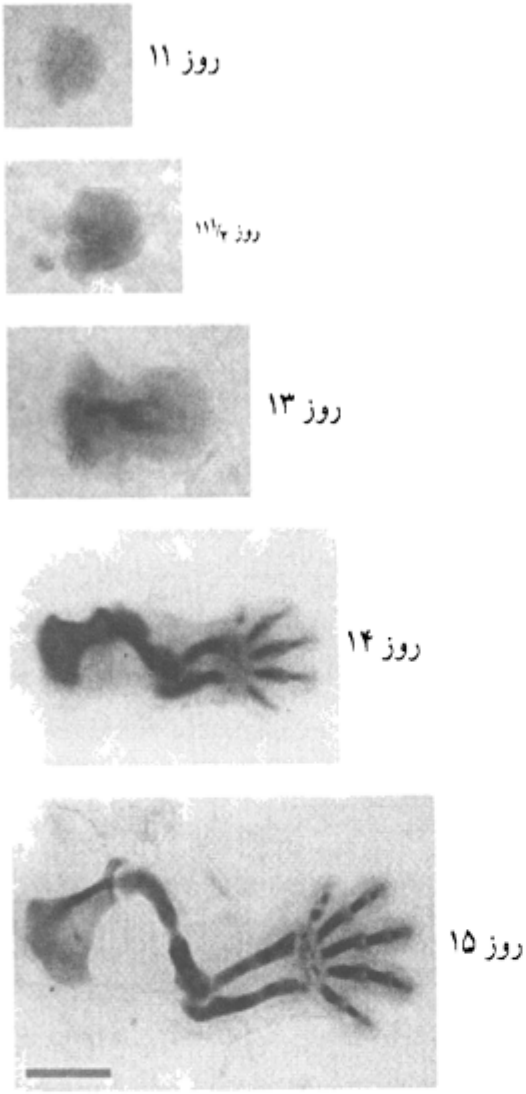
سومیت‌ها و آندودرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

■ shh یک مورفوژن است که سرنوشت سلول‌های معینی را دُزهای بالا و دیگر سلول‌ها را در دُزهای پایین‌تر هدایت می‌کند. آن تمایل به شروع سرنوشت شکمی دارد، مانند پلیت‌کف. اثر آن توسط پیام‌های دیگر مانند BMP، پیام نوع TGFβ که از اکتودرمی که سرنوشت پشتی عصبی را شروع می‌کند، تعدیل می‌شود.

■ سلول‌های لوله عصبی که ذاتاً یک سلول ضخیم هستند، تکثیر شده و سلول‌های پیش‌ساز عصبی را می‌سازند که به صورت شعاعی به طرف خارج مهاجرت می‌کنند تا لایه‌های مغز و نخاع را تشکیل دهند. طی نوروژنز نرمال دروزوفیلا، تنها بعضی سلول‌های اکتودرمی نورون را تشکیل می‌دهند، بقیه، سلول‌های مشتق از اکتودرم مانند پوست را می‌سازند. تعادل بین انواع سلول‌ها توسط مهار جانبی شامل پیام رسانی نوتچ تنظیم می‌شود. در این فرآیند، سلول‌هایی که سرنوشت عصبی به خود می‌گیرند بقیه را وادار می‌کنند که وارد این حالت نشوند (شکل ۴۱ـ۲۲، ۴۲ـ۲۲).

۶ - ۲۲ رشد و الگوبندی اعضا

تکوین عضو مهره‌داران یک نمونه زیبا از چگونگی ترکیب اعمال سلول‌های منفرد برای ایجاد الگو فراهم می‌کند. اعضا مهره داران از جوانه‌های کوچکی متشکل از یک توده سلول‌های مزودرمی احاطه شده با یک پوسته اکتودرمی رشد می‌کند (شکل ۴۳ - ۲۲). اعضاء عصبی و اعضاء جلویی به وضوح مرتبطند و هم چنین اعضاء چپ و راست با هم مرتبطند. اگر اعضا به ملکول‌های تشکیل دهنده یا سلول‌ها بشکنند ترکیب هر چهار تا مشابه خواهد بود، اما اشکال آنها در مسیرهایی که کاملاً برای زندگی موفق ضروری است فرق می‌کند. تشکیل الگو - عبارت از سازماندهی ملکول‌ها و سلول‌ها به عضو کامل است - هدف مرکزی مطالعه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی تکوین اعضا می‌باشد. کجا پرندگان، می‌توانند دارای یک جفت پا و یک جفت بال بجای چهار پا شوند. پرندگان در حقیقت جانور آزمایشگاهی اولیه برای مطالعه تکوین عضو بودند، چون جنین‌های جوجه می‌توانند در تخم طی دوره تشکیل اعضا به آسانی قابل دسترسی باشد. در آزمایش تئوری‌های مختلف تکوین اعضا در جوجه، محققان جنین‌ها را در معرض پیوند قرار دادند، به آنها پروتئین‌های پیام رسانی یا سلول‌های تولید کننده پیام تزریق کردند و رترو ویروس‌های بیان ژن مستقیم در جایگاه‌های غیر طبیعی را داخل نمودند. رشد پیوسته حیوان در تخم، مشاهده شد و اثر هر تیمار ویژه دیده شد. چون کاهش حذف عملکرد ژن در موش‌ها نسبتاً آسان است آزمایشات ژنتیکی در مطالعه تکوین عضو در این حیوانات مفید است. نتایج از دو سیستم آزمایشگاهی تا حد زیادی با هم سازگار است.

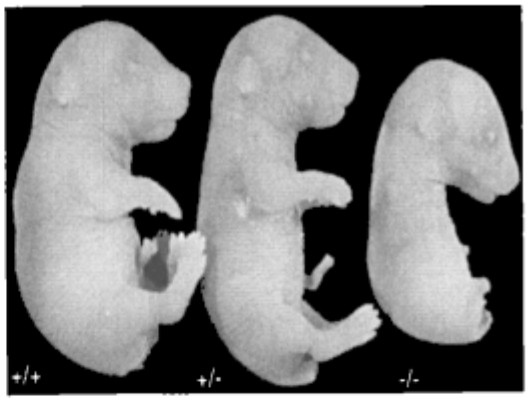


▲ **شکل ۴۳ - ۲۲. تکوین عضو در موش** جوانه‌های عضو که شامل یک توده داخلی از سلول‌های مزودرمی و لایه خارجی از اکتودرم است، در جایگاهی ویژه در پهلوی جنین تشکیل می‌شود. برآمدگی و الگوبندی در امتداد سه محور منجر به تشکیل کل ساختارهای عضو می‌شود.

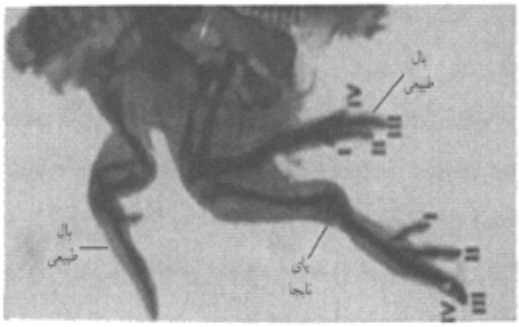
ژن‌های Hox جایگاه درست اعضا را تعیین می‌کنند تا رشد کنند

اولین رخداد در تکوین عضو مهره دار تعیین مکانی در امتداد محور سری - دمی می‌باشد که رشد عضو شروع خواهد شد. هم در حشرات و هم در مهره‌داران، ژن‌های Hox، مکانی که اعضا ساخته می‌شوند را کنترل می‌کنند. مزودرمی که باعث ایجاد جوانه

(a) اثر کاهش یا فقدان FGF10



(b) اثر FGF10 نابجا



▲ **شکل تجربی ۴۴ - ۲۲. اثر تغییر عملکرد FGF10 در تکوین عضو در موش** (a) ژن ضربه دیده موشها، فاقد جزء عملکردی ژن FGF10، توسط نو ترکیبی ساخته شد. این عکس‌ها، جنین‌های موش را چند روز قبل از تولد نشان می‌دهند که موش‌های هتروزیگوت برای ژن FGF10 (-/+) نسبتاً طبیعی هستند. اما موش‌های هوموزیگوت (-/-) در مقایسه با موش‌های نوع طبیعی (+/+) شدیداً دچار اشکال در تکوین عضو شدند. این داده‌های ژنتیکی اهمیت FGF10، یک پیام پروتئینی ترشحی، برای تکوین عضو را ثابت می‌کند.(b) برای امتحان اینکه آیا FGF10 قادر به راه اندازی تکوین عضو است یا نه، آزمایشات با جنین‌های جوجه انجام شده است. این جنین‌ها مزایایی دارند به دلیل اینکه جنین می‌تواند بعد از عمل جراحی به رشد ادامه دهد. دانه‌های خیسانده شده در پروتئین FGF10 با جراحی در پهلوی جنین جوجه در مرحله میانی قبل از تکوین عضو در ناحیه‌ای که هیچ عضوی به طور طبیعی تکوین نمی‌یابد، کاشته شدند. FGF10، اما نه ماده کنترل، قادر به القاء تشکیل عضو پنجم خواهد بود. جوجه جوان نشان داده شده در اینجا از یک جنین تیمار شده با FGF10 دارای پای اضافی (نابجا) خواهد بود. تنها نیمی از اسکلت جوجه نشان داده شده است.

عضو می‌شود **مزودرم حد واسط** نامیده می‌شود و در مجاور مزودرم سومیتی قرار دارد؛ مزودرم دورتر از سومیت‌ها مزودرم صفحه جانبی نامیده می‌شود. بیان ژن‌های Hox در مزودرم حد واسط موقعیت تشکیل جوانه عضو را با کنترل بیان ژن‌هایی (مانند Tbx و Pitx1) که بقیه فاکتورهای نسخه‌برداری را در مزودرم صفحه جانبی رمزگذاری می‌کنند تحت تأثیر قرار می‌دهد. در عوض پروتئین‌های Tbx و Pitx1 تولید پیام‌های ترشح شده‌ای که برای تکوین اعضا لازمند را کنترل می‌کنند.

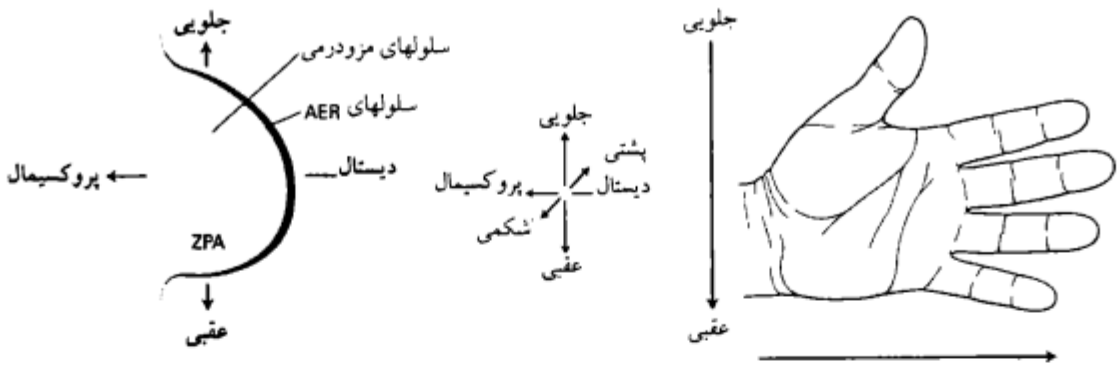
در بین این پیام‌ها، فاکتور رشد فیبروبلاسی 10 (FGF10) هستند که از سلول‌هایی در مزودرم صفحه کناری ترشح می‌شوند و برآمدگی اعضاء از نواحی ویژه پهلوی جنین‌ها را آغاز می‌کنند. موش‌های جهش یافته فاقد FGF10 بدون عضو تکوین می‌یابند (شکل a - ۴۴ - ۲۲). بالعکس کاشت یک ذره حاوی FGF10 در جایگاه پهلوی جنین جوجه‌هایی که یک عضو نمی‌تواند به صورت طبیعی ایجاد شود باعث می‌شود عضو اضافی رشد کند (شکل b ۴۴ - ۲۲). این نتایج ظرفیت‌های القایی قابل مشاهده FGF را نشان می‌دهند. پیام‌رسانی Wnt هم چنین در آغاز برآمدگی جوانه اعضا بازی نقش می‌کند.

تکوین عضو به یکپارچگی شیب‌های پیام خارج سلولی چند گانه بستگی دارد.

سه محور جوانه عضو و عضو تکوین یافته - جلویی - عقبی (انگشت شست نسبت به انگشت کوچک)، پشتی - شکمی (پشت دست در مقابل کف)، و نزدیک - دور (کتف به انگشتان) - در شکل ۴۵ - ۲۲ نشان داده شده است. تکوین اولیه عضو با تشکیل دو مرکز پیام‌رسانی مهم **لبه رأسی اکتودرم**[1] **(AER)**، یک ناحیه از سطح اکتودرم در نوک دیستال جوانه عضو در حال ظهور و **ناحیهٔ فعالیت قطبی**[2] **(ZPA)** در مزودرم انتهای عقبی جوانه مشخص می‌شود. AER در پاسخ به FGF10 ، شروع به ترشح FGF8 و بعداً FGF4 می‌کند. هر دوی این پیام‌ها تقسیم پایدار سلول‌های مزودرم را شروع می‌کنند و بنابراین برآمدگی عضو ادامه می‌یابد. سونیک هجهوگ در ZPA از جوانهٔ عضو عقبی تولید می‌شود (شکل ۴۶ - ۲۲)؛ در حقیقت ترشح Shh است که ناحیه ZPA را مشخص می‌کند. پیام‌های FGF سرنوشت دیستال به سلول‌های جوانه عضو می‌دهند و Shh سرنوشت عقبی به آنها می‌دهند. اگر Shh به بخش جلویی جوانه اضافه شود عضوی که سرانجام تشکیل خواهد شد دارای

1- Apical ectodermal ridge

2- Zone of polarizing activity



▲ **شکل ۴۵ - ۲۲. محورهای جوانه عضو و دست.** یک جوانه عضو (چپ) و عضو کاملاً تکوین یافته، یک دست در این نمونه (راست) دارای سه محور است: جلویی - عقبی (انگشت شست به انگشت کوچک)، پروکسیمال - دیسمال (کتف به انگشتان) و پشتی شکمی (پشت دست به کتف). در جوانه عضوی در حال تکوین لبه اکتودرم راسی (AER) منبعی از پیام FGF است و ناحیه فعالیت قطبی کننده (ZPA) منبع Shh است.

دو الگوی عقبی استخوان در شکل آینه‌ای خواهد بود و ناحیه جلویی ندارد. در امتداد محور پشتی - شکمی یک پیام Wnt7a سلول‌ها را برای ایجاد انواع سلولی شکمی هدایت می‌کند. پیام‌های Wnt7a، FGF4 و FGF8، نسخه برداری Shh را افزایش داده و پیام Shh نسخه برداری ژن‌های Fgf4 و Fgf8 را افزایش می‌دهد. بنابراین این پیام‌های تقویت کننده متقابل در سلول‌هایی که به اندازه کافی به هم نزدیکند وجود دارند؛ سلول‌هایی که خیلی دورتر از یک پیام تقویت کننده هستند ممکن است از ایجاد پیام خودشان دست بکشند. در این مسیر استحکام و حرکت پیام‌ها، اندازه و شکل نهایی اعضا را مشخص می‌کند.

کار اصلی تکوین در تشکیل اعضاء و اندام‌ها سازماندهی انواع سلول‌ها (مانند مزانشیم، عروقی، اپی تلیال) به ساختارهای پیچیده چند سلولی است. همچنین دیده‌ایم که سلول‌ها در میانه جوانه اعضاء در معرض شیب پیام‌های متعدد قرار می‌گیرند (Shh,FGF و Wnt) که راهنماهای آغازی ساخت این فرآیند هستند. با شدت گرفتن این پیام‌ها هر سلول بسته به موقعیت خود نسبت به سه محور عضو فاکتور رونویسی ویژه‌ای را بیان می‌کند. عمل این فاکتورهای رونویسی در عوض تشکیل اعضاء مختلف عضو را کنترل می‌کند.

از آنجایی که هر یک از پیام‌های جوانه عضو باید در سلول‌ها دقیقاً درست تولید شوند، بیشترین توجه در چگونگی این که چطور ژن‌های آنها کنترل می‌شوند وجود دارد. برای نمونه ژن Shh تنها در سلول‌های ZPA بعضی جوانه‌های عضو در پاسخ به FGF و دیگر فاکتورها رونویسی می‌شود. تلاش‌های اولیه برای توصیف افزاینده‌های رونویسی هستند که رونویسی Shh در جوانه عضوی ناقص را کنترل می‌کنند. راز آن وقتی کشف شد که چهار خانواده با فراوانی بالای چند انگشتی، یک حالت غیرطبیعی وراثتی که با حضور انگشت‌ها را اضافی در دست و پا مشخص می‌شود، پیدا شدند. گرچه پروتئین رمزکننده اجزاء Shh طبیعی بود، جهش موجود در هر خانواده در ناحیه‌ای از ژنوم در مجاور ژن Shh انسانی نقشه‌برداری شد. این یافته‌ها قویاً پیشنهاد می‌کنند که آسیب به افزاینده کنترل کننده رونویسی Shh باعث تکوین غیر طبیعی و در نتیجه چند انگشتی در این خانواده‌ها می‌شود.

افزاینده عضوی Shh از دو جهت کاملا برجسته است. اول، این توالی تنظیمی در واحد رونویسی ژن دیگر قرار دارد. دوم، در حدود ۱ میلیون باز دورتر از پروموتور Shh قرار دارد. این رکورد گینس[1] برای تنظیم با فاصله دور رونویسی ژن یک است. مقایسه توالی‌های اخیر درجه بالایی از تشابه توالی در سراسر افزاینده یک کیلو بازی در موش و انسان نشان داده است. ناحیه کوچکتری از منطقه تشابه، توالی هسته، در rice fish هم قرار دارد. (شکل ۴۷ - ۲۲) کل چهار خانواده پلی‌داکتیلوس یافت شده، دارای جهش‌هایی‌اند که توالی افزاینده را تغییر داده است. این یافته‌ها قدرت استفاده از حفظ تکاملی توالی DNA برای فهمیدن تنظیم ژن و محاسبه بیماری‌های انسان را نشان می‌دهند.

ژن‌های Hox الگوی مناسب ساختارهای عضو را نیز کنترل می‌کنند.

در آغاز که جوانه عضوی رشد می‌کند و تولید Shh به جریان افتاده است Shh بیان ژن Hox را القاء می‌کند که در ناحیه عقب جوانه شروع می‌شود. بعدا بیان ژن‌های Hox مجموعه‌ای پیچیده از

1- Guinness record

تغییرات را گذرانده و بیشتر در ناحیه جلویی‌تر جوانه گسترش می‌یابد. فاکتورهای نسخه‌برداری تولید شده از Hoxd 11 - Hoxd 13 در سلول‌های ناحیه عقبی، در عوض بیان Shh را در ناحیه عقبی تحریک می‌کنند. همچنین جوانه طی دوره ۱۰/۵-۹ روز بعد از لقاح رشد می‌کند، دُمین‌های بیان ژن Hoxd گسترده می‌شود (شکل ۴۸ - ۲۲). ژن‌های Hox در ناحیه دیستال جوانه عضوی جایی که انگشت‌ها شکل خواهند گرفت فعال باقی می‌مانند. ترکیب فاکتورهای رونویسی Hox در سلول‌های در حال تکوین جوانه عضو، در الگوی همپوشانی استادانه، مسئول مقیاس صحیح کنترل الگوی عضوی است. انسان‌های حامل جهش Hoxd13 دارای یک سندرم نقص وراثتی عضو که سین‌پلی‌داکتیلی[1] نامیده می‌شود، می‌باشند که با دو برابر شدن انگشت‌ها و پنجه‌ها مشخص می‌شود. این اثر طبیعت ضروری Hoxd13 برای تکوین طبیعی عضو را نشان می‌دهد. در موش‌ها حذف کل ژن‌های Hoxa و Hoxd باعث می‌شود که اعضا به عنوان ریشه کوتاه و بدون هیچ ساختار دیستال تکوین پیدا کند، که اساس اهمیت ژن‌های Hox در تکوین اعضای موش را نشان می‌دهد.

ژن‌های Shh و Hoxd یکدیگر را تنظیم می‌کنند و حلقه فیدبک مثبت در جوانه عقبی تشکیل می‌دهند که هر دو ژن را روشن نگه می‌دارد. در جوانه جلویی فاکتور نسخه‌برداری GLi3 ژن‌های Shh و Hox را سرکوب می‌کند (شکل ۴۸ - ۲۲). پیام‌رسانی Shh رونویسی ژن GLi3 را در سکوهای عقبی سرکوب می‌کند. تولید فاکتورهای رونویسی Hoxd در نواحی مجزای جوانه عضوی این سوال را ایجاد می‌کند که کدام ژن‌ها آنها را کنترل می‌کنند و چطور آنها ژن‌های موثر بر الگوی اعضاء را هدف قرار می‌دهند. چیز کمی در مورد هویت و عملکرد هدف ژن‌های Hoxd شناخته شده است. در بین ژن‌های هدف مستقیم پروتئین‌های نسخه برداری Hoxd ژن رمزکننده یکی از افرین‌ها، خانواده پروتئین‌های پیام‌رسانی متصل به غشاء (شکل ۴۲ - ۲۳) قرار دارد. بنابراین کار بیشتری لازم است تا فهمیده شود چطور تولید فاکتورهای رونویسی Hox در الگوی جزئی دقیق به اشکال فوق‌العاده قابل تولید و عالی (در داخل یک گونه) عضو ترجمه می‌شود.

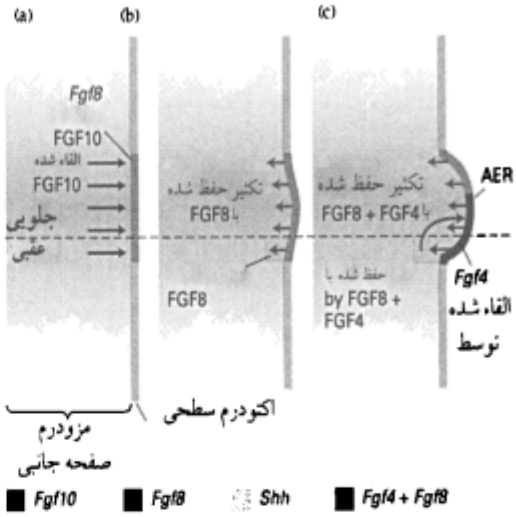
الگوی نهایی در اعضا با استفاده از چند دور تکراری از کنترل پیام‌رسانی و رونویسی با رخدادهای اولیه‌ای که آنرا ترسیم می‌کنند و رخدادهای بعدی که آنرا بیشتر ترسیم می‌کنند، بدست می‌آید. در زمان مشابهی که عضو به طرز قوی در حال رشد است، سلول‌های جدید در معرض ترکیبی از پیامهای از قبل موجود قرار می‌گیرند. سرانجام آپوپتوز (فصل ۲۱) در سلول‌های ویژه‌ای ایجاد می‌شود و بنابراین پرده بین انگشتان را حذف می‌کند.

بحث ما از تکوین عضو، خصوصیت مهم این فرآیند و فرآیندهای دیگر تکوین را آشکار کرده است: استفاده مکرر از نوع مشابه پیام و تنظیم کننده‌ها. پیام‌های Wnt تکوین عضو را آغاز کرده و همچنین الگوبندی در امتداد محور پشتی - شکمی جوانه عضو را کنترل می‌کند. مشابها فاکتورهای نسخه‌برداری رمزشده توسط ژنهای Hox جایی که اندام شکل خواهد گرفت را تعیین می‌کند و سپس الگوی انگشت را کنترل می‌کنند. سرانجام پیام‌های FGF برآمدگی جوانه عضو را آغاز می‌کنند (FGF10) و همچنین آن را حفظ می‌کنند (و FGF4). حجم ابزار مولکول‌های مهم تکوینی زیاد بزرگ نیست و ابزار به صورت تکراری برای کنترل سرنوشت سلول استفاده می‌شوند.

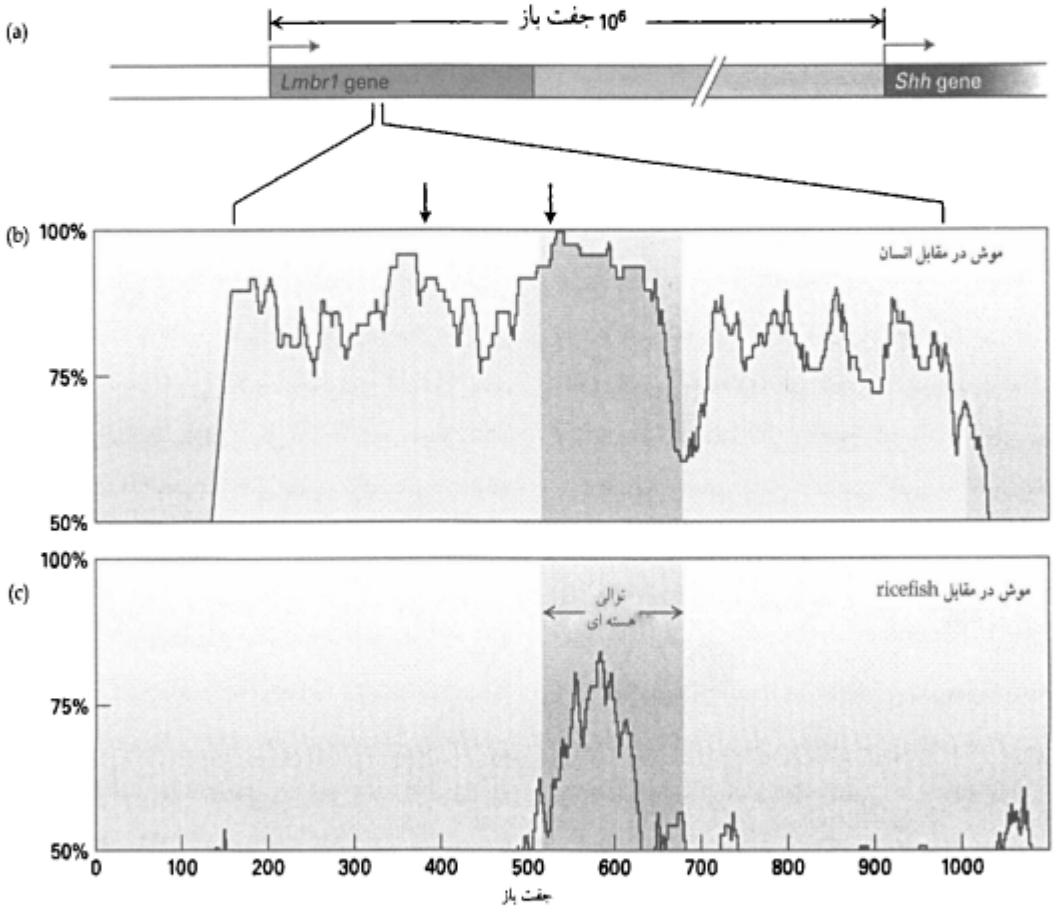
در بخش‌های ذکر شده، ما رویدادهای کلیدی زیادی در تکوین جنین حیوانات دیده‌ایم:

- ساختمان دو نوع گامت کاملاً متفاوت و ادغام آنها برای بازیابی ژنوم دیپلوئید با الگوهای بیان ژنی متفاوت توسط کروموزوم‌های مشتق از مادر و پدر.
- تغییر شکل تخمک لقاح یافته (تخم) طی تسهیم و گاسترولاسیون به سه لایه سلول بنیادی، آندودرم، مزودرم و اکتودرم، و تولید برهم‌کنش‌های القایی زیاد بین سلول‌ها در لایه‌های مختلف.
- برقراری محور پشتی - شکمی، جلویی - عقبی و چپی - راستی.
- تشکیل قلب، ارگان نامتقارن چپ به راست که خون را برای کل عمر پمپ خواهد نمود.
- تقسیم جنین اولیه به قطعات تکراری بدن هدایت شده توسط ترکیبات مختلف فاکتورهای رونویسی توزیع شده در فضا (حشرات) یا چرخه‌های بیان ژنی که در زمان متفاوتند (مهره‌داران).
- تولید اشکال مجزا در هر قطعه تکراری بدن در هم در حشرات و هم در مهره داران در نتیجه فعالیت ژن Hox .
- تاخوردگی اکتودرم برای ایجاد لوله عصبی و تولید آغازی نورون‌هایی که سیستم عصبی مرکزی را خواهند ساخت.
- انتخاب مکان‌هایی که اعضا در آن قرار خواهند گرفت و تکوین آنها در امتداد سه محور.

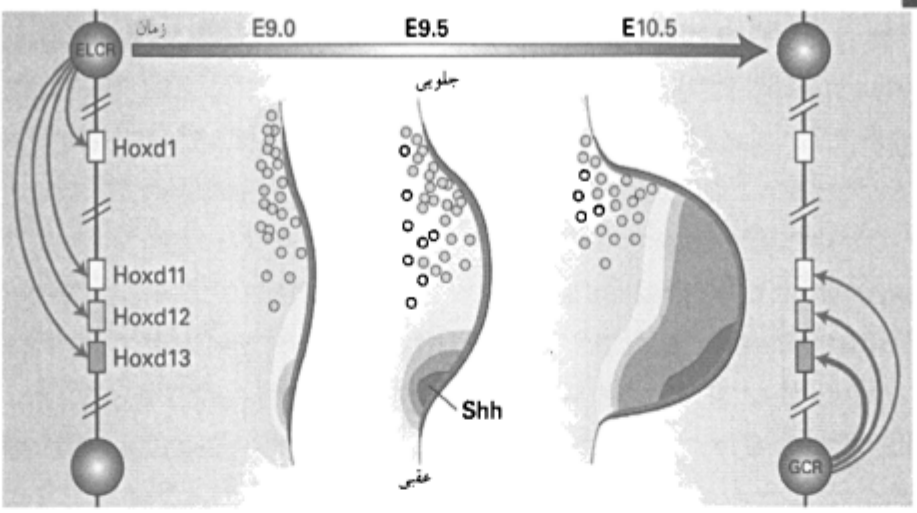
1- Synpolydactyly



◀ شکل ۴۶ - ۲۲. ادغام سه پیام در تکوین عضو مهره داران در امتداد محورهای پروکسیمال - دیستال و جلویی - عقبی. هر جوانه عضوی به سمت خارج پهلوی جنین رشد می‌کند. (a) پیام FGF، احتمالاً FGF10، از مزودرم در ناحیه ویژه‌ای از پهلوی جنین می‌آید. FGF10 در ناحیه موضعی سطح اکتودرم که لبه اکتودرمی راسی (AER)نامیده می‌شود چون تشکیل لبه غالب را خواهد داد، می‌آید. (b) اکتودرمی که پیام FGF10 را دریافت می‌کند القا می‌شود تا پیام ترشحی دیگر،FGF8 را تولید کند. در انتهای عقبی جوانه عضو، FGF8 رونویسی ژن Shh را القا می‌کند. (c) پیام رسانی Shh نسخه برداری ژن رمزکننده FGF4 در AER را القاء می‌کند. FGF8 و FGF4 تکثیر پیوسته سلول‌های مزودرمی را بیشتر کرده و باعث برآمدگی جوانه عضوی می‌شود. همچنین Shh این برآمدگی را تحریک کرده و خواص عقبی در جزء عقبی عضو ایجاد می‌کند. تکوین در امتداد محور پشتی - شکمی وابسته به پیام Wnt می‌باشد که در اینجا نشان داده نشده است.



▲ شکل تجربی ۴۷ - ۲۲. جهش‌هایی که باعث پلی داکتیلی (انگشت‌های اضافی) و معکوس شدن توالی تکاملی می‌شوند برای تعیین هویت افزاینده Shh استفاده شدند. اعضایی از چهار خانواده انسانی با فرم وراثتی پلی داکتیلی (انگشتهای اضافی) و دو نژاد موش با نقص مشابه پیدا شدند که دارای جهشهایی در ناحیه واقع شده در حدود یک مگا باز (Mb) دورتر از پروموتور Shh هستند. برای یافتن اینکه آیا جهش در این ناحیه در واقع مسئول پلی داکتیلی در این ناحیه است، دانشمندان توالیهای نوکلئوتیدی DNA از موش‌ها، انسان‌ها و Rice fish را مقایسه کردند. نمودار بالایی درصد هویت توالی بین DNA موش و انسان را نشان می‌دهد و دلالت بر این دارد که تشابه کاملاً در ناحیه تقریباً 1kb شامل جهش‌های انسانی (پیکان‌های سیاه) و جهش‌های موشی (پیکان‌های قرمز) زیاد است. خارج از این ناحیه تشابه توالی به صورت شگفت‌انگیزی افت می‌کند. نمودار پایینی ناحیه محدودتری از تشابه (به عنوان هسته) بین DNA موش و Rice fish را نشان می‌دهد. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که ناحیه 1kb شامل افزاینده کنترل کننده بیان Shh در جوانه عضوی می‌باشد. در موافقت با این ایده، موشهای جهش یافته‌ای پیدا شدند که Shh را در فضای جلویی جوانه عضوی، جایی که ژن باید خاموش باشد، بیان می‌کنند. به طور واضحی آسیب به افزاینده، Shh جوانه عضوی که بیان فضایی Shh را تغییر می‌دهد، می‌تواند باعث نقص در الگوبندی عضو شود.



▲ **شکل تجربی ۴۸ - ۲۲ (شکل رنگی). تنظیم Hox و Shh در جوانه اولیه عضو.** E9، E9.5، E10.5 به روزهای جنینی بعد از لقاح اشاره می‌کنند. اعتقاد بر این است که رونویسی ژن‌های Hox در جوانه عضو توسط دو افزاینده کنترل می‌شود. ناحیه کنترل عمومی (GCR) و ناحیه کنترل عضو اولیه (ELCR) طی تکوین عضو (ELCR) الگوهای اولیه بیان ژن Hox را همانطور که نشان داده شده، شامل hoxd1، را کنترل می‌کند و GCR موج بعدی رونویسی ژن Hox به‌استثنای hoxd1 را کنترل می‌کند. پروتئین‌های Hoxd11 - Hoxd13 رونویسی Shh را تحریک می‌کنند. دیاگرام تنها ژنهای hoxd را نشان می‌دهد، اما بقیه ژنهای Hox هم بیان می‌شوند. دایره‌های آبی کم رنگ پروتئین Gli3، فاکتور رونویسی که ژنهای هدف که توسط پروتئین Hox کنترل می‌شود (مانند Hoxd11 - Hoxd13) بعلاوه خود ژن Shh را سرکوب می‌کند، نشان می‌دهند، پروتئین Shh نسخه برداری Gli3 را برای فعال کردن هدف‌های خود، خاموش می‌کند.

اما جنین کاملاً شکل نگرفته است. مسأله تشکیل خیلی از بافت‌ها و اندام‌ها: پوست، استخوان، ماهیچه، چشمها، عروق، کبد، کلیه، گنادها، شش‌ها، روده و... وجود دارد. سیستم کنترل تعیین جنسیت وجود دارد که نیمی از ما را از نیم دیگر متفاوت می‌سازد و اندازه بدن و اندام را کنترل می‌کند نیاز به عصب‌دهی مغز است. فرآیندهای ترمیم و فرآیندهای پیری وجود دارند که همه تحت تاثیر کنترل ژنتیکی و محیطی هستند. ما نمی‌توانیم همه عناوین را توضیح دهیم. ولی اصول تکوینی شرح داده شده در این فصل به طور گسترده قابل کاربرد است و به دانشمندان اجازه استفاده از اطلاعات تکوین یک نوع بافت یا اندام به منظور راهنمایی برای مطالعه سایر بافت‌ها را می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۶ - ۲۲

رشد و الگو بندی اعضا

■ آغاز تکوین عضو در جایگاههای صحیح در طول محور جلویی - عقبی بدن که اساساً توسط ژن‌های Hox و دیگر ژن‌ها کنترل می‌شود منجر به بیان پیام‌هایی می‌شود که رشد جوانه از نواحی ویژه پهلویی جنین را القا می‌کند.

■ اعضا به صورت جوانه‌ای با یک پوسته اکتودرمی بر روی مزودرم پر شده، شروع می‌شود (شکل ۴۵ - ۲۲ را ملاحظه کنید). الگوبندی در داخل جوانه عضوی درگیر تعیین سرنوشت سلول تحت تاثیر سه سیستم پیام‌رسانی که به صورت همزمان عمل می‌کنند می‌باشد و بیان هر یک در مسیر وابسته به زمان و فضا می‌باشد.

■ برآمدگی جوانه عضو در امتداد محور پروکسیمال - دیستال توسط پیام FGF که از لبه اکتودرم راسی (AER) در خارجی‌ترین جزء جوانه منشا می‌گیرد، جلو برده می‌شود. الگوبندی جوانه در امتداد محور جلویی - عقبی وابسته به پیام Shh تولید شده در ZPA در عقب جوانه است (شکل ۴۶ - ۲۲). پیام Wnt توسط سلول‌ها تشدید می‌شود تا حدی که هر یک سرنوشت مناسب خود را به دست آورده و در تکوین عضو نقش دارند.

■ اطلاعات حاصل از پیام‌های FGF، Shh و Wnt توسط سلول‌ها یکپارچه می‌شود به طوری که هر کدام سرنوشت و نقش صحیح خودشان را در عضو در حال تکوین اعمال می‌کنند.

■ Shh بیان ژنهای Hox را در الگوی همپوشانی پیچیده در طی تکوین جوانه عضوی تنظیم می‌کند (شکل ۴۸ - ۲۲). ژن‌های Hox در تنظیم الگوی جزئی عضو برای مثال از انگشت‌های مختلف و استخوان، ماهیچه و اعصابی که آنها دارند، مهم می‌باشند.

چشم اندازی به آینده

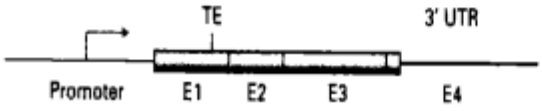
بدون شک شما توجه کرده‌اید که دسته‌های مشابه پیامها و فاکتورهای رونویسی طی تکوین جنین قطبی شده استفاده می‌شوند. سه دلیل برای این وجود دارد. اول، بیشترین حیرت بیولوژیستها تعداد دسته‌های مختلف پیامها و فاکتورهای رونویسی است که خیلی زیاد نیستند، برای مثال شاید ۲۰ نوع مختلف پیام وجود داشته باشند که برای هر نوع پیام مسیر استاندارد انتقال پیام به طور کامل و خوب شناخته شده است (فصل ۱۶). گوناگونی در استاندارد جالب است اما اغلب پیش‌بینی اینکه زمانی که یک پیام ویژه (مانند BMP) به یک سلول می‌رسد چه اتفاقی می‌افتد و چگونه پاسخ سلولی به پیام اندازه‌گیری و ردیابی می‌شود امکان‌پذیر است. دوم، دسته پروتئینی و سیستم ژنی درگیر در تکوین با درجه بالایی در اغلب حیوانات حفظ شده‌اند. این حفظ شدگی یک زبان «ژنتیک سلولی» در بین بیولوژیست‌هایی که بر روی تکوین موجودات زیادی کار می‌کنند ایجاد می‌کند که به آنها اجازه می‌دهد کشف و دانسته‌ها آن را به کار ببرند. سوم الگوی تکامل تکوین واضح است. دانستن اینکه چطور تکوین کنترل می‌شود به ما اجازه می‌دهد تا بیشتر در مورد چگونگی اشکال مجزای حیوانات که می‌توانند از جهش‌هایی که عملکرد تنظیم کننده‌های تکوینی را تغییر می‌دهند به وجود می‌آیند، بدانیم. دو پاسخ به نظر آشکار می‌آید: دانستن منشاء ما و استفاده از دانش ما از تکوین حیوانات برای جلوگیری و درمان بیماری‌های انسان.

داروین اهمیت جنین‌شناسی را در تئوری خود فهمید و وسیعاً در عنوان خود آن را نوشت. اما مکانیسم‌های بیولوژی مولکولی سلول که زمینه تکامل هستند در زمان او شناخته نشده بودند. حالا ما جزئیات زیادی درباره کنترل ژنی شکل حیوان داریم و طوفانی از اطلاعات جدید در حال جاری شدن است. فسیل‌های جدید مرتباً از اشکال اجدادی حد واسط یافت شده‌اند که به حیوانات عصر حاضر مرتبط هستند. برای نمونه فسیل‌هایی که به نظر می‌رسد اجداد مشترک وال‌ها و هیپوها را نشان می‌دهند پیدا شده‌اند، به علاوه جانور Tiktaalik که به نظر می‌رسد شبیه ماهی است ولی چهار پا دارد، پیدا شده است. همچنین جانورهای اجدادی سرنخ‌هایی درباره چگونگی تغییرات در فرآیندهای تکوینی ـ فرآیندهای تشکیل الگو ـ که تکامل را تحت تاثیر قرار می‌دهند، فراهم می‌کنند. همچنین وقتی شبکه برهم کنش‌هایی که تکوین هر بافت ویژه را کنترل می‌کنند، ترسیم می‌شوند، ما قادر خواهیم بود چگونگی تغییرات بعضی ترکیبات را که شکل و عملکرد حیوان را تغییر می‌دهند، بفهمیم. در میان همه تغییراتی که منجر به تنوع حیوانات - که خفاش‌ها را قادر به جهت‌یابی کردن توسط صدا و پروانه را قادر به استشمام ملکول‌های منفرد و چیتاهایی که می‌توانند ۶۰mph بدوند ـ می‌شوند تغییراتی هستند که ما را به این نکته می‌رسانند که ما چه چیزی هستیم.

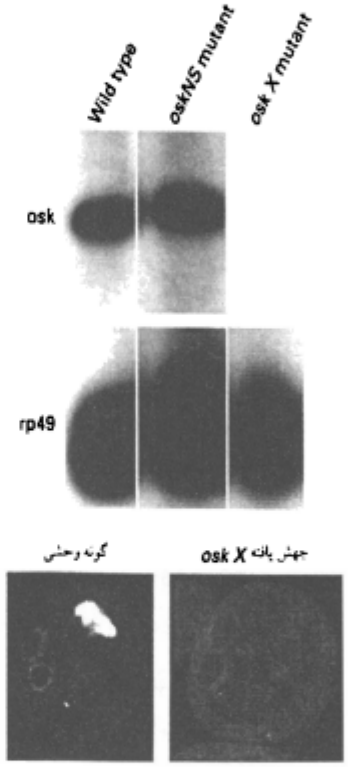
آسیب ژنتیکی در هر یک از تنظیم کننده‌های تکوینی منجر به نقایص تولدی، سرطان، بیماری‌های تحلیل برنده و تغییرات مقاومت به آلودگی می‌شوند. بنابراین زیست‌شناسی تکوینی منبع غنی از اطلاعات جدید درباره ایجاد بیماری‌های انسان می‌باشد. از آنجائی که خیلی از پروتئین‌ها در چندین مسیر عمل می‌کنند، ارتباط دادن یک تنظیم کننده تکوینی به یک بیماری اغلب منجر به شناسایی ژن‌های بیشتر انسانی که مرتبط به بیماری مشابه هستند، می‌شود. صرف‌نظر از یافتن ژن بیماری انسان، دورنماهای واقعی زیادی از کاربرد دانش ما در تکوین برای تحریک ترمیم بافت و پیشرفت سریعتر، شفاف‌تر وجود دارد. ترمیم سلول‌های خونی از کاشتهای مغز استخوان که شامل سلول‌های بنیادی خون ساز است یک روش تأییدشدهٔ خوبی است. هر احتمال وجود دارد که جریانی از درمان‌های جدید به عنوان دستکاری پیام‌ها و دیگر پروتئین‌ها ظهور پیدا کند و دقیق‌تر و خبره‌تر شود. توانایی انتقال دانش از تنوع وسیعی از جنین‌های حیوانات به زیست‌شناسی انسان، پیروزی تکامل تئوری و عملی، اساس مراحل بعدی پیشرفت‌های پزشکی است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

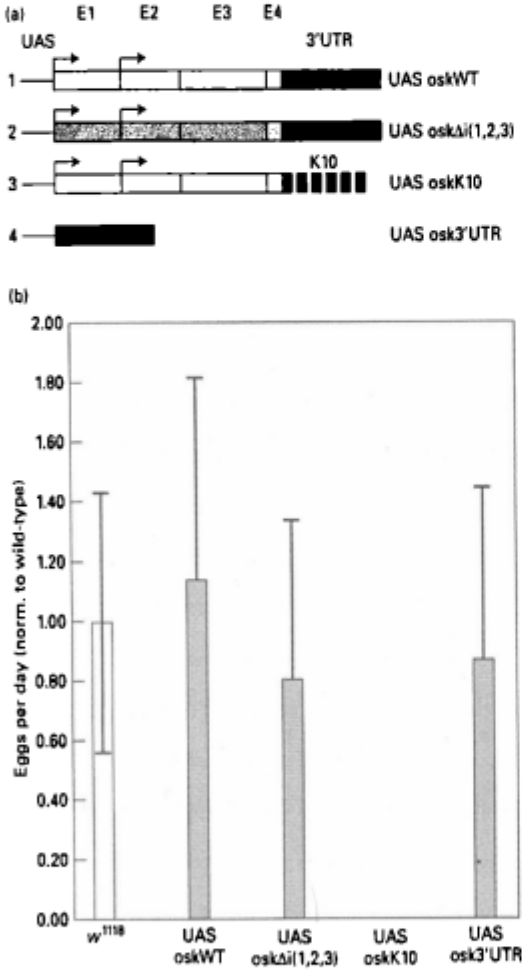
در دروزوفیلا mRNAهای تولید نشده مادهٔ و پروتئین هایی که محورهای بدن را تعیین می‌کند از سلول‌های پرستار به داخل اووسیت در حال تکوین انتقال می‌یابد. طی اووژنز اولیه یکی از این mRNAهای مادی، (oskar) در سراسر اووسیت پخش شده و ترجمه نمی‌شود. در اواسط اووژنز mRNAی oskar به قطب عقبی اووسیت جایی که ترجمه می‌شود انتقال می‌یابد ؛ سپس پروتئین oskar تشکیل بیشتر قطعات شکمی و سلول‌های رده زایا را آغاز می‌کند. این فرآیند تکوینی در جهش یافته‌های بی‌معنی oskar (oskNS) ناقص است. برای فهمیدن نقش mRNAی oskar و پروتئین آن در تکوین دروزوفیلا یک جهش یافته جدید (oskX) تولید شد. در این مگس جهش یافته ژن oskar شامل عنصر قابل انتقال (TE) در اولین اگزون (E1) که در اینجا ترسیم شده است، می‌باشد. برای سادگی اینترون‌ها به صورت خط‌های سیاه نازک برای جدا کردن اگزون‌ها ترسیم شده‌اند:



a) آنالیزنورترن بلات با استفاده از پروب مکمل mRNAی oskar یا rp49 mRNA برای جداسازی mRNA از خانه‌های تخمکی که شامل سلول‌های پرستار و اووسیت در حال تکوین در مگس‌های نوع وحشی و جهش یافته می‌باشد، انجام شد. نتایج در قسمت a شکل زیر نشان داده می‌شوند. میکروگراف‌ها و اتاقک تخمک که مورد دورگه سازی situ با یک پروب مستقیم mRMAی oskar قرار گرفتند در قسمت b نشان داده شده است. اتاقک تخمک در سمت چپ از ماده نوع وحشی است؛ اتاقک تخمک در سمت راست از یک ماده oskX است. دورگه‌سازی هم چنین رنگ‌آمیزی سفید در میکروگراف‌ها را نشان می‌دهد.



این داده‌ها چه چیزی را درباره جهش oskX نسبت به جهش oskNS پیشنهاد می‌کنند؟ هدف از نشانه‌گذاری برای rp49 mRNA چیست؟ b) مطالعه بیشتر ماده‌های همی زیگوت (تنها یک آلل در موجود وجود دارد) برای oskNS تخمکها نشان داد و زمانی که لقاح می‌یابند به جنین‌های فاقد ساختارهای عقبی تکوین پیدا می‌کنند. در مقابل ماده‌های همی زیگوت برای oskX تولید اووسیت‌هایی را می‌کنند که شروع به تشکیل می‌کنند سپس تحلیل می‌روند. چه اطلاعاتی را این مشاهدات درباره عملکرد پروتئین Oskar فراهم می‌کنند؟ c) آزمایشات زیر انجام شدند. چندین ترانس ژن حامل دُمین‌های مختلف از ژن oskar ساخته شده و به صورت مجزا به داخل هموزیگوت‌های ماده برای جهش ژن oskX وارد شدند. توانایی بیان ماده‌هایی که هر ترانس ژن را در تخمکها بیان می‌کنند، کنترل شد. در همه سازه‌های ترانس ژن، پروموتور oskar با یک پروموتور القایی مخمر (UAS) جایگزین شد. همچنین که در قسمت a از شکل زیر ترسیم شده است اولین سازه ترانس ژن شامل ژن oskar نوع طبیعی با ۳ اینترون آن (USA oskWT) می‌باشد. برای سادگی اینترون‌ها در شکل رسم نشده‌اند. در سازه دوم ژن oskar نوع طبیعی فاقد سه اینترون می‌باشد، ((UAS oskΔi (1,2,3). در سازه سوم ۳′UTR از ژن oskar تیپ وحشی با ۳′UTR از یک ژن نامربوط (UAS oskK10) جایگزین می‌شود. سازه نهایی شامل تنها ۳′UTR از ژن oskar است، (UAS osk۳′UTR). توانایی نسبی بیان در تخمک ماده‌های ترانس ژن در قسمت b نشان داده می‌شود. بار سفید (w^{1118}) تابعی از اندازه تخمک قرار گرفته در ماده‌های نوع وحشی غیر ترانس ژن است.



نوزادان ماده‌های بیان کننده ترانس ژن ۱ و ۲ طبیعی هستند در حالی که آنهایی که از ترانس ژن ۴ ناشی می‌شوند فاقد قطعات شکمی هستند. چه اطلاعات دیگری می‌تواند از این مشاهدات در باره نقش ژن **oskar** در تکوین دروزوفیلا به دست می‌آید؟

فصل ۲۳

سلول‌های عصبی

تصویری از سطح مخ و (پایین، راست) مخچه

رئوس مطالب

۲۳ـ۱ نورون ها و گلیا: واحد ساختاری سیستم عصبی

۲۳ـ۲ کانال‌های یونی دریچه‌دار ولتاژی و انتشار پتانسیل عمل در سلول‌های عصبی

۲۳ـ۳ ارتباطات در سیناپس‌ها

۲۳ـ۴ سلول‌های حسی: دیدن، احساس، شنیدن، چشیدن، و بوکردن (بوییدن).

۲۳ـ۵ مسیر موفقیت: کنترل رشد و هدف‌گیری در آکسون

وقتی انسان خود را به عنوان تکامل یافته‌ترین موجود در نظر می‌گیرد، تایید آن معمولاً به مغز بر می‌گردد، زیرا خیلی از توانایی‌های دیگر ما در مقایسه با حیوانات دیگر قوی می‌باشد. مغز انسان خیلی پیچیده بوده و به نظر می‌رسد برای برعهده گرفتن فعالیت‌های شگفت انگیزش کاملاً کافی باشد. در مغز ۱/۳ کیلوگرمی انسان بالغ (که ۷۸٪ آن آب می‌باشد!)، حدود 10^{11} سلول عصبی وجود دارد که نورون نامیده می‌شود. تعداد نورون‌های مغز انسان قابل مقایسه با 10^{11} ستاره‌ای است که در کهکشان راه شیری تخمین زده شده است. نورون‌های مغز یک انسان حدود 10^{14} سیناپس دارند که نقاط اتصال در جایی هستند که دو یا چند نورون با هم ارتباط برقرار می‌کنند. با $6/5\times10^{9}$ فرد در روی زمین، حدود $6/5\times10^{23}$ ($6/5\times10^{9}\times10^{14}$) سیناپس وجود دارد که معادل با تعداد کل ستاره ها در جهان است... البته تا جایی که ما می‌دانیم. با استفاده از نورون هایمان، می‌توانیم به جستجویمان برای یافتن ستاره‌های بیشتر ادامه دهیم!

دقیقاً در همین لحظه شما به شدت از نورون‌هایتان برای مشاهده و تفسیر اطلاعات بصری استفاده می‌نمایید. نورون ها ATP را که منحصراً از گلوکز به دست می‌آید به سرعت می‌بلعند. اگرچه مغز فقط ۲٪ از جرم بدن را دارد ولی حدود ۲۰٪ از انرژی ساکن در بدن را مصرف می‌کند. این انرژی زیاد مغز برای به جلو راندن پیام‌های الکتریکی و پیام‌های شیمیایی در بین نورون ها مصرف می‌شود. پالس‌های الکتریکی که در طول نورون ها حرکت می‌کنند، پتانسیل عمل نامیده می‌شوند و اطلاعات به صورت فرکانسی که پتانسیل در آن شروع می‌شود، منتقل می‌شوند. به خاطر سرعت انتقال الکتریکی، نورون ها قهرمان انتقال‌دهنده‌های پیام شده‌اند که خیلی سریع‌تر از سلول‌های ترشح‌کننده هورمون ها یا پروتئین‌های پیام رسان تکاملی عمل می‌کنند. سرعت پیام رسانی نورونی اداره مقادیر بالای اطلاعات را به صورت فوری امکان‌پذیر می‌کند. پیچیدگی شبکه عصبی ما، درک، آنالیز و پاسخ را در سطح بالا امکان‌پذیر نموده و یک دستگاه سلولی را در زیربنای غریزه، یادگیری، حافظه و احساس می‌سازد.

در این فصل ما روی نوروبیولوژی در سطح سلولی و مولکولی تمرکز می‌نماییم. ما با نگاهی به ساختار عمومی نورون ها و چگونگی حمل پیام ها، شروع می‌کنیم (شکل ۱ـ۲۳). سپس به جریان یونی، پروتئین‌های کانالی و ویژگی‌های غشاء نگاهی خواهیم انداخت: پالس‌های الکتریکی چگونه به سرعت در طول نورون ها حرکت می‌کنند. در بخش سوم، ما ارتباط بین نورون ها را بررسی می‌کنیم: پیام‌های الکتریکی که در طول سلول ها حرکت می‌کنند باید به پالس

شیمیایی بین سلول ها تبدیل شوند و سپس در سلول‌های دریافت‌کننده دوباره به پیام الکتریکی برگردانده می‌شوند. در بخش چهارم ما نورون‌های بافت حسی را بررسی می‌کنیم: چگونه اطلاعات بصری، لامسه، سمعی (شنوایی)، چشایی و بویایی، جمع‌آوری، پردازش و تفسیر می‌شوند. در نهایت، سیستم‌هایی را کنکاش می‌کنیم که اعصاب را در حین رشد راهنمایی می‌کنند: چگونه در ابتدا سیستم‌های پیام رسانی، «دیاگرام سیم‌کشی» را سازماندهی می‌نمایند.

سرعت، دقت و قدرت تجمع پیام رسانی عصبی امکان درک حسی به موقع و دقیق یک محیط را که در حال تغییر ملایمی است فراهم می‌نماید، و اساس تجزیه و تحلیل و پردازش پیام‌های پرمحتواست. ما پردازش را «تفکر[1]» عنوان می‌کنیم و زیست‌شناسی سلولی - مولکولی در بطن آن قرار دارد.

۲۳-۱ نورون ها و گلیا: واحدهای ساختاری سیستم عصبی

در این بخش ما یک نگاه اولیه به ساختار نورون ها و چگونگی انتشار پیام‌های الکتریکی و شیمیایی در آن ها می‌اندازیم. نورون ها از روی شکل طویل و نامتقارنشان و پروتئین ها و ارگانهای (اندامک‌های) بسیار جایابی شده و بیش از همه به خاطر داشتن دسته‌ای از پروتئین ها که جریان یون ها را در طول غشای پلاسمایی کنترل می‌نمایند شناخته شده‌اند. چون یک نورون می‌تواند به ورودی چندین نورون پاسخ دهد، تولید پیام‌های الکتریکی می‌نماید و پیام ها را در طول چندین نورون منتقل می‌کند. به این دلایل یک سیستم عصبی توان قابل ملاحظه‌ای در تجزیه و تحلیل پیام ها دارد. مثلاً یک نورون ممکن است فقط در صورتی یک پیام بدهد که خودش پنج پیام فعال‌سازی همزمان از نورون‌های درونی دریافت نماید. نورون دریافت‌کننده، هم مقدار پیام‌های ورودی و هم همزمان بودن یا نبودن پیام‌ها را اندازه می‌گیرد. ورودی یک نورون به دیگری می‌تواند تحریک‌کننده (به همراه پیام‌های دیگر برای شروع انتقالات الکتریکی در طول سلول‌های دریافت‌کننده) یا مهارکننده (سست‌کننده چنین انتقالاتی) باشد. پس ویژگی ها و اتصالات هر نورون شرایط را برای تجمع و بهبود اطلاعات فراهم و تنظیم می‌نماید. ما با نگاهی بر چگونگی دریافت و فرستادن پیام ها شروع کرده و در بخش‌های بعدی این فصل به جزئیات مولکولی دستگاه درگیر در این امر، نگاهی خواهیم انداخت.

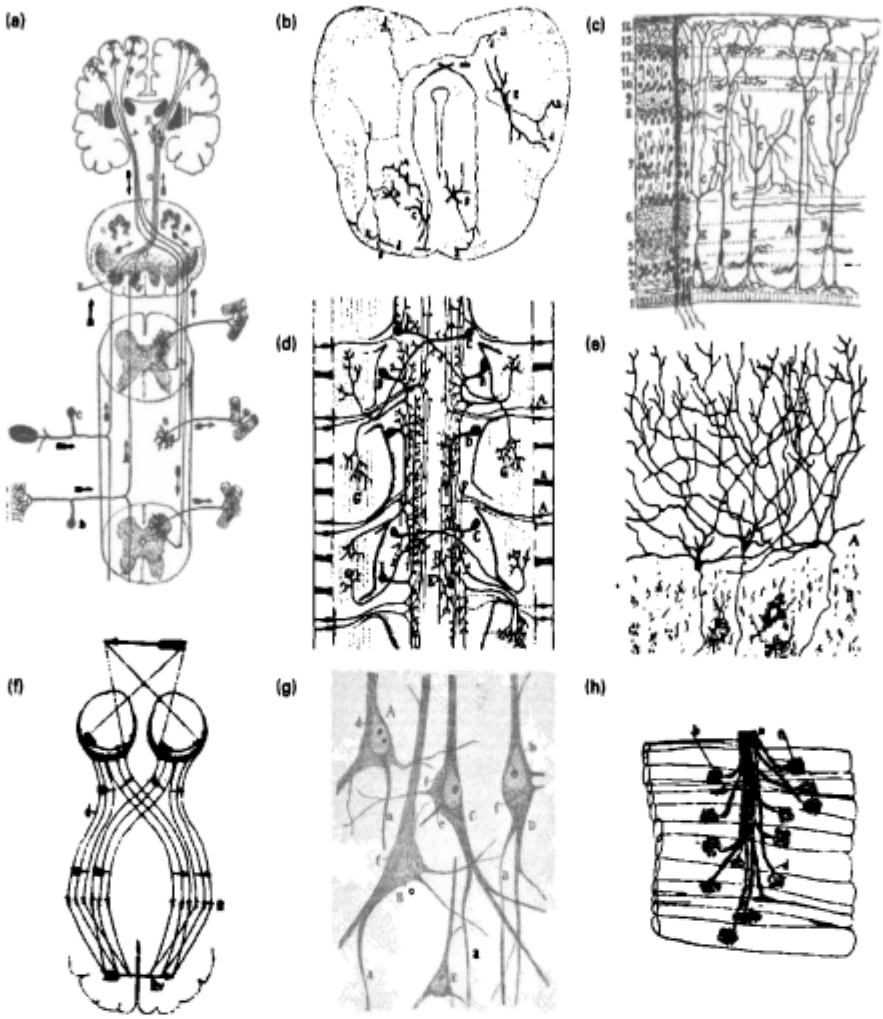
اطلاعات در نورون ها از دندریت‌ها به آکسون‌ها جریان می‌یابند

نورون ها از پیش سازهای نوروبلاستی تقریباً کروی به وجود می‌آیند. نورون‌های تازه تولید شده وقتی هنوز به شکل سلول‌های گرد ساده‌ای‌اند و هنوز به شکل سلول‌های بسیار بلند در نیامده‌اند، می‌توانند مسیرهای طولانی را طی کنند. نورون های کاملاً تمایز یافته اشکال مختلفی به خود می‌گیرند ولی عموماً اشکال کلیدی خاصی دارند (شکل ۱-۲۳). هسته در بخش گرد سلول به نام جسم سلولی است (شکل ۲-۲۳). شاخه‌های سلولی که **دندریت‌ها** نامیده می‌شوند (از ریشه یونانی برای «درخت مانند») در یک انتها یافت می‌شوند، و ساختار اصلی‌اند که پیام‌های نورونی را از طریق سیناپس دریافت می‌نمایند. پیام‌های ورودی از نورون‌های دیگر از طریق سیناپس‌های موجود بر روی سیستم عصبی جسم سلولی نیز یافت می‌شوند. اغلب نورون ها دارای دندریت‌های بسیار طولانی با شاخه‌های درهم پیچیده‌اند، خصوصاً در سیستم عصبی مرکزی، این امر به آن ها اجازه تشکیل سیناپس و دریافت پیام از تعداد زیادی از نورون‌های دیگر را می‌دهد (تا مضربی از ۱۰ هزار). پس شاخه‌های دندریتی همگرا اجازه دریافت پیام از خیلی از سلول ها و تجمع آن توسط یک نورون را می‌دهند.

وقتی یک نورون شروع به تمایز می‌کند در انتهای سلول (نقطه مقابل به دندریت‌ها) رشد زیادی می‌کند که منجر به ایجاد یک بازوی بزرگ توسعه یافته بنام **آکسون** می‌شود. رشد آکسون ها باید چنان کنترل شود که اتصالات مناسب تشکیل شود. این فرایند، راهنمایی آکسون نامیده می‌شود که در بخش ۵-۲۳ بحث شده است. قطر آکسون ها از فقط یک میکرومتر در اعصاب خاص مغز انسان تا یک میلی متر در رشته بزرگ اسکوئید می‌تواند باشد. آکسون ها از لحاظ طول می‌توانند چندین متر باشند (مثلاً در گردن زرافه) و اغلب تا حدی با عایق‌های الکتریکی بنام **غلاف میلین** پوشیده شده‌اند (شکل ۲-۲۳ را ملاحظه کنید) که این غلاف از سلول‌هایی به نام **گلیا** ساخته شده است. عایق‌سازی باعث تسریع انتقال جریان الکتریکی می‌شود و از ایجاد مدارهای کوتاه جلوگیری می‌کند. انتهاهای کوتاه و منشعب آکسون در انتهای مخالف به دندریت نورون، انتهای آکسونی نامیده می‌شود. در اینجا پیام ها به نورون دیگر داده می‌شوند. تقارن نورون، نشان دهنده جریان یک طرفه اطلاعات از دندریت به آکسون است.

برای همه نورون‌ها، تعداد کمتری از سلول ها در مغز هستند.

1- Thinking

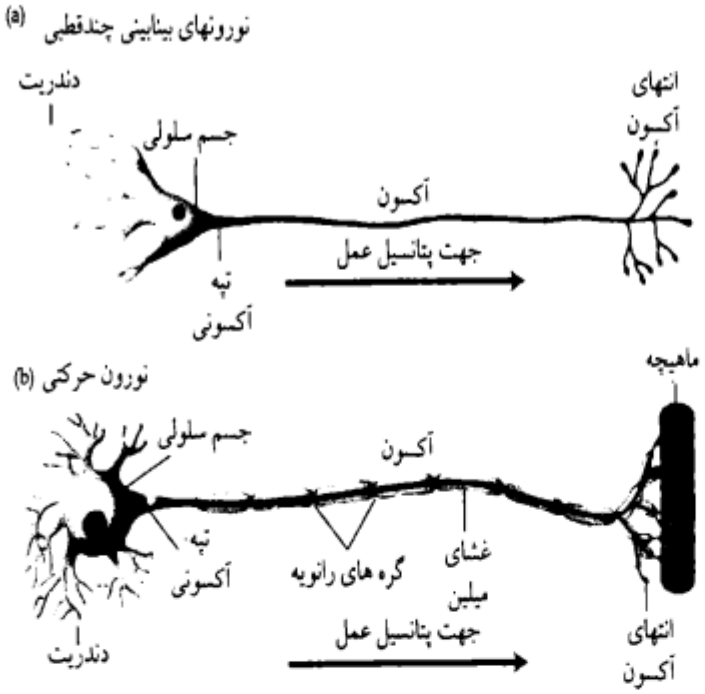


▲ **شکل ۱ـ۲۳ توضیح سیستم عصبی و سلول‌های عصبی.** (a) سیستم عصبی حسی و حرکتی یک کرم (A= سلول‌های حسی پوست، C= سلول‌های حرکتی با پیشرفت ضربدری، G= انشعاب انتهایی نورون حرکتی ماهیچه). (b) برش عرضی از نخاع شوکی. (c) برش لوب بینایی سوسمار (شماره ها نشان دهنده لایه‌های عمقی یا سطحی‌اند؛ A و C و D = سلول‌های عصای چوبی). (c,d) سلول‌های لایهٔ هسته‌ای برجستگی زیرین بجه گربه. (f) کیاسما (محل عبور) و برجستگی مرکزی مسیرهای بینایی انسان(C= مجموعه ضربدری عصب بینایی، d= مجموعه غیرضربدری بزرگ، Rv= برجستگی تصویر ذهنی، فلش، روی نواحی بصری قشر مخ). (g) نورون‌های لایه دوک مانند (مخروطی) قشر حرکتی انسان (EA = سلول‌های هرمی، a= آکسون‌ها). (h) نورون‌های حرکتی ختم شده به ماهیچه‌های خرگوشی (a= آرایش درختی انتهایی یک آکسون، d= نقطه‌ای که صفحه میلین خاتمه می‌یابد، n= شاخه عصب).

تعداد گلیا (سلول‌هایی که نقش‌های زیادی در مغز بازی می‌کنند ولی‌خودشان بر انگیزش‌های جریان الکتریکی را هدایت نمی‌کنند) نسبت به نورون ها ۱۰ به ۱ است. یکی از نقش‌های آن ها تولید غلاف میلین است، ولی نقش‌های مهم دیگری نیز دارند. هم اکنون کارهای زیادی برای درک چگونگی ساخت عایق‌های میلینی که انتقال الکتریکی نورونی را کنترل می‌کنند، فاکتورهای رشد را تولید می‌کنند، پیام ها را از نورون ها دریافت می‌کنند و در تشکیل سیناپس اثر می‌گذارند، در حال انجام است.

اطلاعات به صورت پالس‌های جریان یونی بنام پتاسیل عمل حرکت می‌کنند

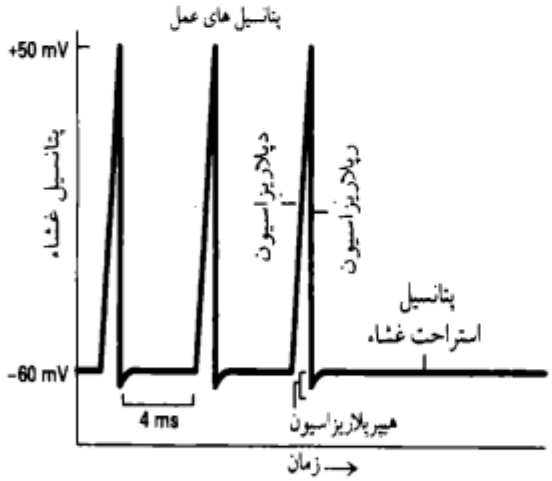
سلول‌های عصبی عضوی از سلول‌های تحریک پذیرند که از انواع دیگر این نوع سلول‌ها می‌توان سلول‌های ماهیچه‌ای، سلول‌های لوزالمعده و غیره را نام برد. این واژه نشان می‌دهد که این سلول ها، ولتاژی در طول غشای پلاسمایی بنام **پتانسیل غشاء** تولید می‌کنند که این ولتاژ می‌تواند (اجازه داده شود که به ولتاژ صفر برگردد یا حتی به مثبت افزایش پیدا کند) به روش‌های مختلف و به منظورهای مختلف شارژ شود (فصل ۱۱). ولتاژ نورون موردنظر که پتانسیل استراحت نامیده می‌شود (چون حالتی است که هیچ پیامی عبور نمی‌نماید)، توسط پمپ‌های یونی در غشای پلاسمایی تولید



◀ **شکل ۲ـ۲۳ مورفولوژی، دو نوع نورون در پستانداران.** پتانسیل عمل در تکمه آکسونی (تپه آکسون) ایجاد شده و به انتهای آکسون منتقل می‌شود. **(a)** یک نورون بینابینی چندقطبی دارای دندریت‌های منشعب پیشین است که پیام‌ها را در سیناپس با چند صد نورون دیگر دریافت می‌نمایند. تغییرات کوچک ولتاژ ایجاد شده از ورودی دندریت‌ها جمع شده و پتانسیل عمل بزرگتری را که در تکمه آکسونی شروع می‌شود ایجاد می‌کند. یک آکسون طولانی که به صورت جانبی در انتها منشعب می‌شود، پیام‌ها را به نورون‌های دیگر منتقل می‌کند. **(b)** یک نورون حرکتی پستانداران که منتهی به یک سلول ماهیچه‌ای می‌شود دارای یک آکسون است که از جسم سلولی تا سلول تحت تأثیر ادامه می‌یابد. در نورون‌های حرکتی پستانداران معمولاً غلافی عایق از جنس میلین همه قسمت‌های آکسون را به جزء گره‌های رانویه و انتهای آکسون می‌پوشاند. غلاف میلین از سلول‌هایی بنام گلیا تشکیل شده است.

می‌شود. پمپ‌ها انرژی را به فرم ATP برای حرکت دادن یون‌های باردار مثبت به خارج از سلول استفاده می‌کنند. نتیجه آن، یک بار منفی خالص در درون سلول نسبت به بیرون است. یک پتانسیل استراحت نمونه ۶۰mV- است.

نورون‌ها زبان مخصوص خودشان را دارند. پیام‌ها به صورت تغییرات ولتاژ ناحیه‌ای کوچکی، از درون منفی به مثبت، تغییر می‌کنند که به این تغییر **دپلاریزاسیون** می‌گویند. یک موج قوی تغییرات ولتاژی دپلاریزه‌کننده، که از یک انتهای نورون به انتهای دیگر حرکت می‌کنند **پتانسیل عمل** نامیده می‌شود. «دپلاریزاسیون» یک اسم بی مسمّی است، زیرا نورون از بخش درونی منفی به خنثی و از آنجا به حالت مثبت در درون می‌رود که می‌تواند به طور دقیق پلاریزاسیون قلمداد شود که توسط پلاریزاسیون مخالف دنبال می‌شود (شکل ۳ـ۲۳). در پیک یک پتانسیل عمل، پتانسیل غشاء می‌تواند تا ۵۰mV+ (درون مثبت) با بار خالص ۱۱۰mV≈ باشد. همانطور که با جزئیات بیشتر در بخش ۲ـ۲۳ خواهیم دید، تغییر ولتاژ (که در نهایت به تغییرات ولتاژ دیگر برای ایجاد پتانسیل عمل افزوده خواهد شد) در انتهای دندریتی سلول در پاسخ به ورودی سلول‌های دیگر شروع شده و در طول آکسون به سوی انتهای آکسون حرکت می‌کنند. پتانسیل‌های عمل با سرعت‌هایی تا ۱۰۰ متر در ثانیه حرکت می‌کنند. مثلاً در انسان‌ها نیز که آکسون‌ها بیش از یک متر



▲ **شکل تجربی ۳ـ۲۳ ثبت پتانسیل غشای آکسونی در طول زمان نشان دهنده دامنه و فرکانس پتانسیل‌های عمل است.** یک پتانسیل عمل دپلاریزاسیون گذرا و ناگهانی غشاء است که پس از آن رپلاریزاسیون یا پتانسیل استراحت حدود ۶۰mV- رخ می‌دهد. پتانسیل غشای آکسونی با الکترودهای کوچکی که در آن قرار داده می‌شوند اندازه‌گیری می‌شود (شکل ۱۸ـ۱۱). این ثبت از پتانسیل غشایی نورونی در این نورون نشان می‌دهد که یک پتانسیل عمل در هر ۴ میلی ثانیه تولید می‌نماید.

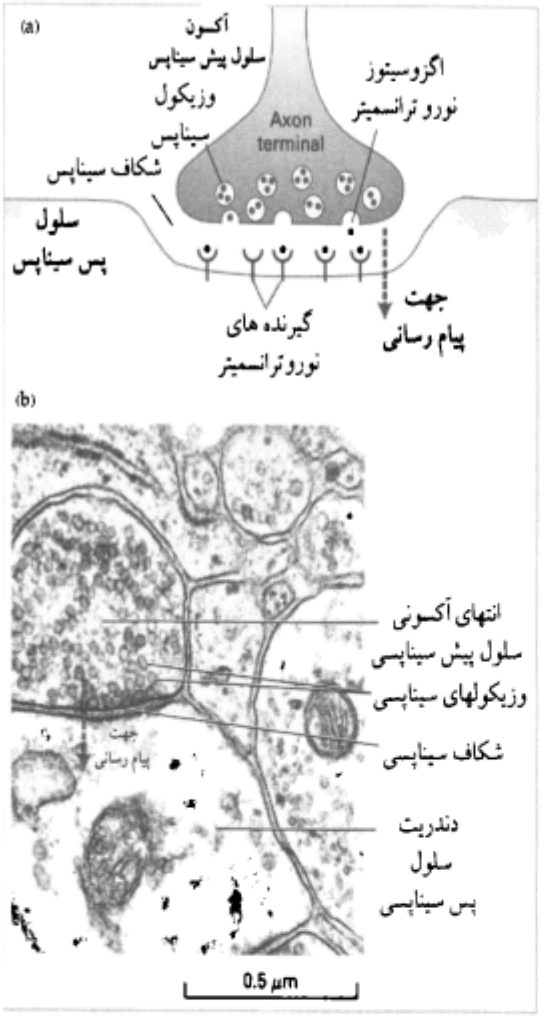
طول دارند، یک پتانسیل عمل در طول چندین میلی ثانیه در طول

آن ها حرکت می‌کند. نورون ها پس از یک دوره کوتاه بازیافت می‌توانند مکرراً فعالیت را از سر بگیرند، مثلاً هر ۴ میلی ثانیه یک بار که در شکل ۲۳ـ۳ نشان داده شده است. پس از اینکه یک پتانسیل عمل از بخشی از یک نورون عبور می‌کند، پروتئین‌های کانالی و پمپ ها، پتانسیل استراحت درون منفی را بازیابی می‌کنند (دپلاریزاسیون). فرایند بازیابی، پتانسیل عمل را تا انتهای آکسون دنبال کرده و مجدداً نورون را آماده دریافت پیام جدید می‌نماید. پتانسیل‌های عمل همه یا هیچ می‌باشند. وقتی حد آستانه شروع یکی فرا رسید، یک پتانسیل عمل کامل رخ می‌دهد و در نتیجه اطلاعات پیام در ابتدا با شدت پتانسیل عمل حمل نمی‌شود بلکه با زمان و فرکانس آن ها منتقل می‌گردد.

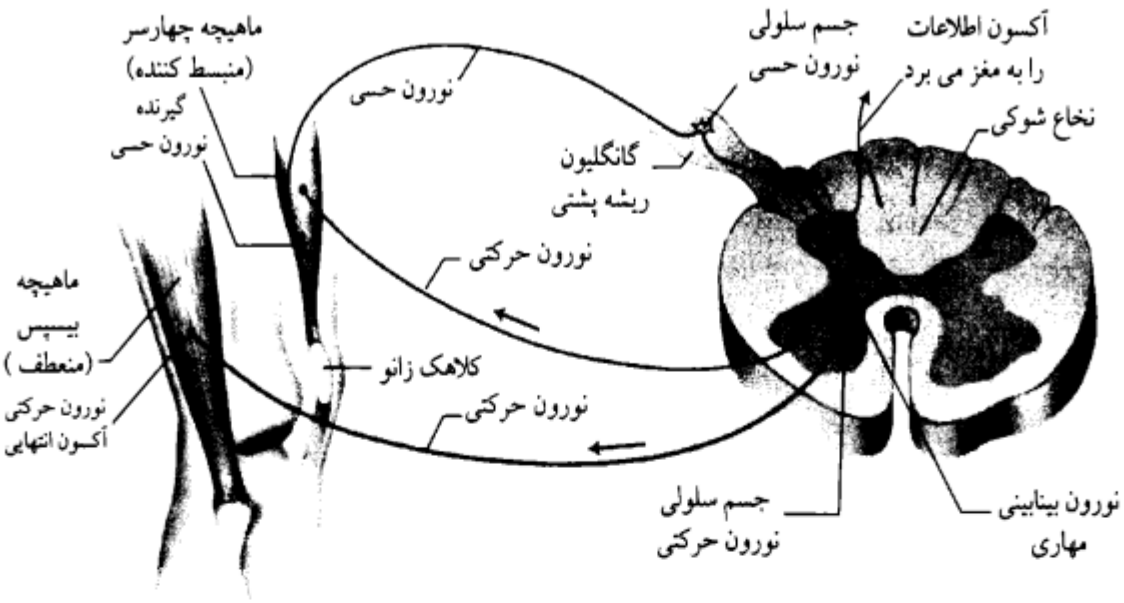
برخی سلول‌های تحریک‌پذیر نورون نیستند. انقباض ماهیچه توسط نورون‌های حرکتی که مستقیما با سلول‌های ماهیچه‌ای تحریک‌پذیر سیناپس دارند شروع می‌شود (شکل ۲۳ـ۲b). ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس توسط نورون ها شروع می‌شود. در هر دو حالت، فعال‌سازی تشکیل شده از باز شدن کانال‌های غشای پلاسمایی، موجب تغییرات جریان یون ها از خلال غشاء و ویژگی‌های الکتریکی سلول‌های تنظیم شده می‌شود.

اطلاعات از طریق سیناپس ها بین نورون ها جریان می‌یابد

چه چیز پتانسیل عمل را شروع می‌کند؟ انتهای آکسون یک نورون در محل اتصالاتی بنام **سیناپس** در معرض دندریت‌های نورون بعدی قرار می‌گیرند (شکل ۲۳ـ۴). انتهای آکسونی سلول پیش سیناپسی برای رهایش مولکول‌های کوچک بنام نوروترانسیمتر ها از اگزوسیتوز استفاده می‌کند. نوروترانسیترهایی مثل گلوتامات یا استیل‌کولین از خلال سیناپس در ۰/۵ ms انتشار می‌یابند و به گیرنده‌های دندریت نورون مجاور متصل می‌شود. اتصال نوروترانسمیتر باز شدن یا بسته شدن کانال‌های یونی در غشای پلاسمایی دندریت‌های سلول پس سیناپسی را شروع می‌کند که منجر به تغییر در پتانسیل غشاء در این نقطه می‌شود. دپلاریزاسیون ناحیه‌ای بعدی، حتی اگر خیلی بزرگ نباشد یک پتانسیل عمل را شروع می‌کند. ارسال پیام از انتهای آکسون سلول پیش سیناپسی به دندریت‌های سلول پس سیناپسی به صورت یک طرفه انجام می‌شود. در برخی سیناپس‌ها، اثر نورترانسیمتر ها هیپرپلاریزاسیون و در نتیجه کاهش احتمال پتانسیل عمل در سلول پس سیناپسی است. یک آکسون در سیستم عصبی مرکزی می‌تواند با خیلی از نورون ها سیناپس دهد و پاسخ را در همه آن ها به طور همزمان القا کند. برعکس، گاهی چندین نورون باید روی سلول پس سیناپسی به



▲ **شکل ۲۳ـ۴ (شکل رنگی) سیناپس شیمیایی.** (a) شکاف سیناپسی، غشای پلاسمایی سلول‌های پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی را از هم جدا می‌کند. رسیدن پتانسیل عمل به سیناپس، باعث آزادی نوروترانسمیترها (کره‌های قرمز) از سلول‌های پیش‌سیناپسی می‌شود. این نوروترانسمیترها از شکاف سیناپسی عبور کرده و به گیرنده‌های خود در غشای سلول پس‌سیناپسی متصل می‌شوند. در حالت عمومی، این سیگنال‌ها، غشای سلول پس‌سیناپسی را دپلاریزه کرده و باعث تولید پتانسیل عمل در آن می‌شوند. (b) میکروگاف الکترونی، سیناپس دندریت را با انتهای آکسونی غنی از وزیکول‌های سیناپسی نشان می‌دهد. در ناحیهٔ سیناپسی، غشای پلاسمایی سلول پیش‌سیناپسی برای اگزوسیتوز وزیکول‌ها تخصص پیدا کرده است؛ وزیکول‌های سیناپسی حاوی نوروترانسمیترهایی هستند که در این مناطق مجتمع شده‌اند. غشای سلول پس‌سیناپسی (در این مورد، نورون) حاوی گیرنده‌هایی برای نوروترانسمیترها است.



▲ **شکل ۵-۲۳ (شکل رنگی) انعکاس کششی زانو.** یک ضربه چکش باعث کشش در ماهیچه چهار سر می‌شود، در نتیجه فعالیت الکتریکی در گیرنده کششی نورون حسی شروع می‌شود. پتانسیل عمل، در جهت فلش آبی در بالا حرکت کرده و پیام‌ها را به مغز می‌رساند. در نتیجه ما از آنچه رخ می‌دهد آگاهیم و همچنین به دو نوع سلول در گانگیون ریشه پشتی که در نخاع قرار دارند پیام می‌فرستد. یک سلول، یک نورون حرکتی است که به ماهیچه چهارسر (قرمز) متصل می‌شود و انقباض این ماهیچه را موجب می‌شود به طوری که شما به فردی که به زانوتان چکش زده، لگد می‌زنید. ماهیچه دوم، یک نورون بینابینی مهاری (مشکی) را فعال یا «تحریک» می‌کند. نورون بینابینی اثر خفه‌کننده دارد و فعالیت را از طریق یک نورون حرکتی ماهیچه تاکننده (سبز) سد می‌کند، در حالی که در شرایط دیگر ماهیچه زردیی پشت ران که ماهیچه چهارسر را مهار می‌کند، فعال می‌نماید. به این صورت، آسایش ماهیچه زردیی پشت ران به انقباض ماهیچه‌های چهارسر گره می‌خورد. این یک انعکاس است چون حرکت نیازی به هیچ تصمیم هوشیارانه‌ای ندارد.

صورت نسبتاً همزمان عمل نمایند تا اثر نسبتاً قوی برای شروع‌پتانسیل عمل داشته باشند. ادغام نورونی پیام‌های دپلاریزاسیون و هیپرپلاریزاسیون احتمال پتانسیل عمل را بیان می‌نماید.

پس نورون‌ها ترکیبی از انتقالات الکتریکی بسیار سریع را در طول آکسون به همراه ارتباطات شیمیایی سریع بین سلول‌ها به کار می‌گیرند. حال ما به چگونگی ایجاد یک عمل مفید توسط زنجیره‌ای از نورون‌ها (یک مدار) خواهیم پرداخت.

سیستم عصبی از مدارهای پیام رسانی متشکل از چندین نورون استفاده می‌کند

در موجودات پرسلولی پیچیده مثل حشرات و پستانداران، انواع مختلف نورون‌ها مدارهای پیام رسانی را تشکیل می‌دهند. یک نورون حسی واقعه‌ای مانند برق نور یا حرکت ماهیچه را که رخ داده، گزارش می‌دهد. نورون حرکتی یک پیام را به ماهیچه منتقل می‌نماید تا انقباضش را تحریک کند (شکل ۵-۲۳، همچنین شکل ۲۳-۲b را ملاحظه کنید). نورون بینابینی نورون‌های دیگر را بهم پل می‌زند، گاهی اجازه ادغام یا مشتق شدن پیام‌ها را می‌دهد و گاهی مسیری که پیام طی می‌کند را افزایش می‌دهد. در یک نوع مدار ساده بنام قوس انعکاسی[1]، نورون‌های بینابینی چندین نورون حرکتی و حسی را بهم متصل نموده و موجب می‌شوند یک نورون حسی روی چندین نورون حرکتی تأثیر بگذارد و یک نورون حرکتی تحت تأثیر چندین نورون حسی قرار می‌گیرند؛ در این راه نورون‌های بینابینی ادغام شده و انعکاسات را افزایش می‌دهند، مثلاً، انعکاس کششی زانو در انسان (شکل ۵-۲۳) شامل یک قوس انعکاسی پیچیده است که در آن انقباض در یک ماهیچه تحریک و در ماهیچه دیگر مهار می‌شود. انعکاس، اطلاعات را به مغز می‌فرستد تا آن‌چه رخ داده است را اعلام کند. چنین مدارهایی با عمل منظم دسته‌ای از ماهیچه‌ها که هدف خاصی را به انجام می‌رسانند، به موجود زنده اجازه پاسخ به ورودی حسی می‌دهند.

بهرحال، این مدارهای ساده پیام‌دهی، مستقیماً عملکردهای عالی مغز مثل توجیه، محاسبه، وتوسعه حافظه را توضیح نمی‌دهند.

1- Reflex arc

نوعی از نورون‌های مغز پیام‌های بیش از هزار نورون دیگر را دریافت نموده و در عوض پیام‌های شیمیایی را به خیلی از نورون‌های دیگر منتقل می‌نمایند. خروجی سیستم عصبی به ویژگی‌های مدار آن مانند ارتباطات بینابینی بین نورون ها و مقاومت این ارتباطات بینابینی بستگی دارد. ابعاد پیچیده سیستم عصبی مثل بینایی و هوشیاری، در سطح تک سلولی قابل درک نیست، ولی فقط در سطح شبکه‌های سلول‌های عصبی که با تکنیک‌های تجزیه و تحلیل سیستم ها قابل مطالعه‌اند درک می‌شود. سیستم عصبی به طور ثابت در حال تغییر است؛ مثلاً، تغییر در تعداد و طبیعت ارتباطات بینابینی بین تک تک نورون ها در تشکیل حافظه‌های جدید رخ می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۱-۲۳

نورون‌ها و گلیا: واحدهای سازندهٔ سیستم عصبی

- نورون‌ها سلول‌های به شدت نامتقارنی هستند که از دندریت‌ها در یک انتها، جسم سلولی حاوی هسته و یک آکسون دراز و یک انتهای آکسونی تشکیل شده‌اند.
- نورون‌ها با استفاده از جریان یونی در عرض غشایی پلاسمایی، اطلاعات را از یک انتها به انتهای دیگر حمل می‌کنند. قسمتهای شاخه‌ای سلولی، دندریت‌ها، در یک انتهای سلول اطلاعات شیمیایی را از سایر نورون‌ها دریافت کرده و جریان یونی را به راه می‌اندازند. پیام الکتریکی سریعاً به انتهای آکسونی در طرف دیگر سلول حرکت می‌کند.
- سلول‌های گلیال ده برابر فراوانی نورون‌ها هستند و بسیاری از عملکردها نظیر شکل دادن به نورون‌ها و محافظت از اطلاعات سیناپس‌های جدید را بر عهده دارند.
- یک نورون در حال استراحت که هیچ پیامی را حمل نمی‌کند پمپهای پروتونی دارد که یونها را از عرض غشای پلاسمایی حرکت می‌دهند. حرکت یونهایی مثل K^+ و Na^+ و Cl^- یک بار منفی خالص در داخل سلول ایجاد می‌کند. این ولتاژ پتانسیل استراحت نامیده می‌شود و اغلب در حدود $-60mV$ است (شکل ۳-۲۳ را ملاحظه کنید).
- اگر یک محرک سبب بازشدن کانال‌های پروتئینی شود یونها به سرعت حرکت کرده و ولتاژ حاصله به سرعت از دندریت‌ها به سمت انتهای آکسونی حرکت می‌کند. سلول از $-60mV$ به $+50mV$ نسبت به محیط خارجی می‌رسد. این تکانه، پتانسیل عمل نامیده می‌شود.
- پتانسیل عمل به سرعت در نورون حرکت می‌کند زیرا تغییر در ولتاژ نزدیک دندریت‌ها باعث تغییر در ولتاژ جسم سلولی گشته که به نوبه خود همین تغییر در آکسونهای نزدیک و دور هم صورت می‌گیرد.
- نورون‌ها بوسیله شکافهای کوچکی بنام سیناپس به هم متصل شده‌اند. از آنجا که پتانسیل عمل نمی‌تواند از این شکافها پرش کند بنابراین در انتهای آکسون پیش‌سیناپسی، پیام از شکل الکتریکی به شیمیایی تبدیل می‌شود تا سلول پس سیناپسی را تحریک کند.
- به هنگام تحریک توسط پتانسیل عمل، انتهای آکسون بسته‌های شیمیایی با نام نوروترانسمیترها را توسط اگزوسیتوز آزاد می‌کند. نوروترانسمیترها از عرض سیناپس عبور کرده و به گیرنده‌های خود بر روی دندریت‌های سایر قسمتهای سیناپس متصل می‌شوند. این گیرنده‌ها یک پتانسیل آکسونی جدید را در سلول پس سیناپسی شروع می‌کنند (شکل ۴-۲۳ را ملاحظه کنید).
- نورون‌ها مدار تشکیل می‌دهند. آنها ممکن است شامل نورون‌های حسی، نورون‌های واسطه و نورون‌های حرکتی باشند (شکل ۵-۲۳ را ملاحظه کنید).

۲-۲۳ کانال‌های یونی دریچه‌دار ولتاژی و انتشار پتانسیل عمل در سلول‌های عصبی

تغییر در ولتاژ بخشی از سلول، باعث شروع باز شدن کانال ها در بخش دیگر سلول شده و پتانسیل عمل رخ می‌دهد بنابراین، کانال‌های ولتاژی در قلب انتقالات نورونی قرار دارند (فصل ۱۱). در این بخش ما ابتدا، توضیح می‌دهیم که چطور کانال‌های ولتاژی مسئول انتشار پتانسیل عمل در نورون‌هایی می‌باشند که عمل می‌نمایند. بنابراین، پیام‌های الکتریکی اطلاعات را درون سلول عصبی منتقل می‌نمایند، در حالی که پیام‌های شیمیایی که در بخش بعدی توضیح داده خواهند شد، اطلاعات را از یک نورون به نورون بعدی یا از یک نورون به ماهیچه یا سلول‌های هدف دیگر منتقل می‌نمایند.

بزرگی پتانسیل عمل به E_{Na} نزدیک است

عملکرد پمپ Na^+/K^+ غلظت بالایی از K^+ و غلظت پایینی از Na^+ را در سیتوزول تولید می‌نماید که به غلظتهایشان در محیط خارج سلولی بستگی دارد (فصل ۱۱). حرکت بعدی یون‌های K^+ به سمت خارج از طریق کانال‌های K^+ غیردریچه‌دار بر اثر شیب غلظت K^+ (سیتوزول > محیط سلول) ایجاد می‌شود که پتانسیل استراحت غشا را تولید می‌نماید. ورود یون‌های Na^+ از خارج سلول به سیتوزول از لحاظ ترمودینامیکی نیز مطلوب است و با شیب غلظت Na^+ (محیط > سیتوزول) و پتانسیل غشاء منفی در درون سلول کنترل می‌شود (شکل ۱۱-۲۴ را ملاحظه کنید). به هرحال، بیشتر

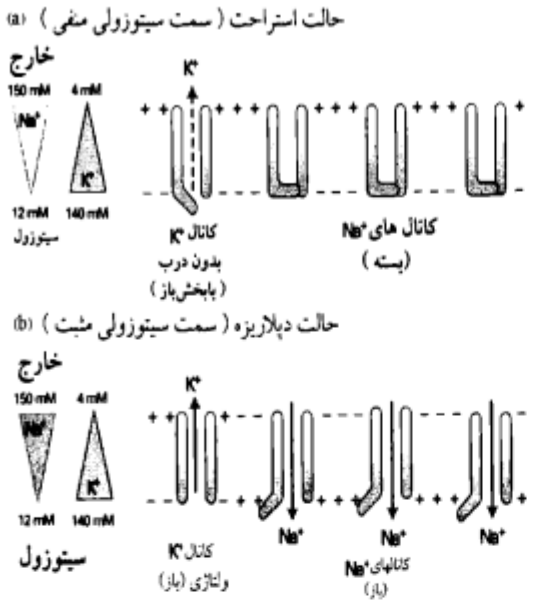
کانال‌های Na^+ در غشاء پلاسمایی در سلول‌های در حال استراحت بسته‌اند، در نتیجه مقدار کمی حرکت یون‌های Na^+ به سمت داخل می‌تواند رخ دهد (شکل ۲۳-۶a).

اگر کانال‌های Na^+ به تعداد کافی باز شوند، جریان رو به داخل یون‌های Na^+ بیش از مقداری خواهد بود که برای جبران خروج یون‌های K^+ از کانال‌های K^+ باز و در حال استراحت لازم است. نتیجه آن، حرکت کل (خالص) رو به داخل کاتیون‌هاست که در سطح سیتوزولی بارهای مثبت ایجاد می‌نماید و متقابلاً در سطح خارج سلولی بارهای منفی ایجاد می‌کند (به خاطر یون‌های کلر که د رمحیط خارج سلولی پس از ورود یون‌های Na^+ کنار گذاشته شده‌اند) (شکل ۲۳-۶b). به عبارت دیگر، غشای پلاسمایی به قدری دپلاریزه می‌شود که سطح داخلی مثبت می‌شود.

بزرگی پتانسیل غشاء در قله دپلاریزاسیون در پتانسیل عمل به پتانسیل تعادلی Na^+ (E_{Na}) که در معادله نرنست به آن اشاره شده، بسیار نزدیک است (معادله ۲-۱۱)، همانطور که باز شدن کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی مسئول ایجاد پتانسیل عمل است. برای مثال، مقدار اندازه‌گیری شده پیک (قله) پتانسیل عمل برای آکسون بزرگ اسکوئید ۳۵mV است که نزدیک به مقدار محاسبه شده E_{Na} (۵۵mV) براساس غلظت ۴۴۰mM Na^+ در خارج و ۵۰mM در داخل می‌باشد. ارتباط بین بزرگی پتانسیل عمل و غلظت یون‌های Na^+ در داخل و خارج سلول با مطالعات تجربی اثبات شده است. برای مثال، اگر غلظت Na^+ در محلولی که آکسون اسکوئید در آن قرار دارد به یک سوم مقدار طبیعی کاهش یابد، بزرگی دپلاریزاسیون به ۴۰mV کاهش می‌یابد که نزدیک به مقدار پیش‌بینی شده است.

باز و بسته شدن پیوسته کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی Na^+ و K^+ پتانسیل‌های عمل تولید می‌نماید.

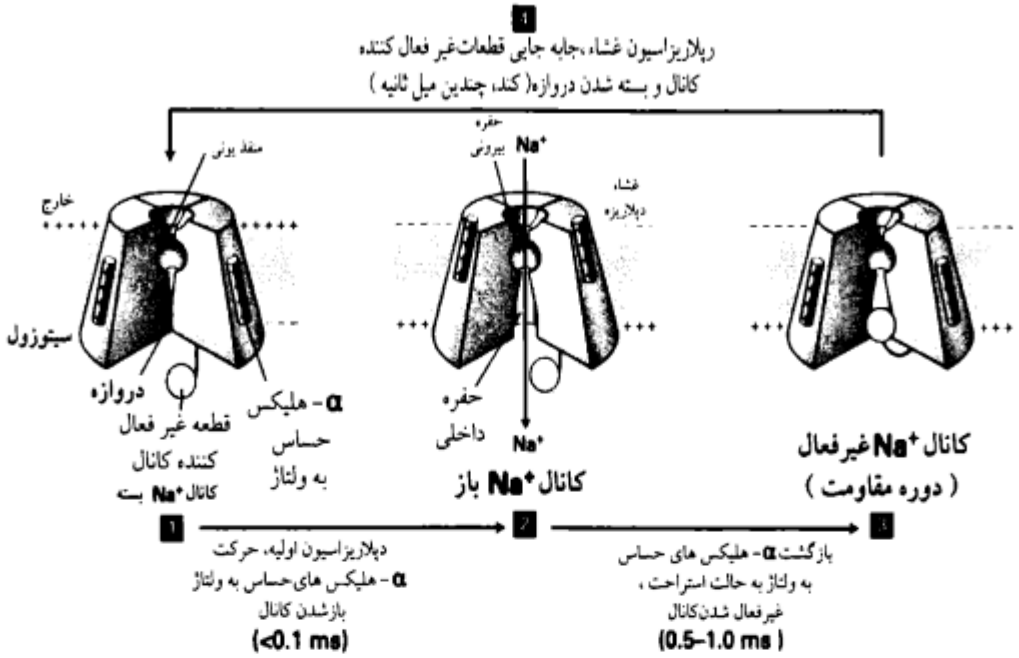
چرخه تغییرات در غشاء پلاسمایی و بازگشت به مقدار استراحت که پتانسیل عمل را تشکیل می‌دهد شاید ۲-۱ میلی ثانیه طول بکشد و در یک نورون خاص صد ها بار در ثانیه رخ دهد (شکل ۲۳-۳). این تغییرات چرخه‌ای در پتانسیل غشاء از باز و بسته شدن پی در پی، اول کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی و سپس کانال‌های K^+ دریچه‌دار ولتاژی حاصل می‌شود. نقش این کانال ها در ایجاد پتانسیل‌های عمل در مطالعات کلاسیک که روی آکسون بزرگ اسکوئید انجام شد توضیح داده شده است که در آن ها چندین میکروالکترود بدون تخریب یکپارچگی غشاء پلاسمایی داخل شد. بهرحال، مکانیسم یکسانی در همه سلول ها به کار می‌رود.



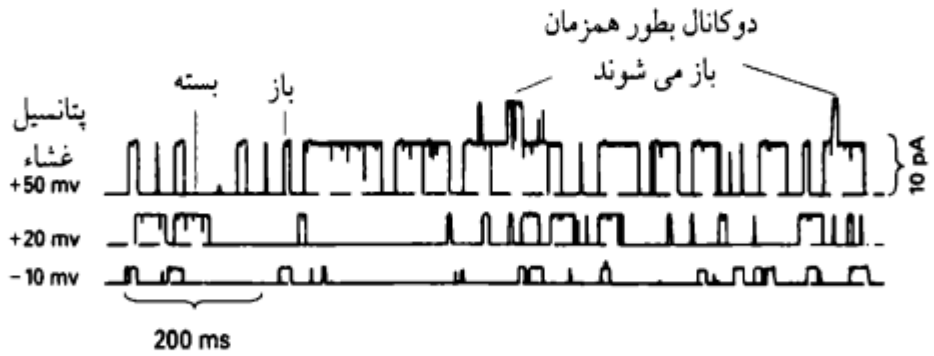
▲ **شکل ۲۳-۶ دپلاریزاسیون غشاء پلاسمایی به خاطر باز شدن کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی.** (a) در نورون‌های در حال استراحت، یک نوع کانال غیردریچه‌دار K^+ تا حدودی باز است، ولی تعداد زیادی کانال‌های Na^+ دریچه‌دار بسته‌اند. حرکت رو به خارج یون‌های K^+ عامل ویژگی پتانسیل غشاء منفی درونی بیشتر سلول هاست. (b) باز شدن کانال‌های Na^+ دریچه‌دار اجازه جریان رو به داخل یون‌های Na^+ را می‌دهد که باعث معکوس شدن پتانسیل غشاء می‌شود. در حالت دپلاریزه، کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی K^+ باز می‌شوند و سپس غشاء را دپلاریزه می‌کنند. توجه کنید که جریان یون ها چنان کوچکند که نمی‌توانند روی غلظت کلی Na^+ یا K^+ در سیتوزول یا ماده خارجی تأثیر بگذارند.

کانال‌های سدیمی دریچه‌دار ولتاژی: همانطور که بحث کردیم، کانال‌های سدیمی دریچه‌دار ولتاژی در نورون‌های در حال استراحت بسته‌اند. یک دپلاریزاسیون کوچک غشاء منجر به تغییرات ساختاری این پروتئین‌های کانالی می‌شود که دروازه‌ای را در سمت سیتوزولی منفذ باز نموده و اجازه عبور یون‌های Na^+ را از طریق منفذ به داخل سلول می‌دهد. هرچه دپلاریزاسیون اولیه غشاء بیشتر باشد، کانال‌های سدیمی دریچه‌دار ولتاژی بیشتری باز می‌شوند و یون‌های Na^+ بیشتری وارد می‌شوند.

وقتی یون‌های Na^+ از کانال‌های باز به داخل جریان می‌یابند، بارهای مثبت اضافی در سطح سیتوزلی و بارهای منفی در سطح اگزوپلاسمی مسیر کوتاهی را از ناحیه آغازین دپلاریزاسیون انتشار می‌یابند. این انتشار عبوری بارهای مثبت و منفی بخش‌های مجاور و غشاء پلاسمایی را دپلاریزه می‌کند (داخل را کمتر منفی



شکل ۷ـ۲۳ مدل نمایشی کانال Na^+ دریچه‌دار ولتاژی. چهار دُمین عبوری از غشاء منفذ مرکزی را می‌سازند که یون‌ها از آن عبور می‌نمایند. اجزاء اصلی که حرکت یون‌های Na^+ را کنترل می‌کنند در این شکل‌های برش خورده، ۳ تا از ۴ دُمین عبوری از غشاء را نشان می‌دهند. (❶) در حالت بسته و در حال استراحت، α هلیکس‌های بسته و حساس به ولتاژ که زنجیره‌های جانبی با بار مثبت در هر سه اسید آمینه دارند، به بارهای منفی بخش سیتوزولی غشاء در حال استراحت جذب می‌شوند. این امر موجب قرار گرفتن قطعه دروازه‌ای در ناحیه‌ای می‌شود که کانال را سد می‌نماید. (❷) در پاسخ به دپلاریزاسیون کوچک، هلیکس‌های حساس به ولتاژ با رفتار پیچ مانندی به سمت سطح خارجی غشاء می‌چرخند که موجب تغییرات سریع ساختاری در قطعهٔ دروازه‌ای می‌شود که کانال را باز می‌کند. (❸) هلیکس‌های حساس به ولتاژ به سرعت به وضعیت استراحت بر می‌گردند و قطعات غیرفعال‌کننده کانال به درون کانال باز حرکت کرده و مانع عبور یون‌های بیشتری می‌شوند. (❹) وقتی غشاء دپلاریزه می‌شود قطعه غیرفعال‌کنندهٔ کانال از دهانهٔ کانال جابه جا شده و دروازه بسته می‌شود؛ پروتئین به حالت بسته و در حالت استراحت باز می‌گردد و می‌تواند دوباره طی دپلاریزاسیون باز شود.



▲ **شکل تجربی ۸ـ۲۳ احتمال باز شدن کانال و جریان رایج از کانال‌های K^+ دریچه‌دار ولتاژی با افزایش دپلاریزاسیون غشاء افزایش می‌یابد.** این کپی‌های تکه ـ نگهداری از توده‌های غشاء پلاسمایی نورونی در سه پتانسیل متفاوت ۵۰+، ۲۰+ و ۱۰mV − به دست می‌آید. انحراف رو به بالای جریان نشانگر باز شدگی کانال K^+ و حرکت یون‌های K^+ سمت خارج (سطح سیتوزولی به اگزوپلاسمی) از خلال غشاء می‌باشد. با افزایش دپلاریزاسیون غشاء از ۱۰mV − به ۵۰mV+ ، احتمال اینکه کانال باز شود، زمانی که باز ماند و مقدار جریان الکتریکی (تعداد یون‌ها) که از آن عبور می‌نمایند افزایش می‌یابد.

می‌نماید). در نتیجه تعداد بیشتری از کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی در این بخش‌ها باز شده و جریان رو به داخل Na^+ افزایش می‌یابد. هرچه Na^+ بیشتری داخل سلول شود، داخل غشای سلول دپلاریزه‌تر می‌شود. در نتیجه مجدداً تعداد بیشتری کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی باز می‌شوند و حتی دپلاریزاسیون بیشتری رخ می‌دهد و موجب ورود انفجاری یون‌های Na^+ به داخل می‌شود.

برای کسری از میلی‌ثانیه، نفوذپذیری این ناحیه از غشای سلول به Na^+ بسیاربزرگتر از K^+ می‌شود و پتانسیل غشاء به E_{Na} می‌رسد که پتانسیل تعادلی غشایی است که فقط به Na^+ نفوذپذیر است. به هرحال، وقتی پتانسیل غشاء به E_{Na} می‌رسد، جریان رو به داخل بیشتر یون‌های Na^+ متوقف می‌شود زیرا شیب غلظت یون‌های Na^+ (خارج > داخل) با (E_{Na}) پتانسیل غشایی درون مثبت تعدیل می‌شود. پتانسیل عمل در قله‌اش به مقدار E_{Na} نزدیک است.

شکل ۷ـ۲۳ ویژگی‌های ساختاری مهم کانال‌های Na^+ دریچه‌دار ولتاژی و تغییرات ساختاری راکه موجب باز و بسته شدنشان می‌شود به صورت شماتیک نشان می‌دهد. در حالت استراحت بخشی از پروتئین در سطح سیتوزولی (دروازه) منفذ مرکزی را می‌بندد و مانع از عبور یون‌ها می‌شود. دپلاریزاسیون کوچک غشاء، حرکت α - هلیکس‌های حساس به ولتاژ با بار مثبت را به سوی سطح اگزوپلاسمی شروع کرده و موجب تغییرات کنفورماسیونی در دروازه می‌شود که کانال را باز نموده و به یون‌ها اجازه عبور می‌دهد. بعد از حدود ۱ms، جریان رو به داخل Na^+ بیشتر با حرکت قطعات غیرفعال‌کننده کانال به کانال باز ممانعت می‌شود. تا وقتی غشاء دپلاریزه بماند، قطعه غیرفعال کنندهٔ کانال در بخش باز کانال باقی می‌ماند؛ طی این دوره مقاومت[1]، کانال غیرفعال است و نمی‌تواند دوباره باز شود. چند میلی ثانیه بعد از اینکه پتانسیل استراحت درون منفی دوباره برقرار شد، قطعات غیرفعال‌کننده کانال از کنار منفذ حرکت می‌کنند و کانال به استراحت بسته باز می‌گردد و دوباره می‌تواند با دپلاریرازسیون باز شود.

کانال‌های K^+ دریچه‌دار ولتاژی: دپلاریزاسیون غشاء که طی دورهٔ مقاومت رخ می‌دهد تا حد زیادی به خاطر باز شدن کانال‌های K^+ دریچه‌دار ولتاژی می‌باشد. جریان رو به خارج و افزایش یافتهٔ بعدی K^+ از سیتوزول، بارهای مثبت اضافی را از سطح سیتوزولی غشاء پلاسمایی خارج می‌کند (یعنی آن را منفی‌تر می‌کند)، پس پتانسیل استراحت درون منفی بازیافت می‌شود. در واقع، اصطلاحاً غشاء هیپرپلاریزه می‌شود. در قلهٔ این هیپرپلاریزاسیون، پتانسیل به E_K می‌رسد که منفی‌تر از پتانسیل استراحت است (شکل ۳ـ۲۳ را ملاحظه کنید).

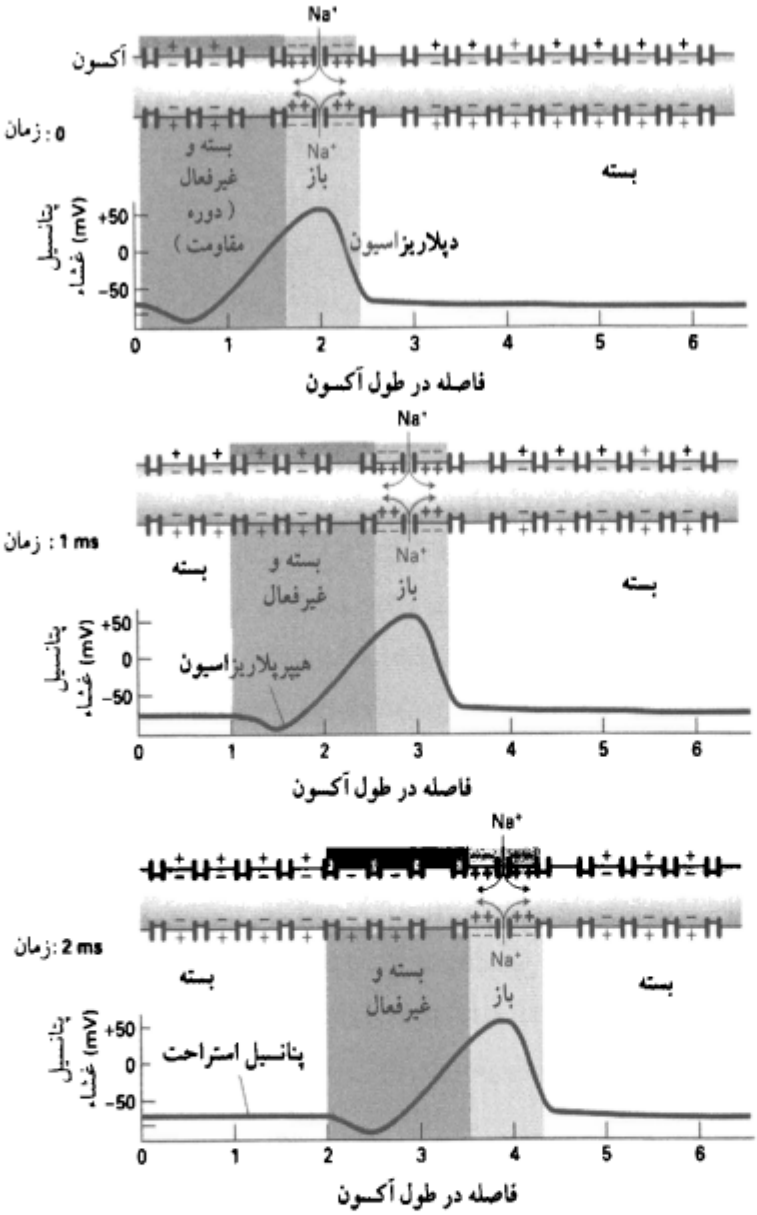
باز شدن کانال‌های K^+ دریچه دار ولتاژی با دپلاریزاسیون بزرگ پتانسیل عمل القا می‌شود. برخلاف کانال‌های Na^+ ولتاژی دریچه‌دار، بیشتر انواع کانال‌های K^+ ولتاژی دریچه‌دار تا وقتی که غشاء دپلاریزه شود باز می‌مانند و فقط وقتی بسته می‌شوند که پتانسیل غشاء به مقدار درون منفی باز می‌گردد. چون کانال‌های K^+ ولتاژی دریچه‌دار کمی بعد از دپلاریزاسیون اولیه در ارتفاع پتانسیل عمل باز می‌شوند، گاهی به آن‌ها کانال‌های K^+ تاخیری هم می‌گویند. بالاخره، همهٔ کانال‌های K^+ و Na^+ ولتاژی دریچه‌دار به حالت استراحت بسته‌شان باز می‌گردند. در این وضعیت پایه تنها کانال‌های باز، کانال‌های K^+ غیرولتاژی‌اند که پتانسیل استراحت ایجاد می‌نمایند که خیلی زود به وضعیت عادی‌اش باز می‌گردد (شکل ۶ـ۲۳a را ملاحظه کنید).

کپی برداری روش تکه ـ نگهداری در شکل ۸ـ۲۳ ویژگی‌های ضروری کانال‌های K^+ ولتاژی دریچه‌دار را نشان می‌دهد. در این آزمایش، قطعات کوچکی از غشاء پلاسمایی نورونی در ولتاژهای مختلف باگیره مخصوص گرفته شده و جریان‌های الکتریکی از درون وصله (تکه) به خاطر جریان یون‌های K^+ از طریق کانال‌های K^+ باز، اندازه‌گیری شدند. در ملایم‌ترین ولتاژ دپلاریزه‌کننده ۱۰mV، کانال‌ها در توده غشایی به ندرت باز می‌شوند و برای چندین میلی ثانیه باز می‌مانند که با تعداد و وسعت نوسانات رو به بالا در کپی مشخص می‌شود.

همچنین طبق اندازه‌گیری‌های انجام شده روی جریان الکتریکی عبورکننده از خلال هر کانال باز، جریان یونی خیلی کم است (ارتفاع نوسانات). دپلاریزاسیون غشاء تا ۲۰mV+ موجب دو برابر باز شدن کانال می‌شود. همچنین یون‌های K^+ بیشتری از هر کانال باز عبور می‌کنند (ارتفاع نوسانات بیشتر است) زیرا نیروی جلو رانندهٔ یون‌های K^+ سیتوزولی به بیرون در پتانسیل غشایی ۲۰mV+ بزرگتر از ۱۰mV - است. دپلاریزاسیون غشاء تا ۵۰mV+ (مقدار در قلهٔ پتانسیل عمل) موجب بازشدن بیشتر کانال‌های K^+ شده و جریان K^+ را از آنها افزایش می‌دهد. بنابراین با باز شدن طی قله پتانسیل عمل، وقتی که کانال‌های Na^+ بسته و غیرفعال شده‌اند، این کانال‌های K^+ اجازه حرکت رو به خارج یون‌های K^+ را داده و باعث رپلاریزاسیون پتانسیل غشاء می‌شود.

بیش از ۱۰۰ پروتئین کانال K^+ در انسان‌ها و مهره داران دیگر شناسایی شده‌اند. همانطور که بعداً بحث خواهیم کرد همه این پروتئین‌های کانالی ساختار کلی مشابهی دارند ولی وابستگی‌های ولتاژی، سینتیک کانالی و ویژگی‌های عملکردی متفاوت دیگری از خود به نمایش می‌گذارند. خیلی‌ها فقط در ولتاژهای قوی دپلاریزاسیون باز می‌شوند که ویژگی لازم برای تولید ویژگی‌های ماکزیمم دپلاریزاسیون پتانسیل عمل قبل از شروع رپلاریزاسیون غشاء است.

1- Refractory period

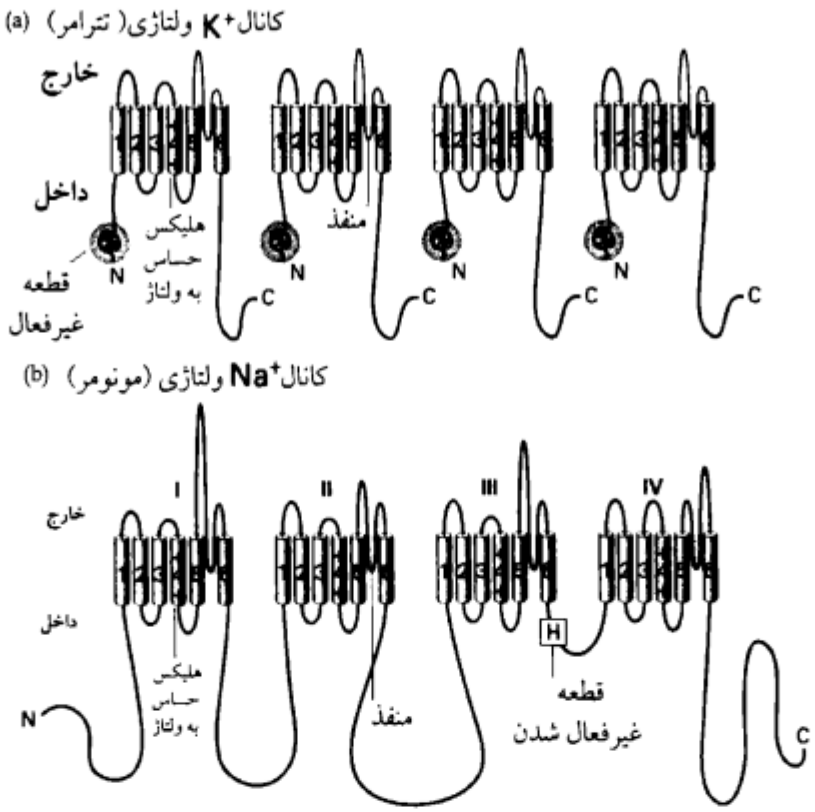


◀ **شکل ۹ـ۲۳ (شکل رنگی) انتقال یک طرفه پتانسیل عمل در اثر غیرفعال شدن گذرای کانال‌های Na^+ ولتاژی در زمان صفر.** یک پتانسیل عمل (قرمز) در نقطه ۲mm در آکسون است، کانال‌های Na^+ در این نقطه بازند و یون‌های Na^+ به سمت داخل جریان دارند. Na^+ اضافی در هر دو جهت در داخل غشاء حرکت کرده و دپلاریزاسیون را پخش می‌کند (با انتشار ساده). چون کانال‌های Na^+ در نقطه ۱mm هنوز غیرفعالند (سبز)، نمی‌توانند در اثر دپلاریزاسیون کوچک ایجاد شده در اثر این انتشار ساده دوباره باز شوند. در مقابل کانال‌های Na^+ در نقطه ۳mm شروع به باز شدن می‌کنند. هر ناحیه غشاء برای مدت چند میلی‌ثانیه بعد از عمل غیرفعال است. پس، دپلاریزاسیون در نقطه ۲mm در زمان صفر پتانسیل عمل را فقط در جهت پائین دست شروع می‌کند؛ در ۱ms پتانسیل عمل در حال عبور از نقطهٔ ۳mm است و در ۲ms پتانسیل عمل در حال عبور از نقطه ۴mm است.

پتانسیل‌های عمل به صورت یکطرفه بدون کاهش منتقل می‌شوند

تولید پتانسیل عمل به تغییراتی که در توده‌های کوچک غشاء پلاسمایی نورونی رخ می‌دهد، بستگی دارد. در قلهٔ پتانسیل عمل، انتشار عبوری دپلاریزاسیون غشاء برای دپلاریزاسیون قطعات همسایه غشاء کافی است. این امر منجر به باز شدن تعداد کمی ازکانال‌های ولتاژی Na^+ در این ناحیه شده، در نتیجه میزان دپلاریزاسیون در این ناحیه افزایش یافته و کانال‌های Na^+ بیشتری به صورت انفجاری باز شده و پتانسیل عمل رخ می‌دهد. این دپلاریزاسیون خیلی زود موجب باز شدن کانال‌های K^+ ولتاژی و بازیابی پتانسیل استراحت می‌شود. سپس پتانسیل عمل به صورت موج متحرکی از ناحیه آغازینش بدون کاهش منتشر می‌شود.

همانطور که قبلاً اشاره شد، طی دوره مقاومت، کانال‌های Na^+ ولتاژی برای چندین میلی ثانیه غیرفعال می‌شوند. این کانال‌ها که قبلاً باز شده‌اند طی این دوره نمی‌توانند باز شوند حتی اگر غشاء به خاطر انتشار عبوری دپلاریزه شود. همانطور که در شکل ۹ـ۲۳ شرح داده شد، ناتوانی کانال‌های Na^+ برای دوباره باز کردن طی دورهٔ مقاومت اطمینان می‌دهد که پتانسیل‌های عمل فقط در یک جهت منتشر شوند، از قطعهٔ اولیه آکسون که آغاز می‌شوند تا انتهای آکسون. این ویژگی کانال‌های Na^+ همچنین تعداد پتانسیل‌های عملی که در یک ثانیه در یک نورون ایجاد می‌شود را محدود می‌نماید. این امر از این لحاظ مهم است که فراوانی پتانسیل عمل است که اطلاعات را منتقل می‌کند. همچنین، دوباره باز شدن کانال‌های Na^+ در



▲ **شکل ۱۰ـ۲۳ (شکل رنگی) نمایش شماتیک ساختارهای دوم کانال‌های K^+ و Na^+.** (a) کانال‌های K^+ ولتاژی دریچه‌دار از چهار زیرواحد یکسان که هر یک ۶۰۰ـ۷۰۰ اسید آمینه دارند و شش α- هلیکس گذرنده از غشاء بنام‌های S1-S6 تشکیل شده‌اند. انتهای N هر زیرواحد که در سیتوزول قرار دارد و با N نشان داده شده که یک دُمین کروی تشکیل می‌دهد (نارنجی) که برای غیرفعال شدن کانال ضروری است. هلیکس‌های S5 و S6 (سبز) و قطعه P (آبی) همولوگ انواع موجود در کانال‌های K^+ در حال استراحت غیرولتاژی‌اند، ولی هر زیرواحد دارای چهار α- هلیکس دیگر است که از غشاء می‌گذرند. یکی از این ها بنام S4 (قرمز) α- هلیکس اولی است که حساس به ولتاژ بوده و هلیکس‌های S1-3 در این کار به آن کمک می‌کنند. (b) کانال‌های Na^+ ولتاژی دریچه‌دار مونومرهایی با ۸۰۰ـ۲۰۰۰ اسید آمینه هستند که از چهار دُمین گذرنده از غشاء (I-IV) تشکیل شده‌اند که مشابه زیرواحدهای کانال‌های K^+ ولتاژی‌اند. قطعهٔ غیرفعال کنندهٔ کانالی تکی که در سیتوزول بین دومین‌های III و IV قرار دارد دارای موتیف حفظ شده هیدروفوب است (H: زرد). کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی دریچه‌دار ساختار کلی مشابهی دارند. همچنین، بیشتر کانال‌های یونی ولتاژی دارای زیرواحدهای تنظیمی (β) هستند که در این شکل نشان داده نشده است.

بالادست یک پتانسیل عمل (یعنی نزدیک به جسم سلولی) با هیپرپلاریزاسیون غشاء که از باز شدن کانال‌های K^+ ولتاژی حاصل شده، به تاخیر می‌افتد.

سلول‌های عصبی پتانسیل‌های عمل زیادی را می‌توانند در غیاب ATP منتقل نمایند.

دپلاریزاسیون غشاء طی پتانسیل عمل از حرکت تعداد کمی Na^+ در نورون حاصل می‌شود و تأثیر زیادی روی غلظت خارج سلولی Na^+ نمی‌گذارد. یک سلول عصبی حدود ۱۰ کانال Na^+ ولتاژی در هر میکرومتر مربع (μm^2) از غشاء پلاسمایی دارد. چون هر کانال تقریباً ۵۰۰۰ـ۱۰۰۰۰ یون طی هر میلی ثانیه‌ای که باز است عبور می‌دهد (شکل ۲۲ـ۱۱)، حداکثر 10^5 یون در هر μm^2 از غشاء پلاسمایی طی پتانسیل عمل به داخل حرکت خواهد کرد.

برای سنجش اثر این جریان یونی روی غلظت Na^+ سیتوزولی ۱۰mM (۰/۰۱mol/L)، برای یک آکسون در حال استراحت، ما روی قطعه‌ای از آکسون به طول ۱μm و قطر ۱۰μm تمرکز می‌کنیم. حجم این قطعه ۷۸μm^3 یا $7/8\times10^{14}$ لیتر است و دارای $4/7\times10^8$ یون Na^+ است: $(10^{-2}mol/L)(7/8\times10^{-14}L)(6\times10^{23}Na^+/mol)$. ناحیه سطح این قطعه از آکسون ۳۱μm^2 است و طی عبور از یک پتانسیل عمل، 10^5 یون Na^+ در هر μm^2 از غشاء وارد خواهند شد.

پس این جریان رو به داخل Na^+ با فقط یک قسمت در ۱۵۰ تا، تعداد یون‌های Na^+ را در هر قسمت افزایش می‌دهد: ($۳/۱\times۱۰^{۶}$) ÷ ($۴/۷\times۱۰^{۸}$). همینطور، رپلاریزاسیون غشاء به علت جریان رو به خارج یون‌های K^+ از کانال‌های K^+ ولتاژی، غلظت K^+ داخل سلولی را خیلی تغییر نمی‌دهد. زیرا یون‌های Na^+ و K^+ کمی از غشاء پلاسمایی طی پتانسیل عمل عبور می‌کنند.

پمپ Na^+/K^+ ATPase که شیب معمول یونی را حفظ می‌کند نقش مستقیمی در عبور تحریک بازی نمی‌کند، از آنجائی که حرکت یونی هر پتانسیل عمل شامل فقط کسری از دقیقهٔ یون‌های Na^+ و K^+ در سلول است، یک سلول عصبی می‌تواند صد ها یا حتی هزاران بار در غیاب ATP تحریک شود.

همه کانال‌های یونی ولتاژی دریچه‌دار ساختارهای مشابه دارند

با توضیح اینکه چگونه پتانسیل عمل وابسته به باز و بسته شدن کانال‌های ولتاژی است، ما به بخش مولکولی این پروتئین‌های حائز اهمیت می‌پردازیم. پس از توضیح ساختار اولیهٔ این کانال‌ها، روی سه سؤال تمرکز می‌کنیم:

- چطور این پروتئین ها تغییرات پتانسیل غشاء را حس می‌کنند؟
- این تغییر چگونه موجب باز شدن کانال می‌شود؟
- چه عاملی باعث غیرفعال شدن این کانال ها کمی بعد از باز شدن می‌شود؟

اولین موفقیت در درک کانال‌های یونی ولتاژی از تجزیه و تحلیل مگس سرکه که حامل جهش shaker بودند حاصل شد. این مگس ها تحت بیهوشی با اتر، به شدت تکان می‌خورند که نشانگر فقدان کنترل حرکتی و نقص در نورون‌های حرکتی است که پتانسیل عملی دارند که به طور غیرعادی بلند است. محققان فکر می‌کنند که جهش shaker موجب نقصی در عملکرد کانال می‌شود. کلونینگ ژن حامل اثبات کرد که پروتئین ناقص یک کانال است. جهش shaker مانع باز شدن طبیعی کانال جهش یافته درست پس از دپلاریزاسیون می‌شود. برای آزمایش اینکه آیا ژن shaker وحشی یک کانال K^+ را رمز می‌کند، cDNAی وحشی shaker به عنوان الگویی برای تولید mRNAی shaker در سیستم بیرون سلول به کار رفت. بیان این mRNA در اووسیت قورباغه و اندازه‌گیری‌های تکه ـ نگهداری روی پروتئین کانالی تازه سنتز شده، نشان داد که ویژگی‌های عملکردی با ویژگی‌های کانال K^+ ولتاژی از غشاء نورون یکسان است، که در نتیجه نشان می‌دهد ژن shaker پروتئین کانال K^+ را رمز می‌کند.

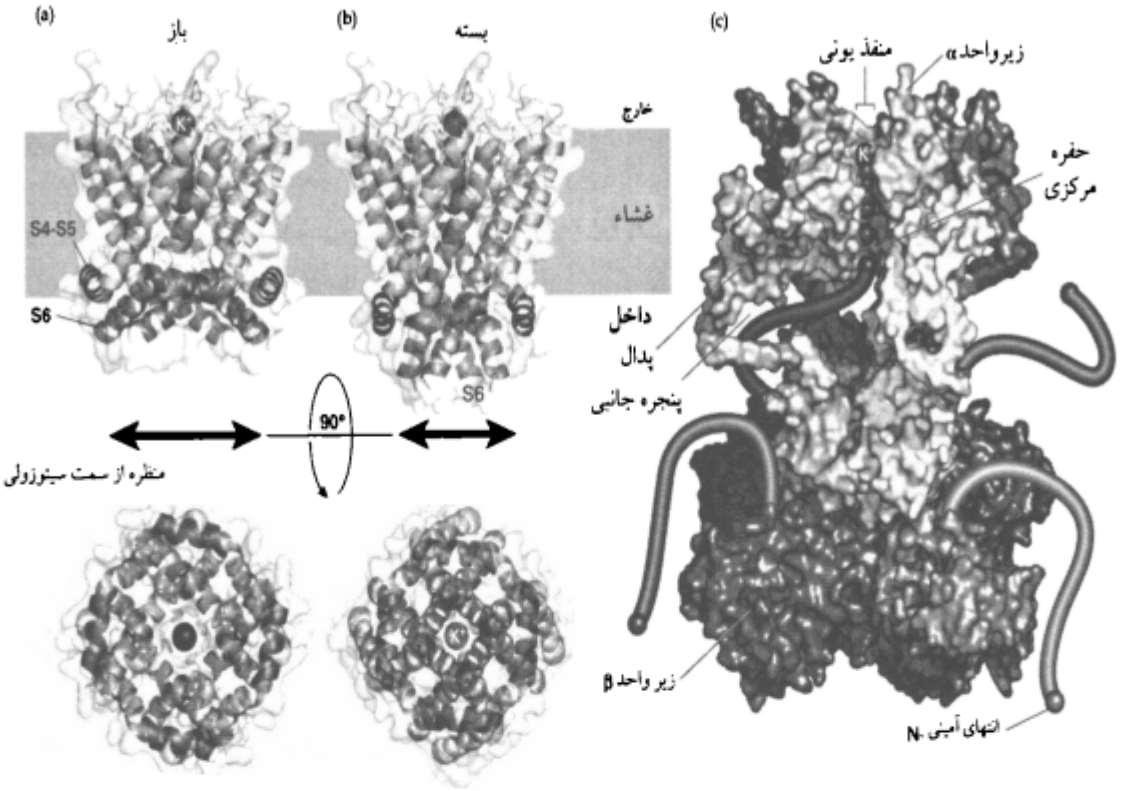
کانال shaker K^+ و خیلی کانال‌های K^+ ولتاژی دیگر پروتئین‌های تترامری‌اند که از چهار زیرواحد برابر که در غشاء حول یک منفذ مرکزی آرایش یافته‌اند، تشکیل شده است. هر زیرواحد از شش مارپیچ آلفای α- هلیکس عبورکننده از غشاء بنام S1-S6 تشکیل شده است (شکل ۱۰a-۲۳). هلیکس‌های S1 و S6 و قطعه P از لحاظ ساختار و عملکرد با زیرواحدهای نظیرشان در کانال‌های K^+ غیرولتاژی که قبلاً بحث شده‌اند، همولوگ می‌باشند (شکل ۱۹-۱۱ را ملاحظه کنید). S5 و S6 بخشی از کانال را تشکیل می‌دهند که یون ها از آن عبور می‌کنند. هلیکس‌های S1 تا S4 به عنوان سنسور (حسگر) ولتاژی عمل می‌کنند. S4 به عنوان حسگر اولیه عمل می‌کند و به عنوان پلاس‌هایی که مدیون برجستگی‌شان از کمپلکس مرکزی‌اند، توضیح داده شده‌اند. «توپ» انتهای آمینی که از S1 به سیتوزول توسعه می‌یابد قطعه غیرفعال کنندهٔ کانال است.

کانال‌های ولتاژی دریچه‌دار Na^+ و Ca^{2+} پروتئین‌های مونومری‌اند که به صورت چهار دُمین همولوگ I-IV درآمده‌اند (شکل ۱۰b-۲۳). هر یک از این دُمین ها شبیه زیرواحدی از کانال های K^+ ولتاژی دریچه‌دار است. با این حال، برخلاف کانال‌های K^+ ولتاژی که چهار قطعهٔ غیرفعال کانالی دارند، کانال‌های ولتاژی مونومری دارای قطعه غیرفعال کنندهٔ منفرد کانالی‌اند. به جز این تفاوت ساختاری کوچک و نفوذپذیری‌های یونی مختلف آنها، به نظر می‌رسد همه کانال‌های ولتاژی عملکرد مشابهی دارند و از یک پروتئین کانالی مونومری اجدادی که از شش α- هلیکس عبورکننده از غشاء تشکیل شده است، تکامل یافته‌اند.

α- هلیکس‌های حساس به ولتاژ در پاسخ به دپلاریزاسیون غشاء حرکت می‌نمایند

درک بیوشیمی پروتئین‌های کانالی به خاطر ساختارهای کریستالی جدید کانال‌های پتاسیمی باکتریایی و shaker و کانال‌های دیگر به سرعت در حال رشد است. یک روش به دست آوردن کریستال از این پروتئین‌های غشایی، احاطه کردن آن ها با قطعات متصل شده آنتی بادی‌های منوکلونال است (Fab's؛ فصل ۲۴)؛ در روش‌های دیگر، آن ها در کمپلکس‌هایی با همتاهای معمول متصل شونده به پروتئین، کریستاله می‌شوند.

ساختارهای کانال ها آرایش عالی دُمین‌های حساس به ولتاژ را آشکار می‌کند و نشان می‌دهد که چگونه بخش‌های پروتئینی برای باز کردن کانال حرکت می‌کنند. تترامر منفذی دارد که دیواره‌هایش از



▲ **شکل ۱۱-۲۳ (شکل رنگی) ساختار مولکولی یک کانال پتاسیمی حساس به ولتاژ.** دو دیاگرام نواری مدل‌هایی از کانال پتاسیمی را در حالت‌های (a) باز و (b) بسته نشان می‌دهند. چون مولکول تترامری از زیرواحدهای یکسان است چهار کپی از هر هلیکس مشاهده می‌شود؛ α هلیکس‌های قهوه‌ای (S5) و سبز (S6) در غشاء قرار می‌گیرند به طوری که داخل ستون در عمق و خارج در سر قرار می‌گیرد. کره‌های ارغوانی یون‌های K^+ را نشان می‌دهند که از خلال کانال‌های باز می‌گذرند و بخشی از کانال بسته را بدون عبور از آن اشغال می‌کنند. هلیکس‌های S6 (سبز) در طول منفذ قرار می‌گیرند. دقت کنید که هلیکس ها چگونه به صورت محکم در عمق متراکم شده و کانال را به گونه‌ای بسته‌اند که یون K^+ نمی‌تواند از آن عبور کند (فاصله بین هلیکس‌های S5 را با توجه به فلش‌های نشان داده شده زیر (a) و (b) مقایسه کنید). متصل‌کننده S4-S5 که در سیتوپلاسم قرار دارد، هلیکس S4 (نشان داده نشده) را به هلیکس S5 (قهوه‌ای) متصل می‌کند. برای وضوح، هلیکس‌های S1 تا S4 از مدل حذف شده‌اند، آن ها به طور طبیعی به انتهای متصل‌کننده S4-S5 می‌چسبند و از مولکول ها به عنوان «پدال‌های» حساس به ولتاژ بیرون می‌زنند. این پدال ها از نزدیک غشاء در پاسخ به دپلاریزاسیون به خارج آن حرکت می‌کنند. چون هر یک از این ها به یک متصل‌کننده S4-S5 چسبیده‌اند، هر متصل‌کننده و هلیکس S5 چسبیده به آن حرکت کرده، در عوض هلیکس‌های S6 حرکت می‌کنند که منفذ را باز می‌کند. ساختار کانال باز پستانداران (a) تعیین شده است. ساختار کانال بسته در (b) فرضی است، اما براساس مشاهدات، ساختار کانال پتاسیمی باکتریایی بسته است. (c) مدل توپ و زنجیره برای غیرفعال شدن کانال K^+ ولتاژی در تصویر برش خورده سه بعدی حالت غیرفعال. علاوه بر چهار زیرواحد α (برنزه و قهوه‌ای) که کانال را تشکیل می‌دهند، این پروتئین‌های کانالی، چهار زیرواحد تنظیمی β(ارغوانی) دارند. در انتهای N هر پروتئین زیرواحد β دُمین کوچکی هست (توپ» ارغوانی در انتهای «زنجیره» ارغوانی) که باز شدن منفذ مرکزی را کنترل می‌نماید. در این توصیف، انتهای N یک زیرواحد از پنجره جانبی حرکت کرده و منفذ را سد می‌کند.

هلیکس‌های S5 و S6 تشکیل شده است (شکل ۱۱a-۲۳). بیرون این ساختار مرکزی، چهار تا بازو یا «پدال‌ها» به محیط غشاء بیرون زده‌اند؛ این ها حسگرهای ولتاژی بوده و حداقل تماس را با منفذ دارند. اندازه‌گیری‌های الکتریکی حساس، نشان می‌دهند که باز شدن کانال K^+ یا Na^+ ولتاژی با حرکت ۱۴-۱۲ بارهای مثبت متصل به پروتئین از سطح سیتوزولی به اگزوپلاسمی غشاء همراه می‌شود. بخش متحرک پروتئین از هلیکس‌های S1-S4 تشکیل شده؛ S4 مسئول بیشتر بار مثبت است و بنابراین حسگر حساس به ولتاژ با یک لیزین یا آرژینین با بار مثبت در هر ۳ یا ۴ اسید آمینه است. آرژینین ها در S4 با حرکتی به اندازه ۱/۵nm به هنگام باز شدن کانال، حرکت

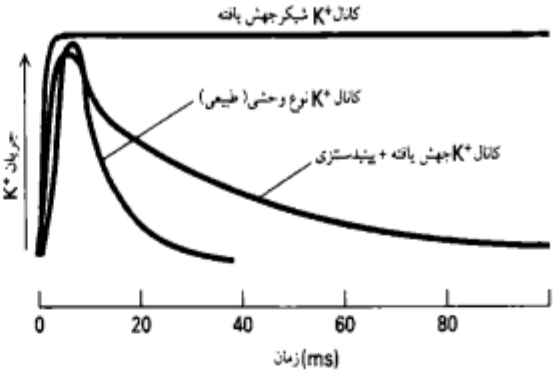
می‌کنند که با ضخامت ۵nm~ غشاء و قطر ۱/۲nm خود α-هلیکس مقایسه می‌شود. حرکت این بارهای دروازه‌ای (یا حسگرهای ولتاژی) تحت نیروی میدان الکتریکی، یک تغییر ساختاری را در پروتئینی که کانال را باز می‌کند، ایجاد می‌کند. بنابراین هلیکس S4 بخش کلیدی حسگر ولتاژی است که سپس هلیکس‌های S1-S4 را در عرض بیشتر غشاء حرکت می‌دهد. مهمترین جنبهٔ عجیب ساختارهای کانال حساس به ولتاژ حضور گروه‌های باردار مثل آرژینین در تماس با لیپیدهاست. مکان حسگر ولتاژی به توضیح آزمایشات قبلی کمک می‌کند که در آن‌ها یک کانال غیرحساس به ولتاژ با افزودن دُمین‌های حساس به ولتاژ به آن، به کانال حساس به ولتاژ تبدیل می‌شود. چنین آزمایشی اگر حسگرهای ولتاژی در عمق ساختار مرکزی قرار داشتند غیرعملی می‌نمود.

مطالعه کانال‌های K^+ با جهش Shaker از اهمیت هلیکس S4 در حساسیت به ولتاژ پشتیبانی می‌کند. وقتی یک یا بیش از یک اسید آمینه لیزین یا آرژینین در هلیکس S4 کانال K^+ Shaker با اسیدهای آمینه اسیدی یا خنثی جایگزین شدند، تعداد کمتری بار مثبت نسبت به حالت معمولی در پاسخ به دپلاریزاسیون غشاء در طول غشاء حرکت کردند که نشان دهندهٔ این است که اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین در هلیکس S4 در عرض غشاء حرکت می‌کنند. در مطالعات دیگر، پروتئین‌های Shaker جهش یافته که در آنها اسیدهای آمینهٔ مختلف S4 به سیستئین تبدیل شده‌اند برای واکنش‌پذیری با عوامل شیمیایی محلول در آب تغییر دهندهٔ سیستئین که قادر به عبور از غشاء نیستند، آزمایش شدند. بر این اساس که آیا سیستئین با عوامل افزوده شده به یک سمت یا سمت دیگر غشاء واکنش می‌دهد، نتایج نشان دادند که اسیدهای آمینه در حالت استراحت به انتهای C در هلیکس S4 سیتوزول نزدیک می‌شوند؛ پس از دپلاریزاسیون غشاء، برخی از این اسیدهای آمینه در معرض سطح اگزوپلاسمی کانال قرار می‌گیرند. این آزمایشات مستقیما حرکت هلیکس S4 را در عرض غشاء، همانطور که به صورت شماتیک در شکل ۷ـ۲۳ برای کانال‌های Na^+ ولتاژی نشان داده شده، نشان می‌دهند. ساختار فرم باز کانال K^+ از Shaker پستانداران با ساختار بسته یک کانال K^+ باکتریایی کریستالیزه مقایسه شد. نتایج نشان داد که برای بسته شدن کانال در پاسخ به حرکت حسگرهای ولتاژی از عرض غشاء مدلی وجود دارد (شکل b و ۱۱aـ۲۳). در این مدل، حسگرهای ولتاژی متشکل از S1-S4 در پاسخ به ولتاژ حرکت می‌کنند و گشتاوری روی هلیکس متصل‌کننده ایجاد می‌کنند که S4 را به S5 متصل می‌کند. در ساختار کانال باز، مکان متصل کنندهٔ S4 به S5 به هلیکس‌های S5 اجازه می‌دهد که در زاویه ۴۵° نسبت به صفحه غشاء قرار بگیرند (شکل ۱۱aـ۲۳، هلیکس‌های قهوه‌ای)، و درون منفذ دارای دهانهٔ ۱/۲nm است. وقتی سلول رپلاریزه می‌شود و حسگر ولتاژی به سمت سطح غشایی درون سلول حرکت می‌کند، اتصال دهنده‌های S4-S5 خم شده و به سمت درون سلول می‌روند. پس هلیکس‌های S5 به صورت عمود بر صفحه غشاء حرکت می‌کنند (شکل ۱۱bـ۲۳، هلیکس ها قهوه‌ای). این نقطه، هلیکس‌های S5 و S6 را در نقطه نزدیکتری ترک می‌کند و کانال را به زور می‌بندد. (شکل b و ۱۱aـ۲۳؛ پیکان‌ها دو سر نشان دهندهٔ فضای بین هلیکس‌های S5 مجاور هستند). بنابراین، احتمالاً دروازه از انتهاهای رو به سیتوزول هلیکس‌های S5 و S6 در ناحیه‌ای که منفذ بسیار تنگ می‌شود قرار می‌گیرد.

حرکت قطعهٔ غیرفعال کنندهٔ کانال در منفذ باز، جریان یون را مسدود می‌کند

یک ویژگی مهم بیشتر کانال‌های ولتاژی غیرفعال شدن است؛ یعنی بلافاصله بعد از باز شدن خودبخود بسته شده و کانال غیرفعال را شکل می‌دهند که تا وقتی که غشاء رپلاریزه نشود دوباره باز نمی‌شوند. در حالت استراحت، توپ‌های کروی با بار مثبت در انتهای N هر چهار زیرواحد در کانال K^+ ولتاژی در سیتوزول آزادند. چندین میلی ثانیه پس از اینکه کانال طی دپلاریزاسیون باز می‌شود، یک توپ از یک دهانه (پنجره جانبی) بین دو تا از زیرواحدها حرکت می‌کند و به حفره هیدروفوبی در مرکز منفذ، متصل شده و جریان یون‌های K^+ را مسدود می‌نماید (شکل ۱۱cـ۲۳). پس از چند میلی ثانیه، توپ از منفذ جابه جا شده و پروتئین به حالت استراحت باز می‌گردد. دُمین‌های زنجیره و توپ در کانال‌های K^+ از لحاظ عملکرد معادل قطعه غیرفعال‌کننده کانال در کانال‌های Na^+ می‌باشند.

نتایج تجربی در شکل ۱۲ـ۲۳ نشان می‌دهند که غیرفعال شدن کانال‌های K^+ به دُمین‌های توپ (کروی) بستگی دارد که پس از باز شدن کانال رخ می‌دهد و نیازی به اتصال کوالان دُمین‌های توپ به پروتئین کانال نیست. در آزمایشات دیگر، کانال‌های K^+ جهش یافته فاقد قسمت‌های زنجیره حدودا ۴۰ اسید آمینه‌ای که لوپ را به هلیکس S1 متصل می‌کند در اووسیت قورباغه بیان شد. اندازه‌گیری‌های تکه ـ نگهداری فعالیت کانال نشان داد که هرچه زنجیره کوتاه‌تر باشد، غیرفعال شدن سریع‌تر است چنانکه توپ متصل شده به زنجیره کوتاه‌تر می‌تواند زودتر در کانال باز وارد شود. برعکس، افزودن اسیدهای آمینه اتفاقی برای طولانی کردن زنجیره



▲ **شکل تجربی ۱۲ـ۲۳ (شکل رنگی) آزمایشات با یک کانال K^+ جهش یافته فاقد دُمین‌های کروی انتهای N از مدل غیرفعال شدن زنجیره و کره پشتیبانی می‌نمایند.** کانال Shaker K^+ نوع وحشی و یک نوع جهش یافته فاقد اسیدهای آمینه تشکیل دهنده انتهای آمینی در اووسیت قورباغه بیان شدند. سپس فعالیت کانال ها با تکنیک تکه ـ نگهداری اندازه‌گیری شد. وقتی توده ها از ۰ـ به ۳۰mV+ دپلاریزه شدند، کانال نوع وحشی برای حدودا ۵ ثانیه باز شد و سپس بسته شد (منحنی قرمز). کانال جهش یافته به طور طبیعی باز شد، ولی دوباره بسته نشد (منحنی سبز). وقتی پپتید توبی سنتز شده به روشهای شیمیایی به سمت سیتوزولی توده افزوده شد، کانال جهش یافته به صورت نرمال باز شده و سپس بسته شد (منحنی آبی). این امر نشان می‌دهد که پپتید افزوده شده کانال را پس از اینکه باز شد غیرفعال می‌نماید و اینکه توپ نباید به پروتئین بچسبد تا باعث عملکردی شدن آن گردد.

معمولی غیرفعال شدن کانال را کُند می‌کند.

قطعه غیرفعال کنندهٔ کانال در کانال‌های Na^+ ولتاژی دارای موتیف حفظ شده آبگریزی است که از ایزولوسین، فنیل آلانین، متیونین و ترئونین تشکیل شده است (شکل ۱۰b ـ۲۳ را ملاحظه کنید). همانند دُمین کانال‌های K^+ زنجیره و توپ طولانی‌تر در کانال‌های K^+، این قطعه به داخل منفذ عبوردهنده Na^+ تا می‌خورد و آن را تا زمانی که غشاء دپلاریزه شود مسدود می‌نماید (شکل ۷ـ۲۳ را ملاحظه کنید).

میلینه شدن سرعت انتقال تحریک را افزایش می‌دهد

همانطور که دیدیم پتانسیل‌های عمل می‌توانند به سمت پایین یک آکسون با سرعتی به اندازه یک متر در ثانیه حرکت کنند. ولی حتی چنین سرعتی برای اجازه حرکات پیچیده جانوران کم است. در انسان، اجسام سلولی نورون‌های حرکتی که ماهیچه پا را عصبدهی می‌دهند در نخاع شوکی قرار دارند و آکسون ها حدوداً یک متر طول دارند. اگر یک ثانیه طول بکشد که پتانسیل عمل از نخاع شوکی به آکسون یک نورون حرکتی و از آن به ماهیچه پا منتقل شود، انقباضات هماهنگ ماهیچه که برای راه رفتن، دویدن و حرکات مشابه لازم است غیرممکن می‌شود. راه‌حل، پیچاندن سلول ها در عایقی است که سرعت حرکت پتانسیل عمل را افزایش دهد. این عایق، **غلاف میلین** نام دارد (شکل ۲b ـ۲۳). وجود غلاف میلین دور یک آکسون سرعت انتقال تحریک را از ۱۰ به ۱۰۰ متر در ثانیه افزایش می‌دهد. در نتیجه، در یک نورون حرکتی انسان، یک پتانسیل عمل آکسونی با طول ۱ متر را طی کرده و باعث تحریک انقباض ماهیچه در کمتر از ۰/۰۱ ثانیه می‌شود.

در نورون‌های غیرمیلینه، سرعت انتقال یک پتانسیل عمل متناسب با قطر آکسون است زیرا یک آکسون ضخیم تعداد بیشتری یون دارد که منتشر می‌شوند. مغز انسان پر از نورون‌های میلینه نسبتاً کوچک است. اگر نورون‌های مغز انسان میلینه نبودند، قطر آکسونی آن باید ۱۰۰۰۰ بار افزایش می‌یافت تا سرعتی به اندازه نورون‌های میلینه داشته باشند. پس مغز مهره داران با نورون‌های بسیار متراکمشان، بدون میلین هرگز نمی‌توانست تکامل یابد.

پتانسیل‌های عمل در آکسون‌های میلینه از یک گره به گره دیگر «می‌پرند»

غلاف میلین که آکسون را احاطه نموده، از سلول‌های گلیای زیادی تشکیل شده است. هر ناحیه از میلین که با یک سلول گلیا تشکیل شده از ناحیه دیگر توسط یک ناحیه غیرمیلینه با غشاء آکسونی حدود ۱μm طول به نام گره رانویه (یا ساده‌تر، گره؛ شکل ۲ـ۲۳ را ملاحظه کنید) جدا شده است. غشاء آکسونی در ارتباط مستقیم با مایع خارج سلولی است که در گره ها یافت می‌شوند. به هرحال، همه کانال‌های سدیمی ولتاژی و همه پمپ‌های Na^+/K^+ که شیب یونی را در آکسون حفظ می‌کنند در گره قرار دارند.

در نتیجه این جابه جایی، حرکت یون‌های Na^+ به سمت داخل که پتانسیل عمل را تولید می‌کند فقط در گره‌های آزاد از میلین رخ می‌دهد (شکل ۱۳ـ۲۳). یون‌های مثبت سیتوزولی اضافه که در گره طی دپلاریزاسیون غشاء تولید شده‌اند با انتشار ساده از سیتوزول آکسونی به گره بعدی با از بین رفتن و تضعیف کم، منتقل می‌شوند زیرا از غشاء آکسونی میلینه نمی‌توانند عبور نمایند. این امر باعث انتشار سریع دپلاریزاسیون از یک گره به گره بعدی است که اجازه می‌دهد پتانسیل عمل در اثر آن از یک گره به گرهٔ بعدی بپرد. این

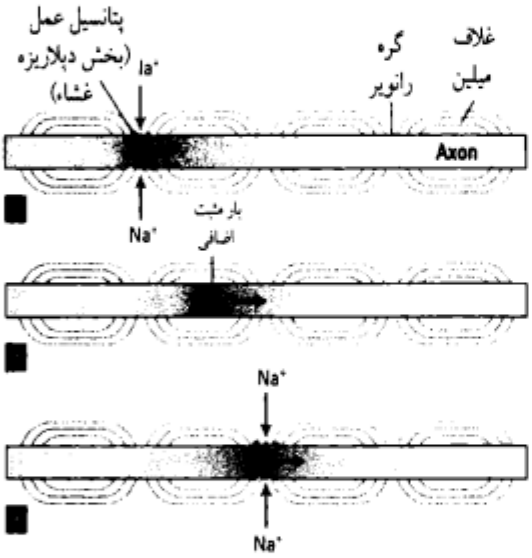
انتقال، انتقال رقصی[1] نام دارد. این پدیده علت برابری سرعت انتقال نورون‌های میلینه را با نورون‌های نقطه ضخیم‌تر غیرمیلینه توضیح می‌دهد. مثلاً، آکسون میلینه یک مهره‌دار با قطر ۱۲μm و آکسون غیرمیلینه اسکوئید به قطر ۶۰۰μm هر دو تحریکات را با سرعت ۱۲m/s منتقل می‌کنند.

گلیا غلاف‌های میلین و سیناپس ها را تولید می‌نماید

از چهار نوع گلیا (که سه تای آن ها در شکل ۱۴ـ۲۳ نشان داده شده‌اند)، دو تایشان غلاف‌های میلین را تولید می‌نمایند: الیگودندروسیت ها غلاف‌های میلین را برای سیستم عصبی مرکزی (CNS) تولید می‌نماید، سلول‌های شوآن هم آن ها را برای سیستم عصبی محیطی می‌سازند. آستروسیت‌ها، یعنی نوع سوم، برای نورون ها لازمند تا سیناپس ها را تولید نمایند و از آن ها برای برقراری ارتباط با نورون‌های دیگر استفاده می‌نمایند. نوع چهارم، میکروگلیا، فاکتورهای بقایی برای سلول ها تولید می‌کنند و عملکردهای ایمنی را به عهده دارند. این سلول ها در پاسخ‌های التهابی شرکت می‌کنند و بخشی از سیستم ایمنی CNS را تشکیل می‌دهند. آن ها می‌توانند به سلول‌های فاگوسیتی با ویژگی‌های ماکروفاژی تمایز یابند (فصل ۲۴). میکروگلیا در مغز استخوان تشکیل می‌شوند و از لحاظ دودمان ارتباطی با نورون ها و سلول‌های دیگر گلیا ندارند و بیش از این در موردشان بحث نخواهیم نمود.

الیگودندروسیت‌ها: الیگودندروسیت ها از غلاف میلین مارپیچ دور آکسون‌های سیستم عصبی مرکزی تشکیل شده‌اند (شکل ۱۴c ـ۲۳). هر الیگودندروسیت غلاف‌های میلینی با چندین نورون تولید می‌کند. اجزای پروتئینی اصلی، پروتئینی اساسی میلین (MBP) و پروتئین پروتئولیپیدی[2] (PLP) هستند. MPB یک پروتئین سطحی غشاء است که هم در CNS و هم در PNS یافت می‌شود و هفت نوع RNA پردازش شده دارد که اشکال مختلف پروتئین را رمز می‌نمایند و توسط ریبوزوم‌هایی سنتز می‌شود که در غلاف میلین در حال رشد قرار دارند (شکل ۱۴c ـ۲۳) که مثالی از انتقال ویژه mRNA ها به ناحیه سطحی سلول است. جابه جایی mRNAی MBP به میکروتوبول ها بستگی دارد.

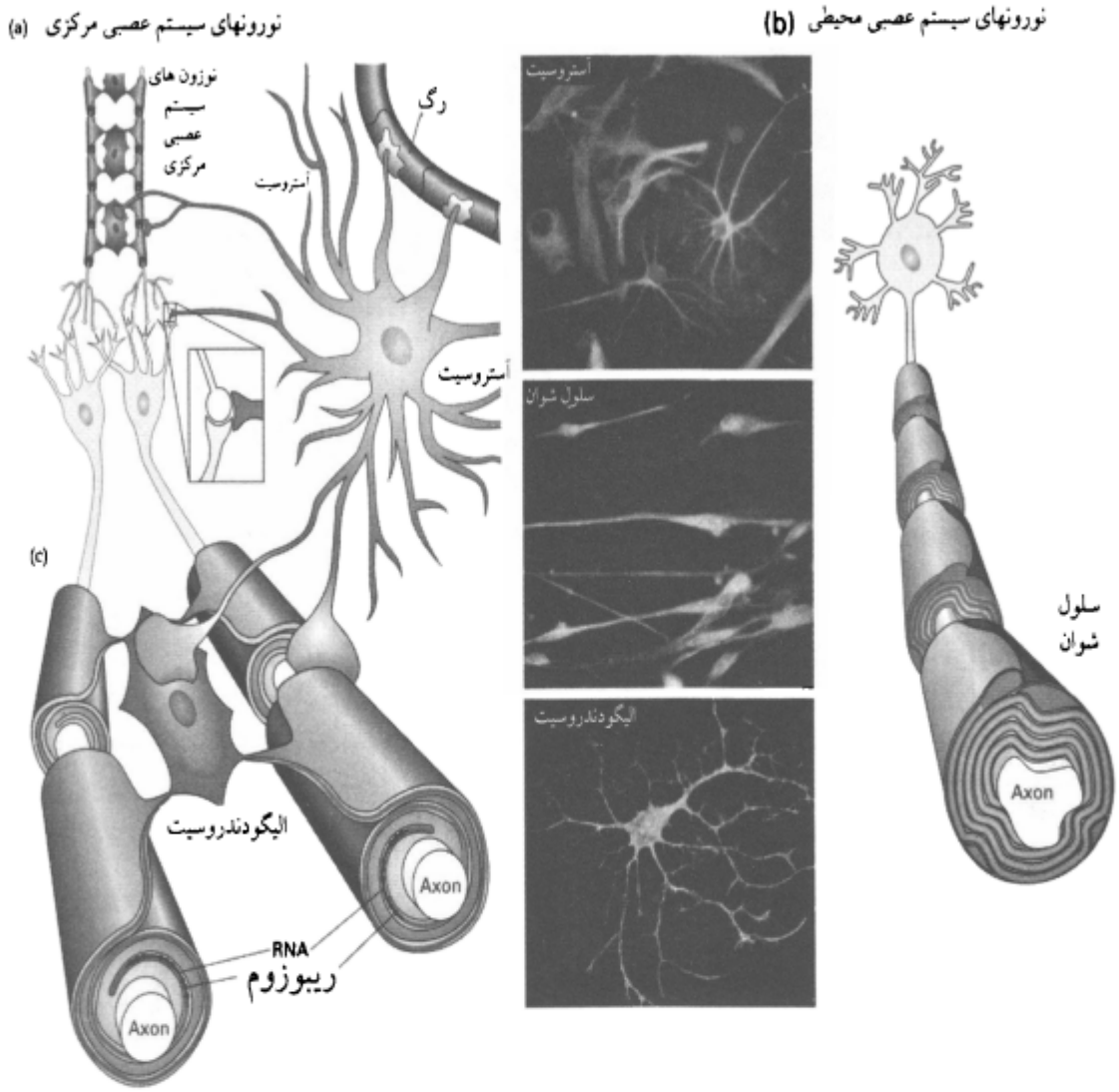
تخریب پروتئین‌های تولیدکننده الیگودندروسیت ها عامل بیماری رایج عصبی در انسان به نام اسکلروز متعدد[3] (MS) است. معمولاً MS با گرفتگی یا ضعف در یک یا چند عضو، عدم کارکرد مثانه، از دست رفتن حس برخی نواحی و مشکلات بینایی شناسایی می‌شود. علت این اختلال (پروتوتیپ بیماری فقدان میلین) رفتن میلین در نواحی از مغز شوکی است. در بیماران مبتلا به MS، انتقال پتانسیل‌های عمل توسط سلول‌های فاقد میلین، کند است. در نتیجه غلظت آن ها در نواحی گره کاهش می‌یابد. علت این بیماری شناخته نشده، ولی به نظر می‌رسد شامل تولید اتوآنتی‌بادی‌هایی باشد که در بدن تولید می‌شوند (آنتی‌بادی‌هایی که به پروتئین‌های بدن متصل می‌شوند) و با MBP واکنش می‌دهند یا ترشح پروتئازهایی باشد که پروتئین‌های میلین را تخریب می‌کنند. یک جهش یافته موش بنام Shiverer، جهشی در قسمت زیادی از ژن MBP دارد که منجر به رعشه، تشنج و مرگ زودرس می‌شود. جهش‌های مشابه در انسان (بیماری Pelizaeus-merzbacher) و موش (jimpy) در ژن رمزکننده پروتئین‌های مهم دیگری چون میلین CNS، بنام PLP، باعث از دست رفتن الگودندروسیت ها و تولید ناکافی میلین می‌شوند.



▲ **شکل ۱۳ـ۲۳ انتقال پتانسیل عمل در آکسون‌های میلینه.** چون کانال‌های Na^+ ولتاژی در غشاء آکسونی گره رانویه قرار دارند، جریان رو به داخل یون‌های Na^+ همراه با پتانسیل عمل فقط در گره ها رخ می‌دهد. وقتی یک پتانسیل عمل در یک گره تولید می‌شود (مرحله ❶) یون‌های مثبت بیشتری در سیتوزول تولید می‌شوند که نمی‌توانند از غلاف میلین به سمت خارج بروند، و سریعاً به پایین دست آکسون انتشار می‌یابند و در گره بعدی باعث دپلاریزاسیون می‌شوند (مرحله ❷) که موجب القای پتانسیل عمل در آن گره (مرحله ❸) می‌شوند. طی این مکانیزم، پتانسیل عمل از یک گره به گره بعدی در طول آکسون می‌پرد.

1- Salfatory conduction

2- Proteolipid protein 3- Multiples sclerosis

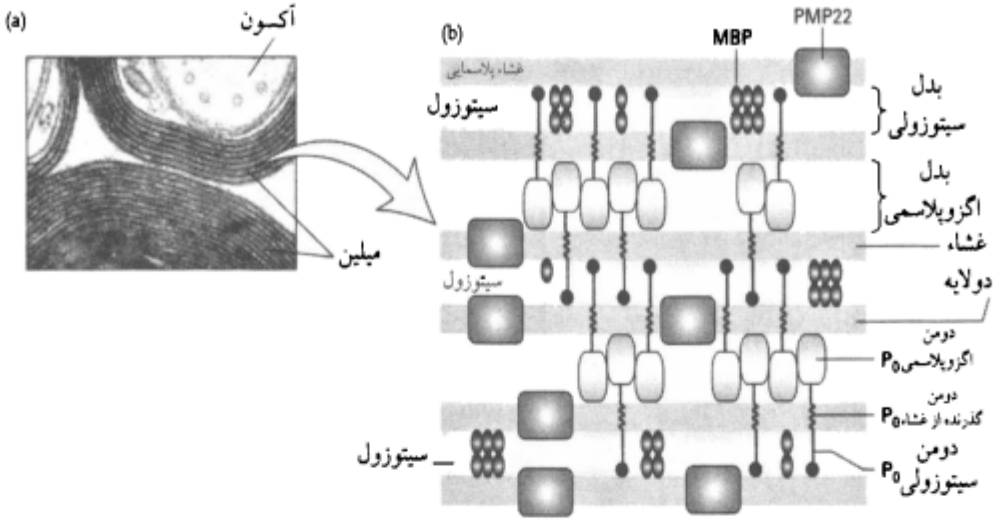


▲ **شکل ۱۴ـ۲۳ سه نوع سلول‌های گلیا.** (a) آستروسیت ها با نورون ها برمیانکنش می‌کنند ولی آن ها را عایق نمی‌کنند. (b) هر سلول شوآن بخشی از آکسون سیستم عصبی محیطی منفرد را عایق می‌کند. (c) یک الیگودندرویست می‌تواند چندین آکسون CNS را میلینه نماید.

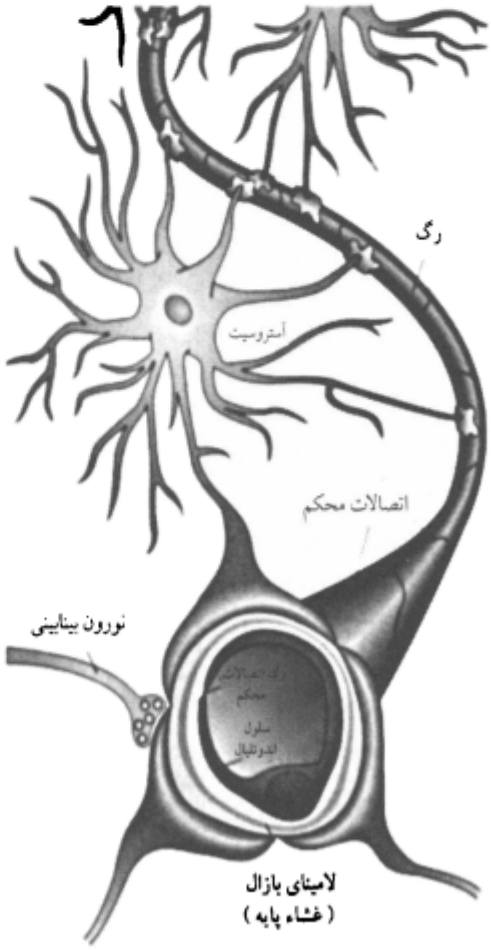
سلول‌های شوآن: سلول‌های شوآن غلاف‌های میلین را در اعصاب محیطی تشکیل می‌دهند. غلاف میلین سلول شوآن یک پوشش مارپیچ قابل توجه دارد (شکل ۱۴b ـ۲۳ را ملاحظه کنید). یک آکسون بلندمی‌تواند تا چند صد سلول شوآن در طول خود داشته باشد، که هر یک فاصله بین هر گره را به اندازه طول ۱-۱/۵μm از آکسون، عایق‌سازی می‌کنند. همه آکسون ها میلینه نیستند، ولی علتش معلوم نیست. جهش‌هایی در موش ها که سلول‌های شوآن را حذف می‌نمایند موجب مرگ بیشتر سلول ها می‌شوند.

برخلاف الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های شوآن خودشان را وقف یک آکسون می‌کنند. غلاف ها از ۷۰ درصد لیپید (غنی از کلسترول) و ۳۰ درصد پروتئین تشکیل شده است. در سیستم عصبی محیطی اصلی‌ترین اجزاء پروتئینی (حدود ۸۰ درصد) میلین بنام پروتئین صفر (P0)، یک پروتئین غشایی است که دُمین‌های ایمنوگلوبینی دارد (Ig). MBP نیز اجزای فراوانی دارد. دُمین‌های Ig خارج سلولی سطوح پوشش‌های متوالی را در اطراف آکسون به یکدیگر می‌چسبانند تا غلاف میلین مارپیچ را متراکم سازد (شکل ۱۵b ـ۲۳). پروتئین‌های دیگر چنین نقشی را در CNS بازی می‌کنند.

در انسان‌ها، میلین محیطی مثل میلین CNS، هدف بیماری اتوایمنی است که در آن آنتی بادی‌هایی علیه P0 تشکیل می‌شود. سندرم Guillain-Barr (GBS)، یا همان



▲ **شکل ۱۵-۲۳ تشکیل و ساختار یک غلاف میلین در سیستم عصبی محیطی.** (a) در بزرگنمایی بالا، غشاء میلین مارپیچ تخصص یافته (My) به صورت دسته‌ای از لایه‌ها، غشایی از جنس دو لایه فسفولیپیدی که دور آکسون (Ax) پیچیده است، ظاهر می‌شود؛ Mit= میتوکندری. (b) تصویری از سه لایه‌های مارپیچ غشاء میلین. دو نوع فراوان پروتئین‌های میلین محیطی، P۰ و PMP22، فقط در سلول‌های شوآن تولید می‌شوند. دُمین اگزوپلاسمی پروتئین P0، که یک تاخوردگی ایمنوگلوبینی دارد با دُمین‌های مشابهی که از پروتئین‌های P۰ در سطح غشایی مخالف بیرون می‌آیند همراه می‌شود، در نتیجه سطوح غشایی اگزوپلاسمی در تقابل نزدیک با هم «زیپ می‌شوند». این برهمکنش‌ها، با اتصال یک اسید آمینه تریپتوفان در نوک دُمین اگزوپلاسمی به لیپید ها در غشای مخالف مستحکم می‌شوند. تقابل نزدیک سطوح سیتوزولی غشاء از اتصال دم سیتوزولی هر پروتئین P۰ به فسفولیپید ها در غشای مخالف حاصل می‌شود. ممکن است PMP22 موجب تراکم غشا نیز بشود. پروتئین بازی میلین (MBP)، که یک پروتئین سیتوزولی است بین غشاهای بسیار نزدیک بهم قرار می‌گیرد در حینی که سیتوزول به بیرون رانده می‌شود.



▶ **شکل ۱۶-۲۳ (شکل رنگی) آستروسیت ها با سلول‌های اندوتلیال در سد خونی - مغزی برهمکنش می‌نمایند.** هدف سد خونی مغزی کنترل اینست که چه نوعی از مولکول ها می‌تواند از جریان خون در مغز به خارج و داخل مهاجرت نماید. تشکیل این سد با سلول‌های اندوتلیال که دیواره‌های عروق خونی وارد شونده به مغز را می‌سازند با آستروسیت‌های محیطی احاطه‌کننده کنترل می‌شود. مویرگ‌های مغز توسط سلول‌های اندوتلیال با اتصالات محکمی که به بیشتر مولکول ها نفوذناپذیرند، تشکیل می‌شوند. انتقال بین سلول ها مسدود می‌شود، در نتیجه فقط مولکول‌های کوچکی می‌توانند انتشار یابند یا موادی ویژه‌ای می‌توانند به صورت اختصاصی عبور داده شوند. سلول‌های اندوتلیال ناقل‌ها، ویژگی‌های نفوذپذیری دارند که به اکسیژن و Co_2 اجازه عبور می‌دهند، ولی به صورت انتخابی مانع از عبور مواد دیگر می‌شوند. آستروسیت‌هایی که عروق خونی را احاطه می‌کنند (در ارتباط با سلول‌های اندوتلیال) پیام‌های پروتئینی ترشح شده را می‌فرستند تا سلول‌های اندوتلیال را برای تولید سدّ انتخابی القاء کنند. مولکول‌های حلال در لیپید با وجودی که انتقال ضعیفی در خون دارند بیشترین شانس عبور را دارند، مگر اینکه حامل ویژه‌ای نقش بازی کند. الکترولیت‌هایی مثل Na^+ و Cl^- با کانال‌های ویژه و پروتئین‌های ناقل عبور می‌نمایند. سلول‌های اندوتلیال مغز انتقال وزیکولی کمتری نسبت به بیشتر سلول‌های اندوتلیال دارند که علت آن را انتخابی‌تر بودن انتقال فرض می‌نمایند. سلول‌های اندوتلیال (burgandy) با لایه‌ای از لامینای بازال (نارنجی) غلاف شده‌اند و از طریق زایده‌های آستروسیت با سطح بیرونی تماس یافته‌اند. پریسیت‌ها سلول‌های مرانشیمی‌اند که از مویرگ‌ها پشتیبانی می‌نمایند.

پلی‌نوروپاتی فقدان میلین التهابی حاد[1] از این نوع بیماری هاست. GBS معمول‌ترین علت فلج پیش رونده است که با فراوانی 10^{-5} رخ می‌دهند. علت آن شناخته نشده است. اختلال موروثی معمولی به نام بیماری کارکوت ـ ماری ـ توس[2] که عملکرد اعصاب حرکتی و حسی محیطی را تخریب می‌کند به خاطر بیان بالای ژنی است که پروتئین PMP22 را که از اجزای دیگر میلین اعصاب محیطی است تولید می‌کند.

میانکنش‌های بین گلیا و نورون ها جایگیری و جایگزینی غلاف‌های میلین و تجمع دستگاه انتقال عصبی در گره‌های رانویه را کنترل می‌نماید. مثلاً کانال‌های Na^+ ولتاژی و پمپ‌های Na^+/K^+ در گره‌های رانویه با میانکنش‌هایی که با اسکلت سلولی دارند تجمع می‌یابند. در حالی که همه جزئیات فرایند تجمع گره‌ای درک نشده است ولی تعدادی از بازیگران آن تعیین شده‌اند. در PNS که این فرایند مطالعه شده است، مولکول‌های چسباننده سطحی در غشاء سلول شوآن با مولکول‌های چسباننده نورون برهمکنش می‌نمایند. مولکول چسباننده سلولی ایمنوگلوبین غشای گلیال (IgCAM) بنام نوروفاسین ۱۵۵[3] با دو پروتئین آکسونی بنام‌های کانتکتین[4] و پروتئین همراه کانتکتین[5] در لبه گره برهمکنش می‌نماید. این اتصال سلول - سلول محدوده‌هایی در هر طرف گره ایجاد می‌کند.

پروتئین‌های کانالی و مولکول‌های دیگری که در گره تجمع می‌یابند ابتدا از آکسون ها پراکنده می‌شوند. پروتئین‌های آکسونی، شامل دو تا IgCAM بنام‌های NrCAM و نوروفاسین ۱۸۶، همانند آنکیرین G (فصل ۱۷) درون گره تجمع می‌یابند. دو تا IgCAM به پروتئین دُمین گذرنده از غشای منفرد بنام گلیومدین[6] که در سلول‌های گلیا بیان می‌شود متصل می‌شوند. آزمایشاتی که تولید گلیومدین را مانع می‌شوند، نشان داد که گره ها بدون آن تشکیل نمی‌شوند. پس این پروتئین یک تنظیم‌کننده کلیدی است. آنکیرین در گره ها به اسپکترین βIV که جزء اصلی اسکلت سلولی است متصل می‌شود، در نتیجه کمپلکس پروتئینی گره را به اسکلت سلولی می‌بندد. کانال‌های Na^+ با نوروفاسین ۱۸۶، NrCAM و آنکیرین G همراه شده و کانال را در جایی که لازم است محکم نگه می‌دارند. پس این برهمکنش‌های چندین پروتئین با هم، غلظت کانال‌های Na^+ را در غشاء گره‌ای آکسون های میلینه ۱۰۰ برابر نسبت به غشاء آکسونی نورون‌های غیرمیلینه افزایش می‌دهند.

آستروسیت‌ها. نوع سوم سلول‌های گلیا آستروسیت است که به خاطر شکل ستاره‌ای آن، به این نام خوانده می‌شود (شکل ۱۴a-۲۳). این سلول‌ها بیش از یک سوم توده مغزی و نصف سلول‌های مغزی را تشکیل می‌دهند. آستروسیت‌ها دو نوع هستند. آستروسیت‌های رشته‌ای در ماده سفیدند (ناحیه‌ای که بیشتر از آکسون ها تشکیل شده، میلین باعث سفید دیده شدن آن می‌شود) و آستروسیت‌های پروتوپلاسمی که در مادهٔ خاکستری (ناحیهٔ غنی از اجسام سلولی) دیده می‌شوند. آستروسیت‌ها زواید باریک درازی می‌سازند که همه عروق خونی مغز را می‌پوشاند.

آستروسیت ها تنظیم‌کننده‌های اساسی تشکیل سدخونی - مغزی‌اند. توده‌ای از عروق خونی در مغز اکسیژن را تأمین نموده و Co_2 را خارج کرده و گلوکز و اسیدهای آمینه را از طریق مویرگ‌هایی که چند میکرومتر از هر سلول فاصله دارند به سلول ها می‌رسانند. این مویرگ ها سدخونی - مغزی را تشکیل می‌دهند که مثلاً مانع ورود نوروترانسمیترهای موجود در خون و برخی دارو ها به مغز می‌شوند. سد تشکیل شده از مجموعه‌ای از اتصالات محکم (فصل ۱۹) که توسط سلول‌های اندوتلیال که دیواره مویرگ ها را تشکیل می‌دهند ساخته شده‌اند. آستروسیت‌ها تخصصی شدن این سلول‌های اندوتلیال را کنترل نموده و نفوذپذیری آن ها را کاهش می‌دهند (شکل ۱۶-۲۳).

همچنین خیلی از سیناپس ها و دندریت ها با زواید آستروسیت احاطه شده‌اند. آستروسیت ها پروتئین‌های فراوان ماتریکس خارج سلولی را تولید می‌کنند که بعضی از آن ها به عنوان کلید راهنمای نورون‌های مهاجر استفاده می‌شوند و میزبان فاکتورهای رشدی‌اند که انواع اطلاعات را به نورون ها منتقل می‌نمایند. کانال‌های Ca^{2+}، K^+، Na^+ و Cl^-، از این بین، در غشاهای پلاسمایی آستروسیت ها روی غلظت یون‌های آزاد در فضای خارج سلولی اثر می‌گذارند. بنابراین خود آستروسیت‌ها روی پتانسیل عمل نورون‌ها اثر می‌گذارند. همچنین آستروسیت ها گلوتامات را نوروترانسمیتر در فضاهای خارج سلولی) برداشته و آن را به گلوتامین تبدیل می‌نمایند. وقتی نورون‌های همسایه فعالیت خود را آغاز می‌نمایند، گلوتامات به گیرنده گلوتامات روی آستروسیت متصل شده و آستروسیت ها را قادر به درک وقایع می‌نماید. آستروسیت ها توسط اتصالات منفذدار[7] به یکدیگر متصل می‌شوند، در نتیجه تغییرات ترکیب یونی در هر یک از آن ها در

1- Acute inflamatory demyelinating polyneuopathy

2- Charcot-Marie-Tooth

3- Neurofascin155 4- Contactin

5- Contactin associated protein

6- Gliomedin 7- Gap junctions

فواصلی در حد صدها میکرون با بقیه ارتباط برقرار می‌نمایند.

نکات کلیدی بخش ۲-۲۳

کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ و پتانسیل‌های عمل در سلول‌های عصبی

■ پتانسیل‌های عمل دپلاریزاسیون‌های ناگهانی غشاء هستند که با رپلاریزاسیون سریع دنبال می‌شوند. آنها در یک قسمت از آکسون روی داده و در طول آن حرکت کرده و به انتهای آکسون می‌رسند که در آنجا ایمپالس‌های الکتریکی توسط سیناپس به سایر سلول‌ها انتقال داده می‌شود (اشکال ۳ـ۲۳ و ۶ـ۲۳ را ملاحظه کنید).

■ پتانسیل عمل در نتیجهٔ باز و بسته شدن‌های متوالی کانال‌های Na^+ و K^+ دریچه‌دار وابسته به ولتاژ در غشای پلاسمایی نورون‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای می‌باشد (شکل ۹-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ بازشدن کانال Na^+ دریچه‌دار وابسته به ولتاژ باعث ورود Na^+ به داخل سلول در عرض ۱ms می‌گردد که به نوبه خود باعث دپلاریزاسیون ناگهانی قسمتی از غشاء می‌شود. سپس کانالها بسته شده و به مدت میلی ثانیه نمی‌توانند باز شوند و در نتیجه از ورود Na^+ بیشتر جلوگیری می‌شود (شکل ۷-۲۳ را ملاحظه کنید)

■ به محض اینکه پتانسیل عمل به اوج (پیک) می‌رسد بازشدن کانالهای K^+ دریچه دار وابسته به ولتاژ باعث خروج یون‌های K^+ می‌گردد که باعث رپلاریزاسیون و سپس هیپرپلاریزاسیون غشاء می‌گردد. به محض اینکه این کانال‌ها بسته شوند، غشاء به حالت پتانسیل استراحت برمی گردد. (شکل ۳-۲۳ راملاحظه کنید).

■ کاتیونهای سیتوزولی اضافی که به هنگام پتانسیل عمل در یک نقطه از آکسون تولید می‌شود در قسمتهای مجاور نیز پخش شده و باعث بازشدن کانال‌های N^+ دریچه‌دار وابسته به ولتاژ شده و در نتیجه پتانسیل عمل در طول آکسون حرکت می‌کند.

■ به علت دورهٔ برگشت مطلق کانال‌های Na^+ دریچه‌دار وابسته به ولتاژ و هیپرپلاریزاسیون مختصر ناشی از خروج یونهای K^+، پتانسیل عمل معمولاً فقط در یک جهت و آن هم به سمت انتهای آکسون روی می‌دهد.

■ کانالهای Na^+ و Ca^{+2} دریچه‌دار وابسته به ولتاژ پروتئین‌های مونومری حاوی چهار دمین هستند که از لحاظ ساختاری و عملکردی شبیه هر کدام از زیرواحدهای تترامری کانالهای K^+ وابسته به ولتاژ می‌باشند.

■ هر دُمین یا زیرواحد در کانالهای کاتیونی دریچه دار وابسته به ولتاژهای حاوی شش α - هلیکس گذار غشایی و یک بخش غیر مارپیچ بنام P هستند که منفذ انتخاب یون را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۰-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ بازشدن کانالهای دریچه دار وابسته به ولتاژ به علت حرکت بارهای مثبت مربوط به مارپیچ S4 به سمت قسمت خارج سلولی غشا در پاسخ به دپلاریزاسیون کافی می‌باشد.

■ بسته‌شدن و غیرفعال شدن کانالهای دریچه‌دار وابسته به ولتاژ به علت حرکت بخش سیتوزولی به سمت منفذ باز می‌باشد (شکل ۱۱۰-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ میلین‌دار شدن که سرعت هدایت ایمپالس را صد برابر افزایش می‌دهد نیز باعث بسته شدن نورون‌ها در مغز مهره‌داران می‌شود.

■ در نورون‌های میلین‌دار تعداد کانالهای Na^+ دریچه‌دار وابسته به ولتاژ در محل گرههای رانویه زیاد شده است. دپلاریزاسیون در یک گره بدون توجه به سایر گره‌ها به سرعت گسترش می‌یابد بنابراین پتانسیل عمل از یک گره به گره بعدی می‌پرد (شکل ۱۳-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ صفحات میلین توسط سلول‌های گلیا تولید می‌شود که در اطراف نورون‌ها قرار گرفته‌اند. الیگودند روسیت‌ها و سلول‌های شوان به ترتیب میلین را برای CNS و PNS تولید می‌کنند (شکل ۱۴-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ آستروسیت‌ها، نوع سوم از سلول‌های گلیا، در اطراف سیناپس‌ها و رگهای خونی قرار گرفته‌اند. آستروسیتها پروتئین‌هایی را ترشح می‌کنند که باعث تحریک تشکیل سیناپس شده و همچنین باعث تحریک سلول‌های آندوتلیال عروق خونی برای تولید سد خونی مغزی می‌شود که جریان ترانس اپیتلیالی مواد را محدود می‌کند (شکل ۱۶-۲۳ را ملاحظه کنید).

۳ـ۲۳ ارتباطات در سیناپس‌ها

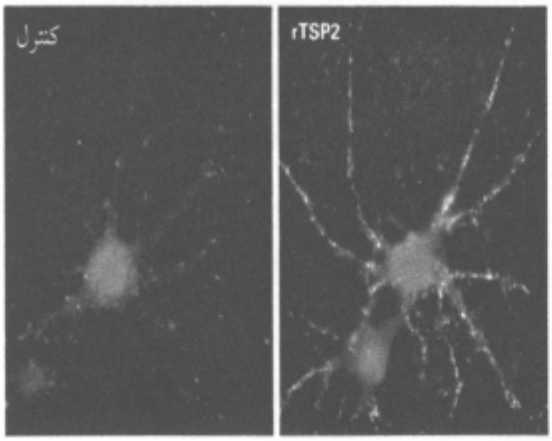
همانطور که بحث کرده‌ایم، پالس‌های الکتریکی پیام ها را در طول نورون ها انتقال می‌دهند ولی پیام ها بین نورون ها و سلول‌های تحریک‌پذیر دیگر با پیام‌های شیمیایی منتقل می‌شوند. سیناپس ها اتصالاتی‌اند که نورون‌های پیش سیناپسی در آن این پیام‌های شیمیایی یا نوروترانسمیترها را رها می‌کنند که روی سلول‌های هدف

پس سیناپسی عمل می‌نمایند (شکل ۴-۲۳). این سلول هدف می‌تواند یک نورون دیگر یا یک سلول ماهیچه‌ای یا غده‌ای باشد. نوروترانسمیترها (انتقال دهنده‌های عصبی) مولکول‌های کوچک و محلول در آب (مثل استیل‌کولین، دوپامین) هستند. ارتباط سلول به سلول در سیناپس‌های شیمیایی در یک جهت حرکت می‌کند: از سلول پیش سیناپسی به طرف سلول پس‌سیناپسی. دریافت پتانسیل عمل در انتهای یک آکسون منجر به باز شدن کانال‌های Ca^{2+} سیتوزولی در انتهای آکسون می‌شود. افزایش Ca^{2+} موجب اتصال وزیکول‌های کوچک (۴۰-۵۰nm) سیناپسی حاوی نوروترانسیمترها به غشای پلاسمایی و رهایش نوروترانسمیترها از این سلول‌های پیش سیناپسی به شکاف سیناپسی می‌شود. غشای سلول پس سیناپسی در فاصله ۵۰nm از غشای پیش سیناپسی قرار دارد.

گیرنده‌های نوروترانسمیتر دو دسته خیلی بزرگ هستند: کانال‌های یونی دریچه‌دار لیگاندی که با اتصال نوروترانسمیتر و گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G، بلافاصله باز می‌شوند. اتصال نوروترانسمیتر به گیرنده جفت شونده با پروتئین G، باز یا بسته شدن پروتئین کانال یونی را به صورت جداگانه در دوره‌ای از زمان از ثانیه تا دقیقه موجب می‌شود. این گیرنده‌های «کند» نوروترانسمیترها در فصل ۱۵ با گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G که به انواع مختلف لیگاند ها متصل می‌شوند و علاوه بر کانال‌های یونی فعالیت پروتئین‌های سیتوزولی را تنظیم می‌نمایند بحث شده‌اند. در اینجا ساختار و عملکرد گیرنده نیکوتینی استیل‌کولین را که در خیلی از سیناپس‌های ماهیچه ای - عصبی یافت می‌شود بررسی می‌کنیم. این گیرنده اولین کانال یونی دریچه‌دار لیگاندی بود که خالص‌سازی، کلون و در سطح مولکولی تعیین ویژگی شد و نمونه‌ای برای کانال‌های یونی دریچه‌دار دیگر است.

مدت زمان پیام نوروترانسمیتر به میزان نوروترانسمیتر رها شده از سلول پیش سیناپسی بستگی دارد که این خود به میزان انتقال دهنده‌ای ذخیره شده و عمل دریافت شده در سیناپس وابسته است. مدت زمان پیام، همچنین به سرعت بازیافت نوروترانسمیتر باقی مانده بوسیلهٔ سلول پیش سیناپسی بستگی دارد. غشاهای سلول‌های پیش سیناپسی همانند گلیا، دارای پروتئین‌های ناقلی است که نوروترانسمیترها را از خلال غشای پلاسمایی به درون سلول پمپ می‌کنند، پس غلظت خارج سلولی نوروترانسمیتر را پایین نگاه می‌دارند.

در اینجا ابتدا ما روی چگونگی تشکیل سیناپس ها و چگونگی کنترل ترشح تنظیم شده نوروترانسمیترها به عنوان اصل



▲ **شکل ۱۷-۲۳ (شکل رنگی) پیام‌های آستروسیت نشان داده شده که تشکیل سیناپس را القا می‌نمایند.** رنگ‌آمیزی ایمنی پروتئین پیش سیناپسی سیناپتوتاگمین (قرمز) و پروتئین پس سیناپسی PSD-95 (زرد) نقاط کمّی اندازه‌گیری شده‌ای (لکه‌های رنگی) را در سلول‌های گانگلیون رتینال کنترل که در نبود آستروسیت کشف شده‌اند نشان می‌دهد (چپ). با این حال، افزایشی ۳.۵ برابر در این نقاط وقتی سلول ها در حضور آستروسیت یا محصولات پروتئینی آستروسیت به نام ترومبوسپندین کشت می‌شوند، نشان می‌دهد (راست) (rTPS2= ترومبوسپندین ۲ نوترکیب که استفاده شد). آستروسیت ها ترومبوسپندین را که به تنهایی اثری همانند تشکیل سیناپس توسط آستروسیت ها دارد ترشح می‌نمایند.

اساسی عبور و مرور وزیکولی که در فصل ۱۴ بحث شده، تمرکز می‌کنیم. سپس روی مکانیسم مدت زمان پیام سیناپسی و چگونگی دریافت و تفسیر نوروترانسمیترها توسط سلول پس سیناپسی بحث می‌کنیم.

تشکیل سیناپس ها نیاز به تجمع ساختارهای پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی دارد

آکسون ها از جسم سلولی طی رشدی که با پیام‌های گرفته شده از سلول‌های دیگر در طول مسیرشان هدایت می‌شوند توسعه می‌یابند چنانکه انتهای آکسون به نقطه درست می‌رسد (بخش ۵-۲۳ را ملاحظه کنید). همانطور که آکسون ها رشد می‌کنند با دندریت‌های نورون‌های دیگر ارتباط می‌یابند و در چنین نقاطی سیناپس ها تشکیل می‌شوند. در CNS، سیناپس‌هایی با ویژگی پیش سیناپس در تمام طول یک آکسون یافت می‌شوند، در حالی که نورون‌های حرکتی با سلول‌های ماهیچه‌ای فقط در انتهای آکسون سیناپس می‌دهند.

نورون‌های کشت داده شده به صورت جداگانه سیناپس‌های موثری تشکیل نمی‌دهند، ولی وقتی گلیاها افزوده می‌شوند، سرعت تشکیل سیناپس به طور اساسی افزایش می‌یابد. سلول‌های

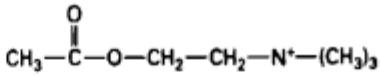
▲ **شکل ۱۸ـ۲۳ وزیکول‌های سیناپسی انتهای آکسون نزدیک ناحیه رهایش نوروترانسمیترها.** در این برش طولی از اتصال نورونی ماهیچه‌ای، لامینای بازال در شکاف سیناپسی جداکننده نورون از غشای ماهیچه قرار دارد که خیلی تاخورده است. گیرنده‌های استیل‌کولین در غشای ماهیچه پس سیناپسی در بالا و بخشی از پایین روی جوانب تاخوردگی‌های غشاء قرار دارند. یک سلول شوآن انتهای آکسون را احاطه می‌کند.

آستروسیت و شوآن پیام‌ها را برای تحریک تشکیل سیناپس ها به نورون ها می‌فرستند و سپس به حفظ آن ها کمک می‌کنند (شکل ۱۷ـ۲۳). برای کشف پیام‌های درگیر، محیط کشتی که گلیا در آن تیمار شده، به محیط کشت نورون ها افزوده شده و تشکیل سیناپس تحریک شد. با تخلیص انواع مواد می‌توان نوع پیام یا سیگنال راتعیین نمود. پروتئین ترومبوسپندین[1] (TSP) که جزئی از ماتریکس خارج سلولی است، عامل فعال بود. فقدان ژن‌های ترومبوسپندین در موش ها این فرض را اثبات نمود: موش ها فقط ۷۰ درصد از تعداد واقعی سیناپس ها را در مغز خود داشتند. TSP احتمالاً به تنهایی عمل نمی‌نماید زیرا در القای تشکیل سیناپس ها به اندازه کل گلیا توانمند نیست. مولکول دیگری که مسئول برخی از فعالیت‌های القاکننده سیناپس گلیاست، کلسترول است و ارتباط بین گلیا و نورون ها را نیز تأمین می‌نماید. ارتباط دو طرفه بین نورون ها و گلیایی که آن ها را احاطه کرده است فراوان و پیچیده است. در مورد پیام‌ها و اطلاعاتی که آن ها حمل می‌نمایند، تحقیقات بسیار فعالی در حال انجام است. حتی شواهدی وجود دارد که نورون ها سیناپس ها را روی گلیا تشکیل می‌دهند. در حالی که گلیاها پتانسیل عمل ندارند ولی ردیف‌های پیچیده از کانال ها و جریان‌های یونی دارند.

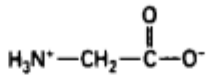
در سیناپس، سلول پیش سیناپسی صدها تا هزار ها وزیکول سیناپسی دارد که برخی روی غشا می‌ایستند و بقیه منتظرند تا استفاده شوند. رهایش به شکاف سیناپسی در ناحیه فعال که ناحیه‌ای تخصص یافته در غشاء پلاسمایی بوده و مقدار زیادی پروتئین با فعالیت تغییر ویژگی‌های وزیکول‌های سیناپسی و آوردن آن ها به نقطه‌ای برای چسبیدن و الحاق به غشاء پلاسمایی در آن تجمع یافته‌اند صورت می‌گیرد. طبق نتایج میکروسکوپ الکترونی، این ناحیه فعال دارای ماده متراکم و رشته‌های اسکلت سلولی ظریفی است (شکل ۱۸ـ۲۳). ناحیه فعال به تدریج با وزیکول‌های سیناپسی که در ابتدا تجمع یافته و سپس عناصر اسکلت سلولی و سپس پروتئین‌های دیگر تشکیل می‌شود. یک ناحیه متراکم مشابه از ساختارهای تخصص یافته در عرض سیناپس در سلول‌های پس سیناپسی دیده شده که چگالی پس سیناپسی (PSD) نامیده می‌شود. مولکول‌های چسبنده به سلول که سلول‌های پیش سیناپسی و پس سیناپسی را بهم متصل می‌کنند، ناحیه فعال و PSD را به صورت ردیف با هم نگاه می‌دارند. پس از رهایش وزیکول‌های سیناپسی در پاسخ به پتانسیل عمل، نورون پیش سیناپسی پروتئین‌های غشایی سیناپسی را با آندوسیتوز به درون و بیرون ناحیه فعال، بازیافت می‌نماید.

القای تجمع PSD در اتصال ماهیچه‌ای نورونی (NMI) مطالعه زیادی شده است. در این سیناپس‌ها، استیل‌کولین نوروترانسمیتری است که توسط نورون‌های حرکتی تولید می‌شود و گیرنده آن یعنی AChR، توسط سلول‌های پس سیناپسی تولید می‌شود که این سلول یک سلول ماهیچه‌ای است. پیش سازهای سلول ماهیچه‌ای، یعنی میوبلاست‌ها، که کشت می‌شوند ممکن است خودبخود به رشته‌های ماهیچه‌ای چند هسته‌ای که شبیه سلول‌های ماهیچه‌ای معمولی‌اند، الحاق شوند. با تشکیل میوبلاست‌ها، AChR تولید شده و وارد غشای پلاسمایی رشته‌های ماهیچه‌ای می‌شود که چگالی آن را به ۱۰۰۰ گیرنده در μm^2 می‌رساند. AChR از غشاء پراکنده می‌شود، ولی اگر نورون ها به کشت افزوده شوند، گیرنده استیل‌کولین در نقاط تماس با نورون ها متراکم می‌شود. نورون موجب حرکت AChR که از قبل وجود داشت می‌شود و به رشته‌های

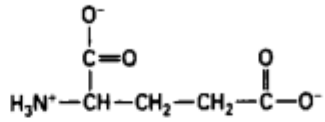
1- Thrombospondin



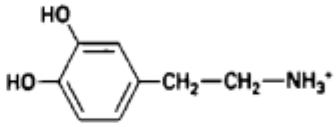
استیل کولین



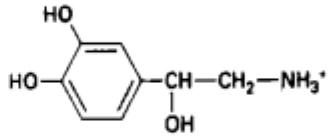
گلایسین



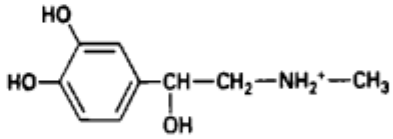
گلوتامات



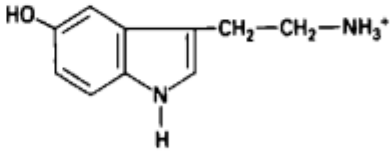
دوپامین
(مشتق از تیروزین)



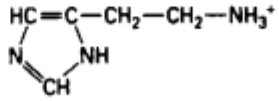
نوراپی نفرین
(مشتق از تیروزین)



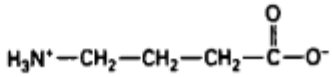
اپی نفرین
(مشتق از تیروزین)



سروتونین یا ۵-هیدروکسی تریپتامین
(مشتق از تریپتوفان)



هیستامین
(مشتق از هیستیدین)



۷-آمینوبوتیریک اسید یا گابا
(مشتق از گلوتامات)

◀ شکل ۱۹ـ۲۳ (شکل رنگی) ساختار چندین مولکول کوچک که به عنوان نوروترانسمیتر عمل می‌نمایند. بجز استیل‌کولین، همه این‌ها اسیدهای آمینه (گلایسین و گلوتامات) یا مشتقات آنها می‌باشند. سه نوروترانسمیتر سنتزی از تیروزین که دارای حلقهٔ کاتکول (آبی) هستند کاتکولامین‌ها نامیده می‌شوند.

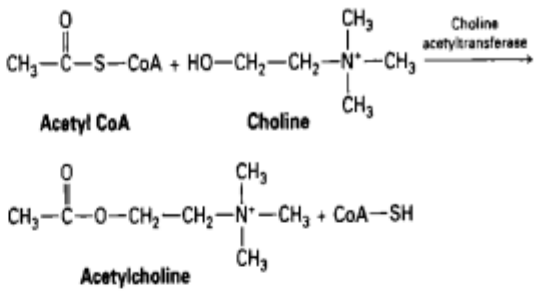
ماهیچه‌ای القا می‌کند که AChR بیشتری تولید نمایند. چگالی گیرنده‌های سیناپس بالغ بر حدود ۱۰۰۰۰-۲۰۰۰۰ عدد در μm^2 می‌رسد، در حالی که چگالی آن در هر جای دیگر غشای پلاسمایی کمتر از ۱۰ عدد در μm^2 است

این مشاهدات منجر به بررسی پیام رسانی دو طرفه با نورون ها و رشته‌های ماهیچه‌ای شد. نتیجه این کار اینست که سلول‌های ماهیچه‌ای قبل از اینکه هر اثر قابل تمییزی از آکسون‌های حرکتی بگذارند شروع به سازمان دادن ساختارهای سیناپسی خود می‌نمایند. ورود یک آکسون، ساختاری را که تشکیل داده پایدار کرده و بیشتر تغییر می‌دهد.

نوروترانسمیترها با پروتئین‌های آنتی‌پورت وابسته به H^+ به وزیکول‌های سیناپسی منتقل می‌شوند

در این بخش به چگونگی بسته‌بندی نوروترانسمیترها در وزیکول‌های سیناپسی متصل به غشاء در انتهای آکسون می‌پردازیم. تعداد زیادی مولکول کوچک در سیناپس‌های مختلف نقش نوروترانسمیتری دارند. به استثنای استیل‌کولین، نوروترانسمیترهای نشان داده شده در شکل ۱۹ـ۲۳، اسیدهای آمینه یا مشتقات آنها هستند. نوکلئوتیدهایی مثل ATP و نوکلئوتیدهای مشابه، که فاقد گروه فسفات هستند، نیز به عنوان نوروترانسمیتر عمل می‌نمایند. همه نوروترانسمیترهای «کلاسیک» در سیتوزول سنتز می‌شوند و در انتهای آکسون به وزیکول‌های سیناپسی متصل به غشاء منتقل می‌شوند، جایی که در آن ذخیره می‌شوند. این وزیکول ها ۴۰-۵۰nm قطر دارند و لومن آن ها pH پایینی دارد که تحت عمل پمپ پروتون نوع V در غشای وزیکول تولید می‌شوند. همانند تجمع متابولیت ها در واکوئل‌های گیاهان (شکل ۲۸ـ۱۱ را ملاحظه کنید)، این شیب غلظت پروتونی (لومن وزیکول > سیتوزول) انتقال نوروترانسمیتر را با آنتی‌پورترهای وابسته به H^+ ویژه لیگاند در غشای وزیکول امکان‌پذیر می‌نماید.

برای مثال استیل‌کولین از استیل کوآنزیم A (استیل کوآ) (حد واسط تجزیه گلوکز و اسیدهای چرب) و کولین و در واکنش کاتالیزشونده توسط کولین استیل ترانسفراز تولید می‌شود:



وزیکول‌های سیناپسی استیل‌کولین را از سیتوزول برداشته و علیه یک شیب غلظت قوی با استفاده از آنتی‌پورتر استیل‌کولین/ H^+ در غشای وزیکول تغلیظ می‌نمایند. بندرت، ژن رمزکننده این آنتی‌پورتر کلاً در اینترون اول ژن رمزکننده کولین استیل ترانسفراز قرار دارد، مکانیسمی که در طی تکامل برای اطمینان از بیان هماهنگ این دو پروتئین، حفظ شده است. پروتئین‌های آنتی‌پورت نوروترانسمیتر / H^+ مختلفی برای انتقال نوروترانسمیترهای دیگر به وزیکول‌های سیناپسی استفاده می‌شوند.

وزیکول‌های سیناپسی حاوی نوروترانسمیتر نزدیک غشای پلاسمایی قرار دارند

نوروترانسمیترها توسط یک آنزیم سیتوزولی سنتز شده و سپس توسط پروتئین‌های ناقل به وزیکول‌های سیناپسی منتقل می‌شوند. مثلاً گلوتامات توسط پروتئین‌هایی به نام ناقل‌های وزیکولی گلوتامات (VGLUTs) به وزیکول‌های سیناپسی منتقل می‌شود. VGLUT ها برای گلوتامات بسیار تخصص یافته‌اند ولی تمایل پایینی برای سوبسترا (Km=۱-۳mM) دارند. ترانسپورترها، آنتی‌پورترهایی‌اند که گلوتامات را به وزیکول‌هایی سیناپسی منتقل می‌کنند در حالی که پروتون ها در جهت مخالف حرکت می‌کنند. شیب پتانسیل غشاء که فرایند انتقال را تسهیل می‌کند با ATPase نوع واکوئلی حفظ می‌شود (فصل ۱۱).

اگزوسیتوز نوروترانسمیترها از وزیکول‌های سیناپسی شامل هدف‌گیری و الحاق است که شبیه آن چیزی است که در رهایش پروتئین‌های ترشحی در مسیرهای ترشحی رخ می‌دهد (شکل ۲۰-۲۳). به هرحال، چندین جنبه بی همتا اجازه رهایش سریع نوروترانسمیترها را در پاسخ به ورود پتانسیل عمل در انتهای آکسونی پیش سیناپسی می‌دهد. مثلاً در نورون‌های در حال استراحت، برخی وزیکول‌های سیناپسی پر شده از نوروترانسمیتر در غشای پلاسمایی «فرو می‌روند»؛ بقیه در ناحیه فعال نزدیک غشای پلاسمایی در شکاف سیناپسی ذخیره می‌شوند.

علاوه بر این غشای وزیکول‌های سیناپسی حاوی پروتئین متصل شونده به Ca^{2+} تخصص یافته‌ای است که پس از رسیدن به یک پتانسیل عمل مقدار Ca^{2+} سیتوزولی را افزایش داده و ادغام سریع وزیکول‌های چسبیده به غشاء پیش سیناپسی را موجب می‌شود.

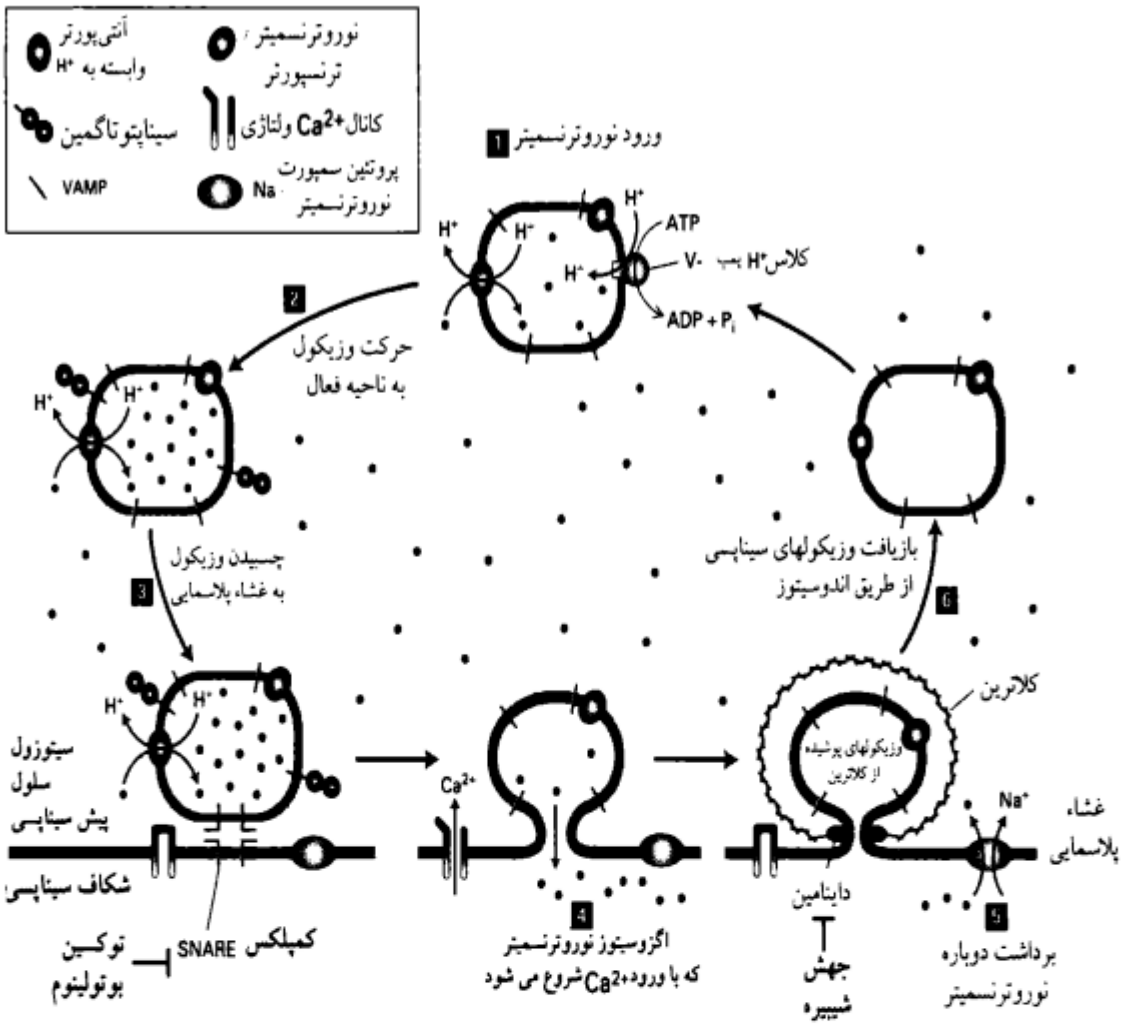
آرایش سازمان یافته رشته‌های اسکلت سلولی در انتهای آکسونی به وزیکول‌های سیناپسی در ناحیه فعال کمک می‌کند که به جایی که لازم است برسند. این وزیکول ها به وسیله سیناپسین[1] که یک فسفوپروتئین رشته‌ای با سطح سیتوزولی همه غشاهای وزیکول سیناپسی است همراه می‌شود. رشته‌های سیناپسین از غشای پلاسمایی نیز انشعاب می‌یابند و به وزیکول‌های همراه سیناپسین متصل می‌شوند. این برهمکنش ها احتمالاً وزیکول‌های سیناپسی را نزدیک به قسمتی از غشای پلاسمایی که روبروی سیناپس است، نگه می‌دارند. در واقع، موش تخریب ژن[2] شده در سیناپسین، اگرچه زنده می‌ماند ولی مستعد به صرع است؛ طی تحریک مکرر خیلی از نورون ها در چنین موشی، تعداد وزیکول‌های سیناپسی که با غشای پلاسمایی الحاق می‌شوند به شدت کاهش می‌یابد. پس سیناپس ها وزیکول‌های سیناپسی را در ناحیه فعال به کار می‌گیرند.

Rab3A که یک پروتئین متصل شونده به GTP است در غشای وزیکول‌های سیناپسی قرار داشته و نیز برای انتقال وزیکول‌های مملو از نوروترانسمیترها به ناحیه فعال سلول‌های پیش سیناپسی در شکاف سیناپسی لازم است. موش تخریب ژن شده در Rab3A، مثل موش فاقد سیناپسین، تعداد کمتری وزیکول سیناپسی قادر به ادغام به غشای پلاسمایی پس از تحریک‌های مکرر دارد. Rab3 ویژه نورون از لحاظ توالی و عملکرد شبیه پروتئین‌های Rab دیگر است که در چسبیدن وزیکول ها به ناحیه خاصی از غشای هدف در مسیر ترشحی شرکت می‌کنند.

جریان رو به داخل Ca^{2+} رهایش نوروترانسمیترها را آغاز می‌نماید

اگزوسیتوز نوروترانسمیترها از وزیکول‌های سیناپسی شامل وقایع ادغام و هدف‌گیری وزیکول مشابه به آنچه طی انتقال داخل سلولی پروتئین‌های غشای پلاسمایی و ترشحی رخ می‌دهد می‌باشد

1- Synapsin 2- Knackout



▲ **شکل ۲۰-۲۳ (شکل رنگی) چرخه نوروترانسمیترها و وزیکول‌های سیناپسی در انتهای آکسون‌ها.** بیشتر وزیکول‌های سیناپسی طی چرخه‌های اندوسیتوزی که در اینجا نشان داده شده است، شکل می‌گیرند. کل چرخه نوعاً حدود ۶۰ ثانیه طول می‌کشد مرحله (❶): وزیکول‌های فاقد پوشش انواع آنتی‌پورتر ها (آبی) و پروتئین‌های ناقل دیگر (سبز) را برای انتقال نوروترانسمیترها (نقاط قرمز) از سیتوزول انتخاب می‌کنند. مرحله (❷): وزیکول‌های سیناپسی حاوی نوروترانسمیترها به نواحی فعال حرکت می‌کنند. مرحله (❸): وزیکول‌ها در نقاط معینی به غشاء پلاسمایی سلول پیش‌سیناپسی می‌چسبند. سیناپتوتاگمین[1] مانع ادغام غشاء و رهایش نوروترانسمیترها می‌شوند. سم بوتولینوم با برش هیدرولیزی VAMP که نوعی v-SNARE بر روی وزیکولها است مانع اگزوسیتوز می‌شود. سیناپتوتاگمین در مراحل (❹) الی (❻) یا (❶) شرکت نمی‌کند، اگرچه هنوز حضور دارد. برای سادگی، نشان داده نشده است. مراحل (❹): در پاسخ به تحریک عصبی (پتانسیل عمل)، کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی در غشای پلاسمایی باز شده و اجازه جریان Ca^{2+} را از محیط خارج سلولی می‌دهند. تغییر ساختاری القا شده توسط Ca^{2+} حاصله در سیناپتوتاگمین منجر به ادغام وزیکول‌های چسبیده به غشاء پلاسمایی با آن و رهایش نوروترانسمیترها به شکاف سیناپسی می‌شود. مرحله (❺): پس از اینکه وزیکول‌های کلاترین/ AP حاوی v-SNARE و پروتئین‌های انتقال‌دهنده نوروترانسمیتر به سمت داخل جوانه می‌زنند و طی فرایندی که به واسطه دایناین انجام می‌شود کنده می‌شوند، پروتئین‌های پوششی‌شان را از دست می‌دهند. جهش‌های دایناین مثل (شیبیره) shibire در دروزوفیلا تشکیل مجدد وزیکول‌های سیناپسی را مسدود می‌نماید که منجر به پارالیز می‌شود. همزمان، پروتئین‌های سیمپورتر نوروترانسمیتر را از شکاف (سیناپسی) برمی‌دارند که به شدت پتانسیل عمل را محدود می‌نماید و دوباره سلول را با ترانسمیتر شارژ می‌کند. مرحله (❻): وزیکول ها طی اندوسیتوز بازیافت شده و وزیکول‌های بدون پوششی تولید می‌نمایند که آماده‌اند دوباره پر شوند و چرخه جدیدی را شروع کنند. برخلاف نوروترانسمیترهای دیگر، استیل‌کولین بازیافت نمی‌شوند.

1- Synaptotagmin

(فصل ۱۳). دو جنبه مهم عملکرد سیناپس از مسیرهای ترشح دیگری متفاوتند: (۱) ترشح همراه با دریافت پتانسیل عمل در انتهای آکسون است و (۲) وزیکول‌های سیناپسی پس از ادغام با غشای پلاسمایی طی چرخه موضعی به انتهای آکسون باز می‌گردند. شکل ۲۰ـ۲۳ کل چرخه را در حالی که وزیکول‌های سیناپسی از نوروترانسمیترها پر شده، محتویات خود را رها کرده و دوباره وارد چرخه می‌شوند، نشان می‌دهد.

دپلاریزاسیون غشاء پلاسمایی به تنهایی نمی‌تواند باعث الحاق وزیکول‌های سیناپسی به غشاء پلاسمایی شود. برای شروع الحاق وزیکول‌ها، باید پتانسیل عمل به پیام شیمیایی تبدیل شود که می‌گویند افزایش موضعی در غلظت Ca^{2+} سیتوزولی ایجاد می‌شود. القاگران پیام‌های الکتریکی، کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی هستند که در ناحیه غشای پلاسمایی در مجاورت وزیکول‌های سیناپسی قرار دارند. دپلاریزاسیون غشاء که منجر به دریافت پتانسیل عمل می‌شود این کانال ها را باز کرده و به یون‌های Ca^{2+} اجازه ورود از محیط خارج سلولی به انتهای آکسون می‌دهد.

یک آزمایش ساده اهمیت کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی را در رهایش نوروترانسمیتر ها نشان می‌دهد. محلول حاوی نورون ها در محیط حاوی Ca^{2+} با تترودوتوکسین[1] (دارویی که کانال Na^{+} ولتاژی را بلوکه می‌کند و بنابراین عبور پتانسیل عمل را مانع می‌شود) تیمار می‌شود. همانطور که انتظار می‌رود، هیچ نوروترانسمیتری در محیط کشت ترشح نمی‌شود. سپس اگر غشاء آکسونی به طور مصنوعی با درست کردن محیط ۱۰۰mM≈ از KCl در حضور Ca^{2+} خارج سلولی دپلاریزه شود، نوروترانسمیترها از سلول ها آزاد می‌شوند زیرا جریان رو به داخل Ca^{2+} از کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی وجود دارد. در واقع، کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی همانند کانال‌های Na^{+} ولتاژی با دپلاریزاسیون غشاء به طور گذرا باز می‌شوند.

دو اندوخته از وزیکول‌های سیناپسی پُر از نوروترانسمیتر در انتهای آکسون وجود دارند. آنهایی که به غشاء پلاسمایی می‌چسبند که می‌توانند از قبل اگزوسیتوز نمایند، و آنهایی که برعکس در ناحیه فعال نزدیک به غشای پلاسمایی ذخیره می‌شوند. هر افزایشی در Ca^{2+} باعث شروع اگزوسیتوز حدوداً ۱۰ درصد از وزیکول‌های در تماس با غشاء می‌شود. سپس پروتئین‌های غشایی ویژهٔ وزیکول‌های سیناپسی به طور ویژه طی اندوسیتوز در بر گرفته می‌شوند که معمولاً از طریق همان نوع وزیکول‌های پوشیده شده توسط کلاترین که پروتئین‌های دیگر غشای پلاسمایی را با انواع دیگر سلول ها بازیافت می‌نماید، صورت می‌گیرد. توانایی خیلی از نورون ها برای فعال شدن ۵۰ بار در ثانیه نشان دهندهٔ این است که چرخه پروتئین‌های غشایی وزیکول بسیار سریع رخ می‌دهد. تشکیلات اندوسیتوز و اگزوسیتوز بسیار حفظ شده است و به طور کامل در فصل ۱۴ توضیح داده شده است.

یک پروتئین متصل شونده به کلسیم ادغام وزیکول‌های سیناپسی را با غشا پلاسمایی تنظیم می‌نماید

ادغام وزیکول‌های سیناپسی با غشای پلاسمایی انتهای آکسون به SNAREها بستگی دارد که همان پروتئین‌هایی هستند که واسطهٔ ادغام وزیکول‌های ترشحی تنظیم شده دیگر می‌شوند (شکل ۲۰ـ۲۳). v-SNARE اصلی در وزیکول‌های سیناپسی (VAMP) برای تشکیل کمپلکس‌های SNARE با چهار هلیکس محکم به سینتاکسین و SNAP-25 (t-SNARE اصلی در غشای پلاسمایی انتهای آکسونی) متصل می‌شود. پس از ادغام، پروتئین‌های SNAR و NSF در انتهای آکسون جدایی VAMP را از t-SNAREها که قبلاً در ادغام وزیکول‌های سیناپسی مشاهده شده است، موجب می‌شود (شکل ۱۰ـ۱۴).

شواهد قوی برای نقش VAMP در اگزوسیتوز نوروترانسمیتر با مکانیسم عمل توکسین بوتولینوم به دست آمده است (یک پروتئین باکتریایی که می‌تواند موجب فلج عمومی یا مرگ که مشخصه بوتولیسم است، شود) که نوعی مسمومیت غذایی است تأمین شده است. این توکسین از دو پلی‌پپتید تشکیل شده است: یکی به نورون‌های حرکتی متصل می‌شود و ورود پلی پپتید دیگر را که یک پروتئاز است به سیتوزول انتهای آکسون تسهیل می‌نماید. تنها پروتئینی که این پروتئاز برش می‌دهد VAMP است (شکل ۲۰ـ۲۳ را ملاحظه کنید). پس از ورود پروتئاز بوتولینوم به انتهای آکسون، وزیکول‌های سیناپسی که قبلاً تماس نیافته‌اند توانایی خود را برای ادغام با غشای پلاسمایی از دست می‌دهند زیرا برش VAMP مانع از تجمع کمپلکس‌های SNARE می‌شود. بلوکه شدن حاصل در رهایش استیل‌کولین در سیناپس‌های نورونی ماهیچه‌ای باعث فلج عمومی می‌شود. با این حال، وزیکولهایی که قبلاً تماس یافته‌اند، مقاومت زیادی به توکسین دارند که نشان دهنده این است که وقتی کمپلکس‌های SNARE در تماس با غشای پیش سیناپسی قرار می‌گیرند می‌توانند در حالت نیمه تجمع یافته و مقاوم به پروتئاز باشند.

1- Tetrodotoxin

پیامی که اگزوسیتوز وزیکول‌های سیناپسی را شروع می‌کند افزایش غلظت Ca^{2+} در سیتوزول نزدیک به وزیکول ها از ۰/۱μm> (شاخص سلول‌های در حال استراحت) تا ۱-۱۰۰μM به دنبال دریافت پتانسیل عمل در سلول‌های تحریک شده است. سرعتی که وزیکولهای سیناپسی پس از افزایش در Ca^{2+} سیتوزولی (در کمتر از ۱ms) با غشای پیش سیناپسی ادغام می‌شوند نشان می‌دهد که تشکیلات ادغامی کاملاً در حالت استراحت تجمع یافته و می‌توانند متحمل تغییرات ساختاری شوند که منجر به اگزوسیتوز نوروترانسمیتر می‌شود. یک پروتئین متصل شونده به Ca^{2+} بنام سیناپتوتاگمین که در غشای وزیکول‌های سیناپسی قرار می‌گیرد جزء کلیدی تشکیلات تشکیل دهنده وزیکول‌هاست که اگزوسیتوز را در پاسخ به Ca^{2+} شروع می‌نماید (شکل ۲۰-۲۳ را ملاحظه کنید).

چندین عامل از نقش سیناپتوتاگمین به عنوان حسگر Ca^{2+} برای اگزوسیتوز نوروترانسمیترها پشتیبانی می‌نمایند. جنین‌های جهش یافته دروزوفیلا و C.elegans که کاملاً فاقد سیناپتوتگمین هستند قادر به شکستن تخم نیستند و انقباض ماهیچه‌ای ناهماهنگ و ضعیف دارند. لاروهایی با جهش‌های فقدان عملکرد ناقص سیناپتوتاگمین، زنده می‌مانند ولی نورون‌های آنها در اگزوسیتوز وزیکولی تحریک شده توسط Ca^{2+} ناقص است. علاوه بر این، جهش‌های سیناپتوتاگمین در موش که تمایلش را برای Ca^{2+} کاهش می‌دهند منجر به کاهش در میزان Ca^{2+} سیتوزولی لازم برای شروع اگزوسیتوز سریع می‌شوند. مکانیسم دقیق عملکرد سیناپتوتاگمین هنوز مشخص نشده است.

پیام رسانی در سیناپس ها با تخریب یا بازجذب نوروترانسمیتر پایان می‌یابد

به دنبال رهایش نوروترانسمیترها از سلول پیش سیناپسی، آنها باید جابه جا یا تخریب بشوند تا مانع تحریک مداوم سلول پس سیناپسی شوند. پیام رسانی طی انتشار نوروترانسمیتر از شکاف سیناپسی پایان می‌یابد ولی این فرایند کُند است. در عوض، یکی از دو مکانیسم، سریع‌تر عمل نوروترانسمیترها را در بیشتر سیناپس ها پایان می‌دهد.

وقتی استیل‌کولین توسط استیل‌کولین استراز (آنزیمی است که در شکاف سیناپسی قرار دارد) به استیل و کولین هیدرولیز می‌شود، پیام رسانی خاتمه می‌یابد. کولین که در این واکنش آزاد می‌شود، توسط سیمپورترهای کولین/ Na^+ به انتهای آکسونی پیش سیناپسی بازگردانده می‌شود و در سنتز مجدد استیل‌کولین استفاده می‌شود. عملکرد این انتقال دهنده شبیه سیمپورترهای وابسته به Na^+ است که برای انتقال گلوکز به سلول ها در خلاف شیب غلظت استفاده می‌شوند (شکل ۲۵-۱۱ را ملاحظه کنید).

به استثنای استیل‌کولین، همه نوروترانسمیترهای نشان داده شده در شکل ۲۹-۲۳، از شکاف سیناپسی توسط انتقال دهنده که آنها را آزاد می‌کند به انتهای آکسون جابه‌جا می‌شوند. بنابراین این نوروترانسمیتر به صورت دست نخورده که در شکل ۲۰-۲۳ نشان داده شده (مرحله ❺)، آزاد می‌شوند. انتقال دهنده‌های GABA، نوراپی‌نفرین، دوپامین و سروتونین اولین انتقال دهنده‌هایی بودند که کلون شدند. این چهار پروتئین ناقل همگی سیمپورترهای وابسته به Na^+ هستند. آن ها ۷۰-۶۰ درصد توالی اسید آمینه‌ای یکسان دارند و معلوم شده است که هر یک از آن ها ۱۲ α هلیکس گذرنده از غشایی[1] دارند. همانند سیمپورترهای دیگر Na^+، حرکت Na^+ به داخل در جهت شیب الکتروشیمیایی‌اش انرژی لازم برای جذب نوروترانسمیتر ها را تأمین می‌نماید. برای بیان خنثی نمودن الکتریکی[2]، اغلب Cl^- از طریق کانال یونی همراه با Na^+ و نوروترانسمیتر ها انتقال می‌یابد.

نوروترانسمیتر ها و انتقال‌دهنده‌های آن هدف انواع داروهای قوی و گاهاً تخریب‌کننده هستند. کوکائین انتقال دهنده‌های نور اپی نفرین، سروتونین و دوپامین را مهار می‌نماید. اتصال کوکائین به انتقال دهنده‌های دوپامین مانع بازجذب دوپامین می‌شود، در نتیجه پیام رسانی در سیناپس‌های کلیدی مغز طولانی می‌شود؛ در واقع، انتقال دهنده دوپامین «گیرنده کوکائین» اصلی در مغز است. عوامل درمانی مانند داروهای ضدافسردگی فلوکسیتین[3] (پروزاک)[4] و ایمپرامین جذب سروتونین را مانع می‌شوند و دسیپرامین[5] مانع جذب نور اپی نفرین می‌شود.

مگس‌های جهش یافته فاقد دایناین قادر به بازیافت وزیکول‌های سیناپسی نیستند.

وزیکول‌های سیناپسی در ابتدا طی جوانه‌زنی آندوسیتوزی از غشای پلاسمایی انتهای آکسونی تشکیل می‌شوند. اغلب اندوسیتوز شامل حفره‌های پوشیده شده توسط کلاترین است و کاملاً از این نظر که چندین پروتئین غشایی ویژه وزیکول‌های

1- Transmembrane
2- Electroneutrality
3- Fluoxetin
4- Prozac
5- Desipramine

سیناپسی (مثل انتقال دهنده‌های نوروترانسمیتر) به طور اختصاصی وارد وزیکول‌های اندوسیتوزی می‌شوند، کاملاً ویژه است. به این منوال، پروتئین‌های غشایی وزیکول می‌توانند مجدداً استفاده شوند و وزیکول‌های بازیافت شده مجدداً پر از نوروترانسمیترها می‌شود (شکل ۲۰ـ۲۳ را ملاحظه کنید). هنگام تشکیل وزیکول‌های دیگر پوشیده از کلاترین/ AP، فشردگی وزیکول‌های سیناپسی اندوسیتوزی به پروتئین اتصال یابنده به GTP یعنی دینامین[1] (شکل ۱۹ـ۱۴ را ملاحظه کنید) نیاز دارد. در واقع، بررسی دروزفیلای جهش یافته حساس به دما بنام (shi)shibire که پروتئین دینامین مگس را رمز می‌کند، مدارک اولیه را برای نقش دینامین در آندوسیتوز تأمین می‌نماید. در دمای مجاز ۲۰°C مگس‌های جهش یافته معمولی‌اند ولی در دمای غیرمجاز ۳۰°C این مگس‌ها فلج می‌شوند (Shibire در زبان ژاپنی به معنی فلج شده می‌باشد) زیرا فشرده شدن حفره‌های پوشیده شده از کلاترین در نورون‌ها و سلول‌های دیگر مسدود می‌شود. وقتی نورون‌های shi را در دمای ۳۰°C با میکروسکوپ الکترونی می‌نگریم حفره‌های پوشیده از کلاترین فراوانی با گردن‌های دراز می‌بینیم، ولی تعداد وزیکول‌های پوشیده از کلاترین کم است. ظاهر انتهاهای عصبی در جهش یافته‌های shi در دمای غیرمجاز شبیه به انتهای نورون‌های طبیعی است که در حضور آنالوگ‌های غیرهیدرولیزی GTP انکوبه شدند (شکل ۲۰ـ۱۴ را ملاحظه کنید). نورون‌ها در جهش یافته‌های Shi به علت ناتوانی آنها در فشردن (جمع کردن) وزیکول‌های سیناپسی، سرانجام وقتی به دمای غیرمجاز تغییر داده می‌شوند وزیکول‌های سیناپسی خود را از دست می‌دهند که منجر به توقف پیام رسانی سیناپسی و فلج عمومی می‌شود.

باز شدن کانال‌های کاتیونی استیل کولینی منجر به انقباض ماهیچه می‌شود

در این بخش به اینکه چگونه اتصال نوروترانسمیترها به گیرنده‌ها در سلول‌های پس سیناپسی منجر به تغییرات در پتانسیل غشایی‌شان می‌شود، (با استفاده از ارتباط بین نورون‌های حرکتی ماهیچه‌ها) می‌پردازیم. در این سیناپس‌ها که اغلب اتصالات ماهیچه‌ای نورونی نامیده می‌شوند، استیل‌کولین نوروترانسمیتر است. یک انتهای آکسونی نورون حرکتی قورباغه ممکن است دارای یک میلیون یا بیشتر وزیکول سیناپسی باشد که هریک دارای ۱۰۰۰-۱۰۰۰۰ مولکول استیل‌کولین هستند؛ اغلب این وزیکول‌ها در ردیف‌هایی در ناحیه فعال جمع می‌شود (شکل ۱۸ـ۲۳ را ملاحظه کنید). چنین نورونی می‌تواند با سلول ماهیچه‌ای اسکلتی در چند صد نقطه سیناپس دهد.

گیرنده نیکوتینی استیل‌کولین که در سلول‌های ماهیچه‌ای بیان می‌شود، یک کانال لیگاندی است که هر دو K^+ و Na^+ را قبول می‌کند. این گیرنده‌ها در مغز نیز بیان می‌شوند و در یادگیری و حافظه مهم هستند؛ فقدان گیرنده استیل‌کولین در بیماری‌های شیزوفرنی، صرع، اعتیاد به دارو، و آلزایمر دیده می‌شود. آنتی بادی‌های علیه گیرنده‌های استیل‌کولین بخش مهمی از واکنش خودایمنی را در بیماری ضعف عضلانی بدخیم (میاستنی‌گراویس)[2] تشکیل می‌دهند. علت نامگذاری این چنین گیرنده، اتصال آن به نیکوتین است که این بر اعتیاد به نیکوتین در کسانی که تنباکو مصرف می‌کنند دلالت دارد. همچنین این گیرنده هدف نوروتوکسین‌های قوی، مثل کونوتوکسین‌ها[3] است که توسط حلزون‌های خاص اقیانوس آرام تولید می‌شود. حداقل ۱۴ نوع ایزوفرم متفاوت این گیرنده وجود دارد که به هموهتروپنتامرهایی با ویژگی‌های متنوع متصل می‌شوند.

تأثیر استیل‌کولین بر این گیرنده با مطالعات تکه ـ نگهداری روی توده‌هایی که بخش بیرونی غشاء پلاسمایی ماهیچه در آن‌ها به سمت بیرون است مطالعه می‌شود (شکل ۲۱c ـ۱۱ را ملاحظه کنید). چنین اندازه‌گیری‌هایی نشان می‌دهند که استیل‌کولین باعث باز شدن کانال کاتیونی در گیرنده‌ای می‌شود که قادر به عبور ۳۰۰۰-۱۵۰۰۰ یون K^+ یا Na^+ در هر میلی ثانیه است. با این حال، چون پتانسیل استراحت غشای پلاسمایی ماهیچه نزدیک E_k (پتانسیل تعادلی پتاسیم) است، باز شدن کانال‌های گیرنده استیل‌کولین موجب افزایش کوچکی در جریان یون‌های K^+ به خارج می‌شود؛ از طرف دیگر، یون‌های Na^+ وارد سلول ماهیچه‌ای می‌شوند که شیب الکتروشیمیایی Na^+ را ایجاد می‌کند.

افزایش همزمان در نفوذپذیری به یون‌های Na^+ و K^+ به دنبال اتصالات استیل‌کولین دپلاریزاسیون خالصی از حدود ۱۵mV - در پتانسیل استراحت ماهیچه تا ۸۵ـ تا ۹۰mV ـ ایجاد می‌کند. همانطور که درشکل ۲۱ـ۲۳ نشان داده شده، این دپلاریزاسیون ناحیه‌ای غشای پلاسمایی ماهیچه‌ای، باعث شروع باز شدن کانال‌های Na^+ ولتاژی می‌شود که منجر به تولید و انتقال پتانسیل عمل در غشاء سطحی سلول ماهیچه‌ای با همان مکانیسمی می‌شود

1- Dynamine
2- Myastherina gravis
3- Conotoxins

که قبلاً برای نورون ها توضیح داده شده است. وقتی دپلاریزاسیون غشاء به توبول‌های T (فرورفتگی‌های تخصصی غشاء پلاسمایی) می‌رسد، روی کانال‌های Ca^{2+} در غشاء پلاسمایی که ظاهراً تاثیری بر باز شدن آن ها نمی‌گذارد اثر می‌گذارد. به هرحال این امر باعث باز شدن کانال‌های رهاکننده Ca^{2+} مجاور در غشای شبکه سارکوپلاسمی می‌شود .جریان بعدی یون‌های Ca^{2+} ذخیره شده از شبکه سارکوپلاسمی در سیتوزول، غلظت سیتوزولی Ca^{2+} را به اندازه کافی بالا می‌برد تا انقباض ماهیچه‌ای را القا نماید.

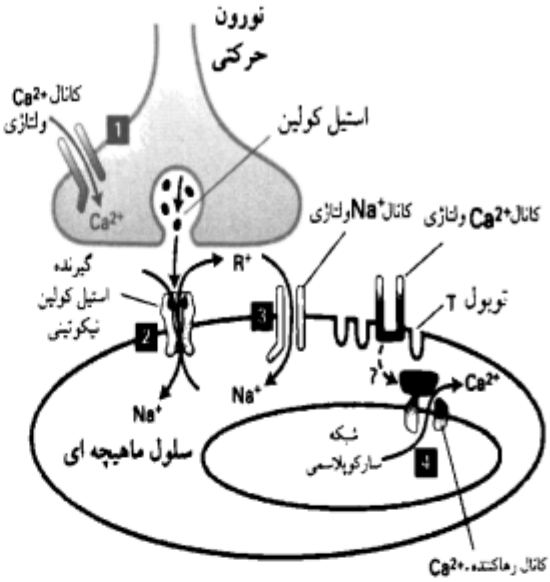
به تصویر کشیدن دقیق پتانسیل غشاء در غشای ماهیچه‌ای در سیناپس با یک نورون حرکتی تولیدکننده استیل‌کولین[1] نشان داد که این فرایند به صورت دپلاریزاسیون‌های خودبخودی، متناوب، و اتفاقی ≈۲ms با حدود ۰/۵-۱mV در نبود تحریک نورون حرکتی رخ می‌دهد. هر یک از این دپلاریزاسیون ها با رهایش خودبخودی استیل‌کولین از وزیکول‌های سیناپسی ایجاد می‌شود. در واقع، مشاهده چنین دپلاریزاسیون‌های کوچک خودبخودی منجر به مفهوم رهایش دو جنبه‌ای استیل‌کولین می‌شود (بعدا برای نوروترانسمیترهای دیگر به کار رفت) و در نتیجه منجر به فرضیه اگزوسیتوز سیناپسی می‌شود. رهایش یک وزیکول سیناپسی حاوی استیل‌کولین منجر به باز شدن حدود ۳۰۰۰ کانال یونی در غشای پس سیناپسی می‌شود که خیلی کمتر از تعداد موردنیاز برای رسیدن به آستانه دپلاریزاسیونی است که پتانسیل عمل را القاء می‌نماید. واضح است که تحریک انقباض ماهیچه‌ای توسط نورون حرکتی به رهایش تقریباً همزمان استیل‌کولین از تعداد زیادی وزیکول سیناپسی احتیاج دارد.

همه پنج زیرواحد گیرنده نیکوتینی استیل‌کولین به کانال یونی کمک می‌کنند

گیرنده استیل‌کولین ماهیچه اسکلتی یک پروتئین پنتامر با ترکیب زیرواحدی $\alpha_2\beta\gamma\delta$ است. زیرواحدهای α، β، γ و δ شباهت توالی قابل توجهی دارند؛ به طور متوسط حدود ۴۰-۳۵ درصد از واحد ها در هر دو زیرواحد شبیه‌اند. گیرنده کامل دارای تقارن پنج‌تایی است و کانال کاتیونی واقعی یک منفذ مرکزی نوک باریک است که توسط قطعات همولوگ هر یک از پنج زیرواحد پوشانده شده است (شکل ۲۲-۲۳). وقتی گیرنده به صورت تعاونی[2] به دو مولکول استیل‌کولین در حد فاصل زیرواحدهای $\alpha\delta$ و $\beta\gamma$ متصل می‌شود، کانال باز می‌گردد. وقتی استیل‌کولین به یک گیرنده متصل می‌شود، کانال طی دقایق کوتاهی باز می‌شود. مطالعاتی که نفوذپذیری کاتیون‌های کوچک مختلفی را اندازه می‌گیرند، نشان می‌دهند که کانال یونی باز در باریک‌ترین حالت حدود ۰/۸nm-۰/۶۵ قطر دارد که با تخمین‌های به دست آمده از میکروگراف الکترونی مطابقت دارد. این امر اجازه عبور هر دو یون‌های Na^+ و K^+ را در حالی که قشر مولکول‌های آب اتصال یافته دارند، می‌دهد. بنابراین احتمالاً گیرنده استیل‌کولین برخلاف کانال‌های Na^+ و K^+ که هر دو اجازه عبور فقط یون‌های غیرهیدراته را می‌دهند (شکل ۲۰-۱۱ را ملاحظه کنید) یون‌های هیدراته را انتقال می‌دهد. کانال یونی مرکزی از پنج α هلیکس M2 گذرنده از غشای تشکیل شده که هر α هلیکس یکی از پنج زیرواحد این پروتئین کافی است (شکل ۲۲a-۲۳ را ملاحظه کنید). هلیکس‌های M2 نیز از اسیدهای آمینه قطبی بدون بار یا هیدروفوب تشکیل شده‌اند، ولی اسیدهای آمینه با بار منفی آسپارت یا گلوتامات در هر انتهای آن و نزدیک به میانه کانال حاوی چندین ترئونین یا سرین قرار دارند. گیرنده‌های استیل‌کولین جهش یافته که در آن ها لیزین با بار مثبت جایگزین یک آسپارتات یا گلوتامات با بار منفی در هلیکس M2 شده است در اووسیت‌های قورباغه بیان شده است. اندازه‌گیری‌های مربوط به تکنیک تکه ـ نگهداری نشان می‌دهد که چنین پروتئین‌های تغییر یافته‌ای می‌توانند به عنوان کانال عمل نمایند ولی تعداد یون‌هایی که از آن ها در حالت باز عبور می‌کند کاهش یافته است. هرچه گلوتامات یا آسپارتات بیشتر جهش یابد (در یک یا چند هلیکس M2)، رسانایی نسبت به یون بیشتر کاهش می‌یابد. این یافته ها نشان می‌دهد که در یک حلقه با بار منفی در سطح خارجی اسیدهای آمینه آسپارتات یا گلوتامات کمک به شمردن آنیون‌های خروجی و جذب یون‌های Na^+ یا K^+ هنگام ورود به کانال می‌نماید. حلقه مشابهی از بارهای منفی پوشاننده سطح منفذ سیتوزولی نیز به انتخاب مناسب برای خروج کمک خواهند نمود (شکل ۲۲-۲۳ را ملاحظه کنید).

دو جایگاه اتصال یابنده به استیل‌کولین در دُمین‌های خارج سلولی گیرنده در فاصله ۴ تا ۵ نانومتر از مرکز منفذ قرار دارند. اتصال استیل‌کولین می‌تواند آغازگر تغییرات ساختاری در زیرواحدهای گیرنده باشد که می‌توانند موجب باز شدن کانال در برخی فواصل از جایگاه اتصال باشند. گیرنده‌های غشاهای پس سیناپسی جدا شده می‌توانند در حالت‌های باز یا بسته با انجماد سریع در نیتروژن مایع، به دام انداخته شوند. تصویر چنین آماده‌سازی‌هایی نشان می‌دهد که پنج هلیکس M2 نسبت به محور عمودی کانال طی باز یا بسته شدن می‌چرخند.

1- Cholinergic 2- Cooperatively



▲ **شکل ۲۱ـ۲۳ فعال شدن کانالهای یونی دریچه‌دار در اتصالات نورونی ماهیچه‌ای.** دریافت پتانسیل عمل در انتهای نورون حرکتی پیش سیناپسی باز شدن کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی را القا می‌نماید (مرحله ❶) و رهایش بعدی استیل‌کولین موجب شروع باز شدن گیرنده‌های استیل‌کولین لیگاندی در غشای پلاسمایی ماهیچه می‌شود (مرحله ❷). کانال باز موجب جریان رو به داخل Na^+ و جریان رو به خارج K^+ می‌باشد. جریان رو به داخل Na^+ تولید دپلاریزاسیون ناحیه‌ای در غشاء می‌نماید که منجر به باز شدن کانال‌های Na^{2+} ولتاژی و ایجاد پتانسیل عمل می‌شود (مرحله ❸). وقتی دپلاریزاسیون منتشر شونده به توبول‌های T می‌رسد، توسط کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی در غشای پلاسمایی حس می‌شود. اگر چه این مکانیسم ناشناخته است (با ؟ نشان داده شده) این کانال ها بسته باقی می‌مانند ولی بر کانال‌های Ca^{2+} در شبکه سارکوپلاسمی (شبکه‌ای از اجزای متصل شده به غشا) اثر می‌گذارند و Ca^{2+} را به درون سیتوزول آزاد می‌نمایند (مرحله ❹). افزایش حاصله Ca^{2+} سیتوزولی موجب انقباض ماهیچه‌ای می‌شود (فصل ۱۷).

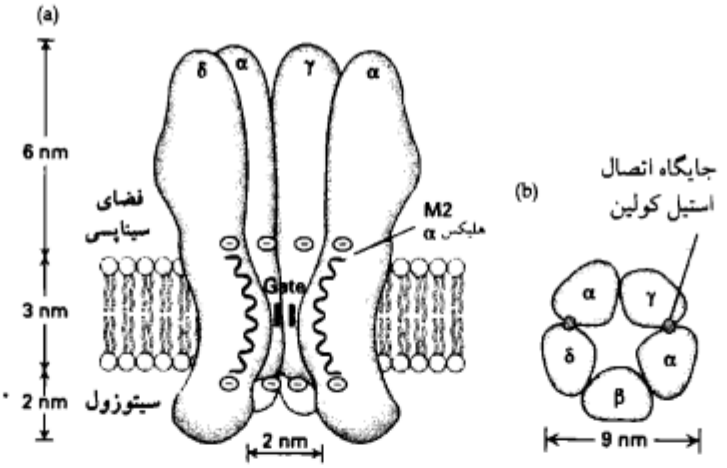
وقتی اتصال نورونی ماهیچه‌ای را به عنوان یک مثال عالی برای چگونگی کارکرد نوروترانسمیترها و گیرنده هایشان بحث کرده‌ایم ایده‌های مشابهی برای گلوتامات و GABA که دو نوروترانسمیتر اصلی در مغز مهره داران هستند، به کار می‌رود. آن ها از کانال‌های لیگاندی با همان اصول همانند AChR، استفاده می‌نمایند.

سلول‌های عصبی برای تولید پتانسیل عمل از دستور همه یا هیچ پیروی می‌کنند

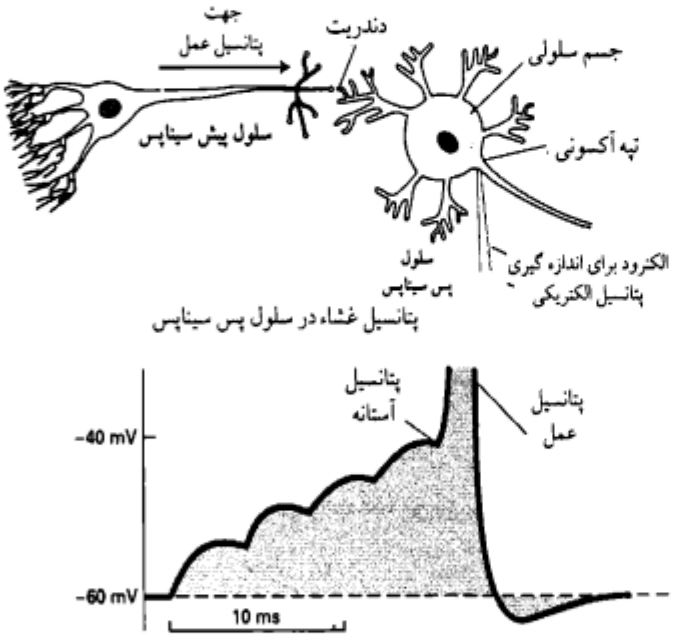
در محل اتصال نورونی ماهیچه‌ای، هر پتانسیل عمل در نورون حرکتی پیش سیناپسی یک پتانسیل عمل را در سلول ماهیچه‌ای پس سیناپسی آغاز می‌نماید که در طول رشته ماهیچه‌ای منتشر می‌شود. شرایط در سیناپس بین نورون‌ها، خصوصا در مغز بسیار پیچیده‌تر است زیرا نورون پس سیناپسی معمولاً پیام ها را از تعداد زیادی نورون پیش سیناپسی دریافت می‌نماید. نوروترانسمیترهای رها شده از نورون‌های پیش سیناپسی ممکن است به گیرنده تحریکی در نورون پس سیناپسی متصل شوند، بنابراین کانالی باز می‌شود که یون‌های Na^+ یا هر دو یون Na^+ و K^+ را می‌پذیرد. گیرنده استیل‌کولین که تنها گیرنده‌ای از بین این همه گیرنده‌های تحریکی بحث شده بود و باز شدن چنین کانال‌های یونی منجر به دپلاریزاسیون غشای پلاسمایی پس سیناپسی می‌شود که تولید یک پتانسیل عمل را کنترل می‌نماید. در مقابل، اتصال نورترانسمیتر به گیرنده مهاری سلول پس سیناپسی منجر به باز شدن کانال‌های K^+ یا Cl^- می‌شود که نتیجه‌اش ورود یون‌های Cl^- به سمت داخل است. در حالت دیگر، جریان یونی تمایل به هیپرپلاریزاسیون غشای پلاسمایی دارد که تولید پتانسیل عمل را در سلول‌های پس سیناپسی مهار می‌نماید.

یک نورون همزمان تحت اثر پیام‌های دریافتی در سیناپس‌های تحریکی و مهاری می‌باشد. نورون به طور مداوم این پیام ها را دریافت نموده و تعیین می‌نماید که آیا پتانسیل عمل تولید شده است یا خیر. در این فرایند، انواع دپلاریزاسیون ها و هیپرپلاریزاسیون‌های کوچک تولید می‌شوند که در سیناپس ها در طول غشای پلاسمایی از دندریت به جسم سلولی و سپس به بخش ابتدایی آکسون که با هم جمع می‌شوند، حرکت می‌نمایند. یک پتانسیل عمل وقتی تولید می‌شود که غشای بخش شروع‌کننده آکسون در یک ولتاژ خاص بنام پتانسیل آستانه دپلاریزه شود (شکل ۲۳ـ۲۳). پس یک پتانسیل عمل به صورت همه یا هیچ تولید می‌شود. دپلاریزاسیون در حد آستانه همیشه منجر به پتانسیل عمل می‌شود در حالی که هر دپلاریزاسیونی که به حد پتانسیل آستانه نرسد هیچگاه پتانسیل عمل را القا نمی‌نماید.

اینکه آیا نورون در بخش آغازین آکسون پتانسیل عمل تولید کند یا نه، به تعادل زمانی، دامنه و یافتن مکان همه ورودی‌هایی که دریافت می‌نماید بستگی دارد؛ این محاسبه پیام، برای هر نوع نورونی متفاوت است. از یک نظر، هر نورون یک کامپیوتر کوچک است که میانگینی از تمام فعال‌سازی‌های گیرنده و توزیعات الکترویکی را در غشاء می‌گیرد و پتانسیل عمل را شروع کرده و آن را در طول آکسون هدایت می‌نماید. یک پتانسیل عمل همان بزرگی را دارد که هر نوع



▲ **شکل ۲۲-۲۳ ساختار سه بعدی گیرنده نیکوتینی استیل‌کولین.** (a) مدل برش طولی گیرنده پنتا مری در غشاء؛ برای وضوح زیرواحد β نشان داده نشده است. هر زیرواحد دارای یک α هلیکس M2 (قرمز) است که در سمت منفذ مرکزی قرار می‌گیرد. زنجیره‌های جانبی آسپارتات و گلوتامات در هر دو انتهای هلیکس‌های M2 دو حلقه بار منفی ایجاد می‌کنند که به دفع آنیون ها از کانال وجذب کاتیون ها به کانال کمک می‌نماید. دریچه کانال که طی اتصال به استیل‌کولین باز می‌شود، در میانه منفذ قرار دارد. (b) برش عرض سمت اگزوپلاسمی گیرنده نشان می‌دهد که آرایش زیرواحد ها در اطراف منفذ مرکزی می‌باشد. دو جایگاه اتصال استیل‌کولین در فاصله حدوداً ۳nm از سطح غشایی قرار دارند.



◀ **شکل تجربی ۲۳-۲۳ پیام‌های ورودی باید به حد پتانسیل آستانه برای شروع پتانسیل عمل در سلول پیش سیناپسی برسند.** در این مثال، نورون پیش سیناپسی در هر ۴ میلی ثانیه حدود یک پتانسیل عمل ایجاد می‌کند. دریافت هر پتانسیل عمل در سیناپس ها در تپه آکسونی سلول پس سیناپسی منجر به تغییرات کوچکی در پتانسیل غشاء می‌شود که در این مثال دپلاریزاسیون حدود ۵mV است. وقتی چندین تحریک موجب دپلاریزاسیون این سلول پس سیناپسی تا حد پتانسیل آستانه می‌شوند (در اینجا حدودا ۴۰mV-) پتانسیل عمل القا می‌شود.

نورون دیگر می‌تواند داشته باشد. همانطور که قبلاً اشاره شد، فرکانسی که پتانسیل عمل با آن تولید شده است در یک نورون خاص پارامتر مهمی است که در توانایی آن در پیام رسانی به سلول‌های دیگر نقش دارد.

اتصالات شکافدار نیز به نورون ها اجازه برقراری ارتباط می‌دهند

سیناپس‌های شیمیایی که نوروترانسمیترها را به کار می‌گیرند اجازه ارتباط یک طرفه با سرعت بالا می‌دهند. ولی گاهی پیام ها از یک سلول به سلول دیگر بدون مداخله با سیناپس‌های شیمیایی به صورت الکتریکی جابه جا می‌شوند. سیناپس‌های الکتریکی به کانال‌های اتصالات شکاف‌دار[1] که دو یا چند سلول را به یکدیگر متصل می‌نمایند بستگی دارند (فصل ۱۹). اثر تماس ها در اتصالات شکاف‌دار هماهنگی کامل بین فعالیت‌های سلول‌های به هم چسبیده است. یک سیناپس الکتریکی دو طرفه نیز می‌باشد؛ و هر یک از نورون ها می‌تواند دیگری را تحریک کنند. در قشر مخ و تالاموس و برخی بخش‌های دیگر مغز، سیناپس‌های الکتریکی معمولند. ویژگی کلیدی سیناپس‌های الکتریکی سرعت آنهاست. در حالی که

1- Gap junctions

۰/۵-۵ms طول می‌کشد تا یک پیام در طول سیناپس شیمیایی عبور نماید، انتقال در طول سیناپس الکتریکی تقریباً آنی است و در کسری از میلی ثانیه رخ می‌دهد. زیرا سیتوپلاسم بین سلول ها پیوسته است. علاوه بر این، لازم نیست که سلول پیش سیناپسی (فرستنده پیام) به حد آستانه برسد تا پتانسیل عمل در سلول پس سیناپسی ایجاد شود. در عوض، هر نوع جریان الکتریکی در سلول بعدی ادامه می‌یابد و باعث دپلاریزاسیون متناسب با جریان می‌شود.

یک سیناپس الکتریکی ممکن است هزاران کانال شکاف‌دار داشته باشد که هر کدام از دو نیمه کانال تشکیل شده‌اند که یکی در هر یک از دو سلول مقابل هم وجود دارد. کانال‌های اتصالات شکاف‌دار ساختاری مشابه اتصالات شکاف‌دار معمول دارند (فصل ۱۹). هر نیمه کانال تجمع شش کپی از پروتئین **کانکسین** است. از آنجایی که حدود ۲۰ ژن کانکسین پستانداری وجود دارد، تنوع در ساختار و عملکرد کانال از ترکیبات متفاوت پروتئینی حاصل می‌شود. کانال ۱/۶-۲nm، اجازه انتشار مولکول ها تا سقف ۱۰۰۰Da اندازه را می‌دهد و مشکلی با یون‌های هم اندازه با آن ندارد.

نکات کلیدی بخش ۳-۲۳

ارتباطات در سیناپس‌ها

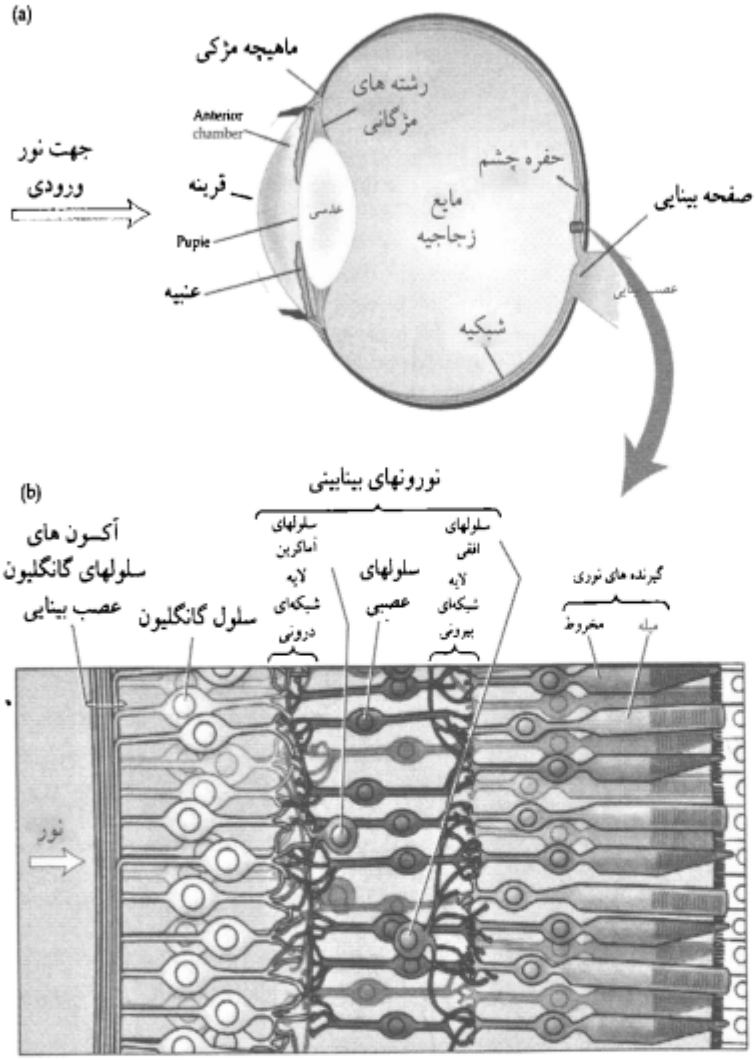
- سیناپس‌ها ارتباطات بین سلول پیش‌سیناپسی و سلول پس سیناپسی بوده و شکافهای کوچکی هستند.
- نوروترانسمیترها توسط فرایند اگزوسیتوز از سلول‌های پیش سیناپسی آزاد می‌شوند. آنها در عرض سیناپس انتشار یافته و به گیرنده‌های خود در سلول پس سیناپسی متصل می‌شوند. این سلول پس سیناپسی ممکن است یک نورون یا یک ماهیچه باشد.
- سیناپسهای شیمیایی در این مجموعه‌ها، تک‌جهت دار هستند (شکل ۴-۲۳ را ملاحظه کنید).
- نوروترانسمیترها (شکل ۲۳۰۱۹ را ملاحظه کنید) در صدها تا هزاران وزیکول سیناپسی در انتهای آکسون سلول پیش‌سیناپسی ذخیره می‌شوند (شکل ۱۸-۲۳ را ملاحظه کنید) هنگامیکه پتانسیل عمل به آنجا می‌رسد کانالهای Ca^{2+} دریچه‌دار وابسته به ولتاژ باز شده و کلسیم باعث ادغام این وزیکولهای سیناپسی با غشاء سلول پیش سیناپسی می‌شود. بعد از آزادشدن نوروترانسمیتر وزیکولها توسط فرایند آندوسیتوز شکل گرفته و چرخه ادامه پیدا می‌کند (شکل ۳۰-۲۳ را ملاحظه کنید).
- عملکرد هماهنگ چهار کانال یونی دریچه‌دار در سیناپس نورون‌های حرکتی و سلول‌های ماهیچهٔ مخطط منجر به آزادی استیل کولین از انتهای آکسون، دپلاریزاسیون غشای ماهیچه، تولید پتانسیل عمل و سپس انقباض می‌گردند (شکل ۲۱-۲۳ را ملاحظه کنید).
- گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین به عنوان یک کانال کاتیونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند حاوی پنج زیرواحد است که هر کدام از آنها یک مارپیچ α گذرنده از غشای (M2) دارد که کانال را می‌پوشانند (شکل ۲۲-۲۳ را ملاحظه کنید).
- نورون پس سیناپسی پتانسیل عمل را فقط هنگامی تولید می‌کند که غشای پلاسمایی در تپه آکسونی در یک حد آستانه‌ای توسط مجموع دپلاریزاسیون‌ها و هیپرپلاریزاسیون‌های ناشی از فعال شدن چندین گیرنده نورونی دپلاریزه شود (شکل ۲۳-۲۳ را ملاحظه کنید).
- سیناپسهای الکتریکی به صورت مستقیم توسط اتصالات شکافدار بین نورون‌ها منتقل می‌شوند. سیناپسهای الکتریکی برخلاف سیناپسهای شیمیایی، سیستم نوروترانسمیتر ندارند ولی انتقال پیام را به صورت دوجهته و بسیار سریع انجام می‌دهند.

۴-۲۳ سلول‌های حسی: دیدن، احساس کردن، شنیدن، چشیدن و بو کردن

پیشرفت قابل توجهی در درک چگونگی ثبت ادراکات ما از جهان خارج توسط حواس و اینکه این اطلاعات چگونه توسط مغز پردازش می‌شوند حاصل شده است. در این بخش، در مورد مکانیسم‌های سلولی و مولکولی و سلول‌های عصبی تخصص یافته‌ای که در بینایی، لامسه، شنوایی، چشایی و بویایی نقش دارند، بحث خواهیم نمود.

چشم نشان دهنده سلول‌های عصبی حساس به نور است

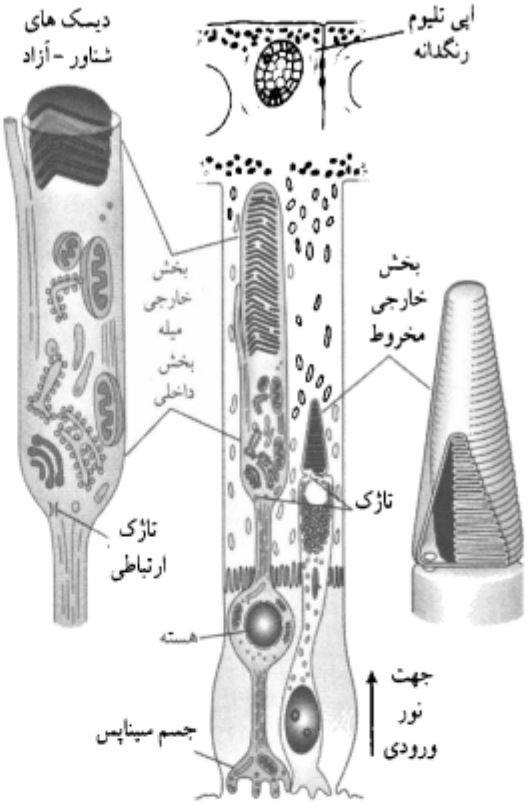
در حالیکه حس شنوایی جفدها و حس بویایی سگ‌ها بارز است، بیشتر انسان ها بینایی را به عنوان حسی می‌دانند که پنجره بسیار موثری رو به جهان گشوده است. نور سریع بوده و با سرعت حدود ۳۰۰۰۰۰km/s و به صورت خطوط مستقیم حرکت می‌کند. در نتیجه اطلاعات فوق العاده‌ای را منتقل می‌نماید. چشم انسان ساختار پیچیده‌ای دارد که نور را از محیط جمع‌آوری نموده و آن را روی سلول‌های عصبی حساس به نور متمرکز می‌نماید که پیام ها را به مغز می‌رسانند، جایی که به تصویر ترجمه می‌شود (شکل ۲۴a-۲۳).



◀ **شکل ۲۴ـ۲۳ ساختار چشم انسان از سه دسته از نورون ها در شبکیه تشکیل شده است.** (a) بافت اصلی چشم. نور ورودی از قرنیه عبور نموده، توسط عدسی متمرکز می‌شود و سلول‌های حساس به نور را در شبکیه فعال می‌سازد. عنبیه مقدار نور ورودی به عدسی را محدود می‌نماید. عدسی توسط رشته‌های مژگانی (zonular fiers) پشتیبانی شده و با ماهیچه‌های مژکی (ciliary muscle) حرکت می‌نماید. چشم از مایع شفاف، بالشتکی (cushioning) و شیشه مانند پر شده است. حفره (fovea) ناحیه‌ای است که بیشترین چگالی سلول ها را دارد و در نتیجه بیشتر قدرت تفکیک را حس می‌کند. یک لکه نور (صفحه بینایی) جایی است که در آن عصب بینایی چشم را ترک می‌کند. **(b)** ساختار دقیق سلول ها در شبکیه. دقت کنید که نور ورودی باید از لایه‌های متعدد نورون ها قبل از رسیدن به گیرنده نوری استوانه‌ها و مخروط ها عبور کند. نورون‌های بینابینی شامل سلول‌های افقی، سلول‌های دو قطبی که حدوداً دوجین نوع دارند، و سلول‌های آماکرین که بیش از ۲۰ نوع دارند، هستند. سلول‌های گانگلیون شبکیه اطلاعات پیام را به عصب بینایی انتقال می‌دهند. دو لایه شبکه‌ای جایی‌اند که بیشتر ارتباطات صورت می‌گیرد.

شبکیه انسان (شکل ۲۴b ـ۲۳) حدود ۲۰۰μm ضخامت دارد. همانطور که در فصل ۱۵ یاد گرفتیم، دو نوع گیرنده نوری دارد، استوانه‌ها و مخروط ها که گیرنده‌های اولیهٔ تحریک نوری‌اند. مخروط ها در دیدن رنگ نقش دارند در حالی که استوانه‌ها توسط نور ضعیف مثل نور ماه در یک محدوده طول موج، تحریک می‌شوند. برخلاف خیلی از نورون‌های حسی، سلول‌های گیرنده نوری هیپرپلاریزه می‌شوند نه دپلاریزه. گیرنده نوری روی لایه بالای لایه نورون‌های بینابینی که با انواع ترکیبات سلول‌های گیرنده نوری تحت تأثیر قرار می‌گیرند سیناپس تشکیل می‌دهند. همه این پیام ها توسط بخشی از مغز بنام قشر بینایی تفسیر می‌شوند. در هر چشم حدود ۶ میلیون مخروط و ۱۲۰ میلیون استوانه وجود دارد که ۵۴۰ میلیون سلول قشر بینایی را مرتبط می‌نمایند، به طوری که بخشی از سیستم عصبی، وقف مشاهده و تفسیر نور می‌شود.

استوانه‌ها به خاطر رنگدانه‌های حساس نوری و توانایی‌شان در تشدید یک پیام ضعیف، نور ضعیف را تا حد یک فوتون تشخیص می‌دهند. استوانه‌ها یک رنگدانه دارند که به طیف وسیعی از طول موج ها اجازه پاسخ می‌دهند. مخروط ها (شکل ۲۵ـ۲۳) سه نوعند: قرمز، سبز و آبی. مغز با مقایسه پیام‌های این سه نوع سلول مخروطی (یکی از هر کدام) که پایه دریافت‌کننده مشترک دارند، اطلاعات رنگ را درک می‌کند. پایه دریافت‌کننده هر سلول به صورت زاویه‌دار است



▲ **شکل ۲۵ـ۲۳ میله ها و مخروط‌ها.** مهره داران دو نوع گیرنده نوری دارند، استوانه‌ای و مخروطی که از لحاظ ریختی و عملکردی با هم تفاوت دارند. مخروط ها رنگ را آشکار نموده، استوانه‌ها شدت نور را آشکار می‌نمایند ولی نسبت به مخروط ها به مقدار کم نور حساستر هستند. رنگدانه‌هایی که نور را جذب می‌نمایند در دیسک‌های پهنی در بخش خارجی استوانه‌ها و مخروط ها جمع می‌شوند. دقت کنید که بخش خارجی که حاوی این رنگدانه هاست روی بخش داخلی شبکیه قرار دارد، در نتیجه نور باید از لایه‌های سلول ها قبل از اینکه به اندامک‌های حسی برسد عبور نماید.

که رأس آن روی سلول قرار می‌گیرد. اگر سلول‌ها متراکم باشند و هریک پایهٔ کوچک دریافت‌کننده‌ای داشته باشند، اطلاعات بصری بسیار جزئی جمع‌آوری می‌شود. اگر سلول ها تراکم کمتری داشته باشند و پایه‌های دریافت‌کننده بزرگی داشته باشند یا هر دوی اینها، تصویرشان وضوح کمتری خواهد داشت.

استوانه‌ها و مخروط ها رنگدانه‌هایی دارند که از پروتئین اپسین تشکیل شده است که بطور کوالان به یک مولکول حساس به نور به نام ۱۱ـ سیس رتینال می‌چسبد. این رنگدانه ها در دیسک‌های غشایی پهنی در بخش خارجی استوانه‌ها و مخروط‌ها قرار دارند (شکل ۲۵ـ۲۳؛ همچنین شکل ۱۶ـ۱۵ را ملاحظه کنید)، دیسک‌های حاوی اپسین به طور مداوم جایگزین شده و هر ۱۲ روز یکبار کاملاً بازیافت می‌شوند. اُپسین‌ها، گیرنده‌های متصل به G-پروتئینی هستند که وقتی رتینال متصل به آن ها نور را جذب می‌کند فعال می‌شوند. رنگدانه استوانه‌ها، رودوپسین نامیده می‌شود. ایزومریزاسیون پروتئین رتینال رودوپسین که توسط نور القا شده، ساختار پروتئین را تغییر داده و یک مسیر پیام رسانی را شروع می‌نماید که کانال‌های Na^+ و Ca^{2+} را در غشای سلول استوانه‌ای می‌بندد (شکل ۱۸ـ۱۵ را ملاحظه کنید). رنگدانه‌های این مخروط حاوی انواع مختلف اپسین ها است ولی شبیه رودوپسین ها عمل می‌نمایند. تیزهوشی بصری به نحوه تولید مجدد نور ورودی به صورت پیام‌های پتانسیل عمل در نقشه شبکیه و در طول مدار است. چگالی و تعداد استوانه‌ها نشان می‌دهد که وضوح تصویر بیشتر از آنچه است که ما واقعاً می‌بینیم. در واقع، پیام ها توسط تعدادی سلول‌های دوقطبی کمتر پوشش داده می‌شود. در نتیجه بخشی از وضوح از بین می‌رود. بیشتر رتیناها چگالی کمتری از سلول‌های استوانه‌ای و سلول‌های مخروطی پراکنده دارند. در اینجا استثنا در یک ناحیه مرکزی بنام حفره چشم، است (شکل ۲۴a ـ۲۳) که بیشتر از سلول‌های مخروطی تشکیل شده است و در $300\mu m$ قطر آن حدود ۱۵۰ سلول وجود دارند. در حفره چشم سلول‌های مخروطی پایه‌های دریافت‌کننده کوچکی دارند (با بزرگی ۰/۰۱ درجه) که موجب ارائه الگوهای نور ورودی با وضوح بالا می‌شود. پایه‌های دریافت‌کننده سلول‌های مخروطی عموماً بزرگترند که تا چندین درجه می‌شود. در نتیجه دقت تصویر را کاهش می‌دهد. در نور کم، دیدِ ما تار می‌شود چون به جای مخروط ها وابسته به استوانه‌ها هستیم.

چشم ها تاریخ تکاملی را منعکس می‌نمایند

ساختار چشم موجودات زنده تاریخ تکاملی متفاوت آن ها را منعکس می‌نماید. چشم‌های جانوران ساده‌تر مثل پلاناریا از اعصاب نوری حساس به نور همراه با سلول‌های رنگدانه‌ای بدون عدسی یا واسطه‌های دیگر برای دستیابی به یک تصویر واضح تشکیل شده است. در مقابل، چشم‌های مرکب حشرات صد ها عدسی دارد که یکی برای هر بخش چشم می‌باشند (شکل ۲۱ـ۱۶ را ملاحظه کنید). هنوز، برخی از پروتئین‌هایی که رشد چشم را تنظیم می‌نمایند همان نقش را در جانوران زیادی که چشم‌های بسیار متفاوتی دارند بازی می‌کنند. یکی از عجیب‌ترین ویژگی‌های شبکیه انسان، که به روشی که چشمان ما از ساختارهای حساس به نور اولیه تکامل می‌یابند ایجاد شده است، این است که سلول‌های حساس به نور، پشت مجموعه‌ای

از ارتباطات نورونی قرار می‌گیرند. نور باید از عدسی، مایع زجاجیه و آکسون ها و دندریت ها و نورون‌های بینابینی قبل از رسیدن به گیرنده‌های نوری عبور کند (شکل ۲۴b-۲۴ را ملاحظه کنید؛ به جهت نور ورودی توجه نمایید). در مقایسه با طرح مطلوب آشکارسازهای نوری، چشم به سمت عقب است. همچنین این آرایش علت وجود لکه کور است جایی که اعصاب نوری ارتباط می‌یابند، و نور حس نمی‌شود.

اطلاعات جمع آوری شده از سلول‌های گانگلیون تصاویری از جهان اطراف ما تشکیل می‌دهد

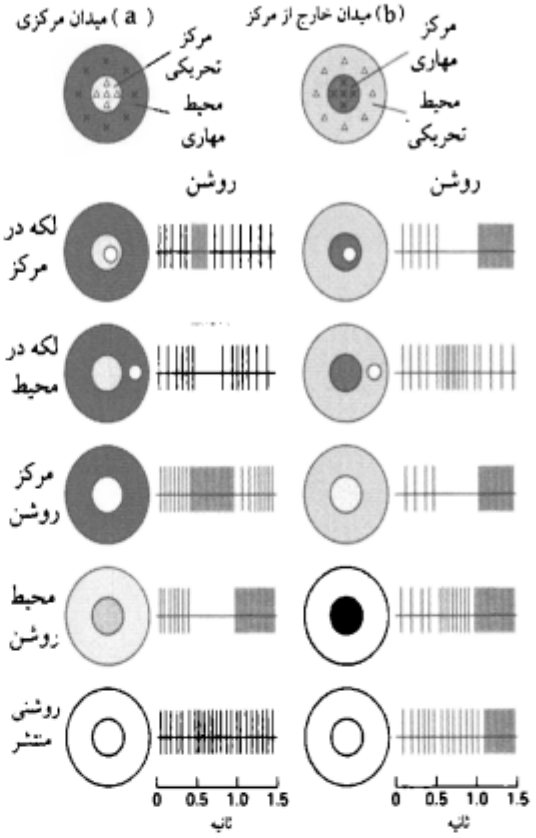
اگر هر سلول گیرنده نوری به نقطه کوچکی از نور پاسخ دهد، چگونه تصویر بزرگتری از جهان را تشکیل می‌دهد؟ مجموعه نورون ها در دستگاه بینایی این مشکل را به نظر برطرف نشدنی جلوه می‌دهد. خوشبختانه سلول ها به صورت سلسله مراتبی ساده سازمان یافته‌اند که به پیشرفت قابل توجه آن ها کمک می‌نماید. اولین مرحله پردازش اطلاعات در شبکیه انجام می‌شود که بلافاصله پس از دریافت توسط نورون‌های بینابینی است (شکل ۲۴b-۲۳ را ملاحظه کنید). در واقع، پردازش اطلاعات بصری در سیناپس‌های اولیه شروع می‌شود که سلول گیرنده نوری با نورون‌های بینابینی مرتبط می‌شود. نورون‌های بینابینی به پیام‌های گرفته شده از سلول‌های مختلف گیرنده نوری اجازه ترکیب شدن و مقایسه می‌دهند. زمانی که پیام ها چشم را از طریق آکسون‌های سلول‌های گانگلیون شبکیه که از اعصاب بصری تشکیل شده‌اند ترک می‌کنند، هر پیام فقط یک نقطه از نور را انتقال نمی‌دهد بلکه الگویی را منتقل می‌نماید. اجازه دهید با نگاهی به اینکه چه الگوهایی از اطلاعات در شبکیه ظاهر می‌شود، شروع کنیم.

دستیابی تجربی به این مشکل از ثبت‌های الکتریکی با الکترودهای وارد شده در سلول‌های گانگلیون گرفته شده است استفاده می‌نماید. به طور همزمان چشم یک جانوری بی هوش در معرض لکه‌های کوچک نور که روی شبکیه می‌درخشیدند، قرار گرفت. اولین مرحله تعیین بخشی از شبکیه است که سلول خاصی را که الکترودها به آن وارد شده است تحریک می‌نماید. سپس، تنوعاتی در اندازه، شکل و جایگاه لکه نورانی مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

جالب توجه اینکه سلول‌های **دوقطبی** (شکل ۲۴b-۲۳، به رنگ ارغوانی نشان داده شده است) و سلول‌های گانگلیون شبکیه که به آن ها مرتبط می‌شوند (شکل ۲۴b-۲۳، به رنگ زرد نشان داده شده است) به الگوهای خاصی از روشن نمودن شبکیه حساسند. چون سلول گیرنده نوری (استوانه‌ای یا مخروطی) نور و پیامی را از سلول‌های گیرنده نوری مجاور دریافت می‌نماید، چنین امری محتمل است. این پیام‌های جانبی توسط سلول‌های افقی که یک نوع نورون بینابینی‌اند حمل می‌شوند. در اصل، هر سلول گیرنده نوری آنچه راکه می‌بیند با آنچه که می‌فهمد همسایه‌هایش می‌بینند، مقایسه می‌کند. اجازه دهید به پیامدهای چنین نظمی بنگریم. پایه دریافت‌کننده یک سلول دوقطبی تقریباً مدور است و اطلاعاتش به یک سلول گانگلیون در شبکیه منتقل می‌شود که همان پایه را دارد. یک سلول دوقطبی ورودی ها را از گروهی از سلول‌های گیرنده که یک ناحیه حلقوی را پوشانده‌اند، دریافت می‌کند. هر سلول دوقطبی پیام ها را از دایره متفاوتی از سلول ها دریافت می‌کند. این نوع الگوهای پایه دریافت‌کننده «دوایر متحدالمرکز[1]» نامیده می‌شوند. (شکل ۲۶-۲۳). یک شکل مهم دیگر اینست که؛ یک سلول دو قطبی به نوری که در مرکز پایه دریافت‌کننده‌اش قرار می‌گیرد (گروه سلول‌های گیرنده نزدیک به مرکز حلقه) با تولید یک سری پتانسیل‌های عمل پاسخ می‌دهد. به هرحال، اگر نور به سلول‌های گیرنده نوری که بخش مرکزی حلقه را احاطه کرده‌اند، برخورد کند پتانسیل‌های عمل مهار می‌شوند (شکل ۲۶a-۲۳). این نوع سلول یک سلول مرکزی است چون نور به مرکز پایه هدایت شده و سلول را روشن می‌کند. برخی سلول‌های دوقطبی و در نتیجه سلول‌های گانگلیون شبکیه‌ای مطابق با آن ها فقط پاسخ مخالف را می‌دهند. نور در مرکز، فراوانی پتانسیل عمل راکاهش می‌دهد، در حالی که نور در محیط، پتانسیل‌های عمل فراوان‌تری را تحریک می‌نماید (شکل ۲۶b-۲۳). این یک سلول خارج از مرکز است. دو نوع سلول مرکزی و خارج از مرکز به تعداد مساوی وجود دارند. هر دو نوع سلول شدت نور نسبی را در مرکز نسبت به محیط و نه مقدار دقیق نور را در هر یک از نواحی حس می‌کنند. پس سلول‌های دوقطبی گانگلیون شبکیه آشکار سازهای تباینی[2] هستند.

چگونه سلول‌های دوقطبی اطلاعات سلول گیرنده نوری را جمع می‌نمایند تا الگوهای متحدالمرکز را مشاهده نمایید. ما برای پاسخ به این سؤال، به ارتباط سلول‌های گیرنده نوری مخروطی با نورون‌های بینابینی دوقطبی و افقی، خواهیم پرداخت (شکل ۲۴b-۲۳ را ملاحظه کنید). سلول‌های دوقطبی مرکزی و خارج از مرکز از نظر نوع پروتئین‌های کانالی که استفاده می‌نمایند فرق دارند. در نتیجه پاسخ مخالف به یک نوروترانسمیتر گلوتامات می‌دهند. در اینجا برای سادگی، ما روی سلول‌های دوقطبی تمرکز می‌نماییم. سلول‌های

1- Center-surounded 2- Contrast detector

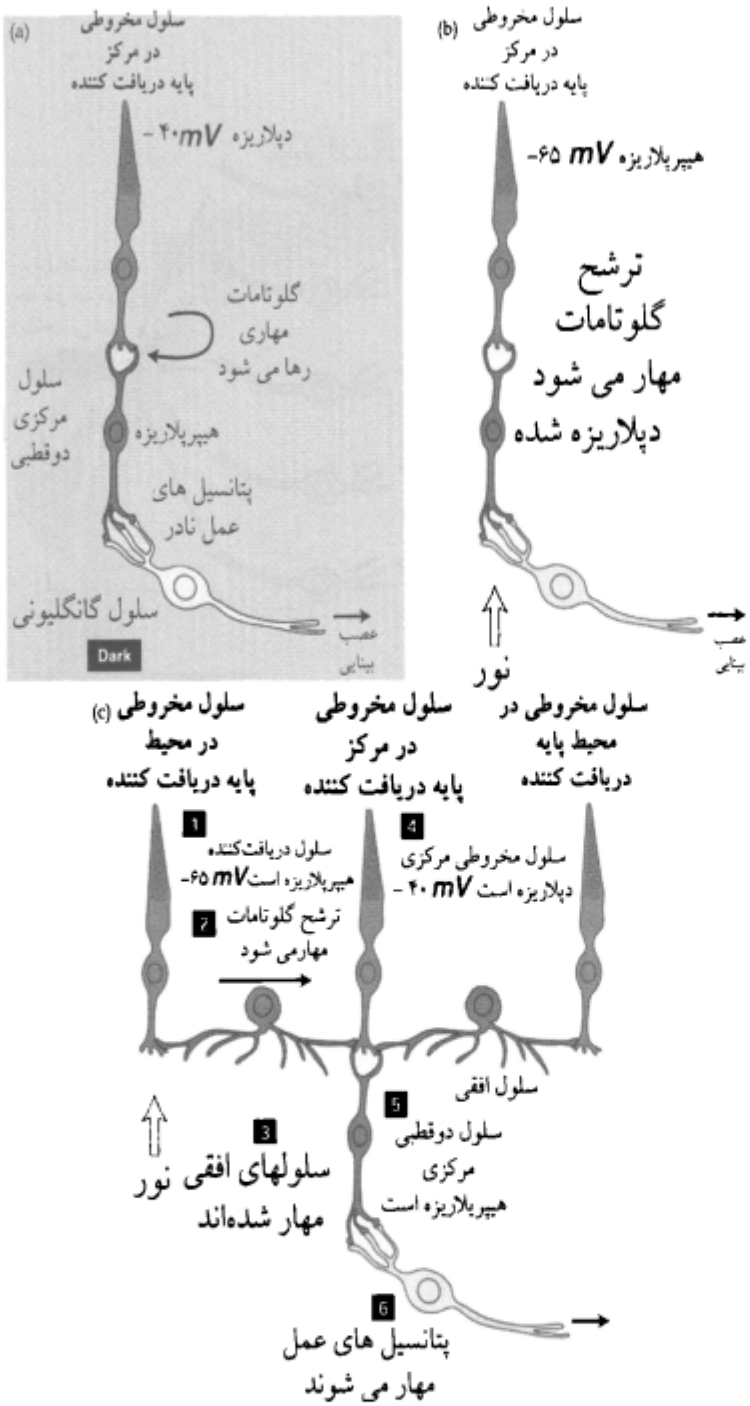


▲ **شکل ۲۶ـ۲۳ پایه‌های دریافت‌کننده محیط مرکز نورون‌های شبکیه.** هر سلول گانگلیون شبکیه به یک پایه دریافت کنندهٔ حلقوی پاسخ می‌دهد که با بخش ویژه‌ای از شبکیه مطابقت دارد. با قرار دادن چشمان در معرض الگوهای روشنی متفاوت و ثبت همزمان نورون‌های گانگلیون شبکیه، محققان کشف نموده‌اند که هر نورون به یک میدان حلقه (دونات) مانند، با الگویی که به صورت دایره متحدالمرکز توصیف می‌شود، پاسخ می‌دهد. برخی سلول ها قطاری از پتانسیل عمل را هنگامی که مرکز تاریک است و محیط روشن است (میدان خارج مرکزی) راه می‌اندازد؛ عده‌ای دیگر به الگوی مخالف پاسخ می‌دهند (میدان مرکزی). **(a)** یک میدان مرکزی: لکه روی مرکز: یک لکه نوری که روی مرکز میدان سلول ها متمرکز شده و یک سری یا قطاری از پتانسیل‌های عمل را آغاز می‌نماید. مرکز روشن: روشنی کل لکه مرکزی میدان انفجار سریعی از پتانسیل‌های عمل را منجر می‌شود. محیط روشن: روشنی کل ناحیه محیطی یک اثر خفه‌کننده قوی روی پتانسیل‌های عمل دارد. روشنی منتشر: روشنی منتشر کل سلول‌های پایه دریافت‌کننده موجب پاسخ ضعیفی می‌شود، یعنی خفگی پاسخ فقط در صورتی دیده می‌شود که مرکز روشن گردد. **(b)** «میدان خارج از مرکز» یک سلول ویژگی ای مخالف با سلول در حالت **(a)** روشن دارد. روشنی یک لکه در مرکز میدان سلول‌های خارج از مرکز پتانسیل عمل را مهار می‌نماید، در حالی که یک لکه نوری در محیط پتانسیل عمل را فعال می‌نماید.

بینابینی دوقطبی و افقی، مثل سلول‌های گیرنده نوری فاقد کانال‌های Na^+ ولتاژی‌اند. در نتیجه هیچکدامشان نمی‌توانند پتانسیل‌های عمل تولید نمایند. در عوض، ترشح نوروترانسمیترها از انتهای سیناپسی سلول ها توسط میزان پلاریزاسیون غشاء کنترل می‌شود. در تاریکی، سلول‌های مخروطی پتانسیل غشایی حدود ۴۰mV - دارند که کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی را باز می‌کند و باعث رهایش مداوم گلوتامات می‌شود (شکل ۲۷a ـ۲۳). این گلوتامات که از سلول‌های مخروطی در مرکز پایهٔ گیرنده حاصل می‌شود. پتانسیل‌های عمل را مهار می‌نماید. نوری که به مرکز میدان سلول‌های مخروطی برخورد می‌کند آن ها را تا ۶۵mV - با مهار جریان رو به داخل Na^+ و یون‌های دیگر، بستن کانال‌های Ca^{2+} و کاهش نشرِ گلوتامات هیپرپلاریزه می‌نماید (شکل ۲۷b ـ۲۳). این امر باعث دپلاریزاسیون نورون دوقطبی می‌شود که در عوض سلول‌های گانگلیون را دپلاریزه می‌نماید و پتانسیل‌های عمل را برای رسیدن به مغز، آغاز می‌نماید.

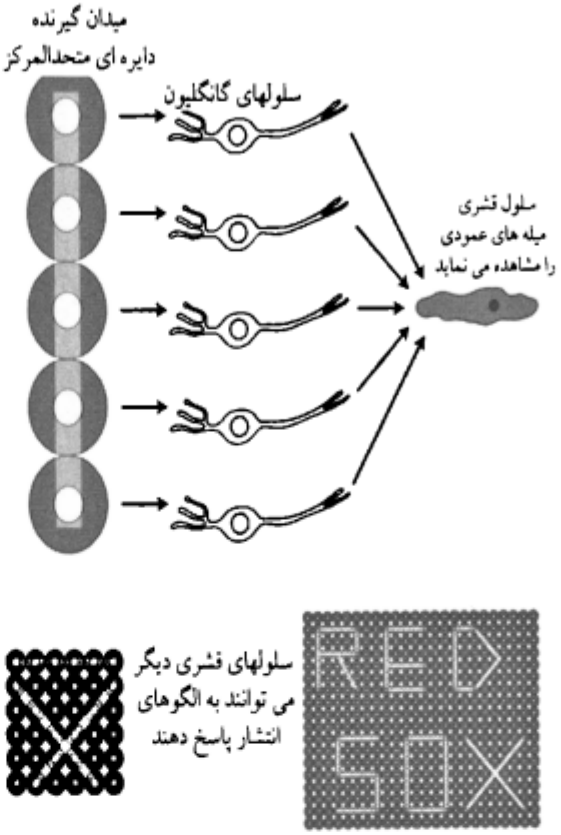
اگر سلول‌های مخروطی در مرکز میدان گیرنده، فعال شوند و سلول‌های مخروطی محیطی در تاریکی باشند سلول‌های دوقطبی مرکزی تا بیشترین حد تحریک می‌شوند. چگونه سلول‌های دوقطبی شرایط نور را در بخش محیطی پایه گیرنده حس می‌کنند؟ ورودی محیطی توسط نورون‌های بینابینی سلول افقی وساطت می‌شود (شکل ۲۴b ـ۲۳، سلول‌های سبز ر ا ملاحظه کنید). اگر نور در ناحیه محیطی میدان روی سلول مخروطی وجود داشته باشد، سلول افقی که به آن سلول مخروطی متصل است، هیپرپلاریزه می‌شود که به معنی کاهش رهایش انتقال دهنده مهاری به سلول مخروطی در مرکز پایه گیرنده است. سلول مرکزی مخروطی اگرچه در تاریکی بوده است دپلاریزه می‌شود و در نتیجه سلول دوقطبی در مرکز پایه گیرنده هیپرپلاریزه می‌شود (شکل ۲۷c ـ۲۳ را ملاحظه کنید). پتانسیل‌های عمل سلول گانگلیون در مرکز میدان علی رغم افتادن نور به سلول‌های مخروطی مرکزی مهار می‌شوند. پس نور در محیط درک نور را در مرکز مهار می‌نماید که این یک آشکارساز تباینی است.

پردازش اطلاعات بصری شبکیه فقط شروع یک زنجیره سلسله مراتبی نمایش الگو و وقایع تفسیر می‌باشد. پردازش بهبود یافته اطلاعات بصری با آموزش‌های خواندن پتانسیل‌های عمل که از چشم می‌آیند (اگر در یاد بمانند) صورت می‌گیرد. در قشر بینایی، سلول‌هایی یافت می‌شوند که به طور ویژه حساس به استوانه‌های نور و تاریکی می‌باشند و هر سلول استوانه‌ها را در زاویه خاص ترجیح می‌دهد. دیدن اینکه اطلاعاتی (اطلاعات متحدالمرکز) که از



◀ **شکل ۲۷ـ۲۳ اثر نور و تاریکی روی سلول‌های مخروطی مرکزی در تفسیر تصویر.** (a) در تاریکی، یک سلول مخروطی در مرکز سلول گیرنده دپلاریزه است که منجر به رهایش گلوتامات می‌شود. گلوتامات سلول دوقطبی را مهار می‌نماید که موجب هیپرپلاریزاسیون آن و بنابراین جلوگیری از پتانسیل‌های عمل کامل ولی نادر می‌شود. توجه کنید که سلول‌های دوقطبی خارج از مرکز، به گلوتامات پاسخ مخالف می‌دهند. (b) وقتی نور به سلول مخروطی برخورد می‌کند، هیپرپلاریزه می‌شود در نتیجه کاهش سریع در ترشح گلوتامات حاصل می‌شود. جدا از اثرات مهارکننده گلوتامات، سلول دوقطبی دپلاریزه می‌شود و پتانسیل‌های عمل فراوان حاصل می‌شوند. (C) فعالیت سلول مخروطی تحت تأثیر سلول‌های مخروطی اطرافش از طریق سلول‌های افقی که سلول‌های همسایه را به هم مرتبط می‌نمایند می‌شود. اگر فقط سلول‌های مرکزی فعال شوند، یک سلول سلول‌های دوقطبی و در نتیجه گانگلیون را تحریک خواهد نمود. اگر هر دو سلول‌های مرکزی و محیطی فعال شوند، پیام سلول مرکزی به سلول دوقطبی مهار خواهد شد. پس این سیستم یک آشکارساز تباینی است که الگوهای خود را در لکه مرکزی کوچکی جستجو می‌کند، ولی شبکیه محیطش را جستجو نمی‌نماید. در اینجا مراحل عبارتند از: برخورد نور به سلول مخروطی در محیط یک پایه گیرنده موجب هیپرپلاریزاسیون می‌شود. (❶) که منجر به کاهش رهاسازی گلوتامات می‌شود. (❷) در عوض، این امر منجر به هیپرپلاریزاسیون سلول افقی می‌شود که خود باعث رهایش انتقال دهنده‌های مهارکننده به سلول مخروطی مرکزی می‌شود. (❸) سلول مخروطی مرکزی، در غیاب مهار از سلول‌های محیط، دپلاریزه است، (❹) در نتیجه به نور حساسیت ندارد و افزایش رهایش گلوتامات را به سلول دوقطبی مرکزی همانند شکل (a) موجب می‌شود. پس سلول دوقطبی هیپرپلاریزه است (❺) و موجب مهار پتانسیل‌های عمل می‌شود. (❻) اشکال شماتیک نشان داده شده بسیار ساده‌سازی شده‌اند، چون همه سلول ها می‌توانند به بیش از یک سلول در هر مرحله از انتقال پیام مرتبط شوند.

سلول‌های گانگلیون شبکیه عبور می‌نمایند، چگونه می‌توانند یک استوانه نور یا تاریکی را مشاهده نمایند، مشکل است. اگر یک سلول قشر بینایی توسط سلول‌های گانگلیون که میدان‌های بینایی یشان در یک خط آرایش یافته‌اند تحریک شود، الگوی کل می‌تواند به شکل استوانه‌ای باشد که از مرکز الگوهای متحدالمرکز سلول گانگلیون عبور می‌نماید (شکل ۲۸ـ۲۳). ترکیب‌های بیشتر می‌تواند منجر به تشخیص الگوهای پیچیده‌تر توسط یک سلول منفرد شود. برخی سلول ها به یک تغییر نور (روشن به خاموش یا خاموش به روشن)



▲ **شکل ۲۸-۲۳ تشخیص الگوی پیچیده.** یک سلول قشری به مجموع چندین «مرکز» سلول گانگلیون پاسخ می‌دهد، بنابراین میله عمودی را که نشان داده شده است، آشکار می‌سازد. سلول‌های قشری دیگر به ترکیبات متفاوتی از میدان‌های گیرنده گانگلیون یا ترکیبی از میدان‌های نورون‌های قشری پاسخ می‌دهند تا الگوهای پیچیده‌تر تشخیص داده شوند.

پاسخ می‌دهد. بقیه به لبه‌ها، لکه‌های در حال حرکت یا میله‌های در حال حرکت پاسخ می‌دهند. برخی سلول ها در مراتب بالاتر قشر بینایی حتی یک شکل خاص را تشخیص می‌دهند.

سلول‌هایی که اطلاعات فضایی را از سلول‌هایی که پایه‌های گیرنده ساده دارند، می‌گیرند توسط دیوید هوبل، برنده جایزه نوبل، به همراه همکارش تورستل ویسل کشف شد:

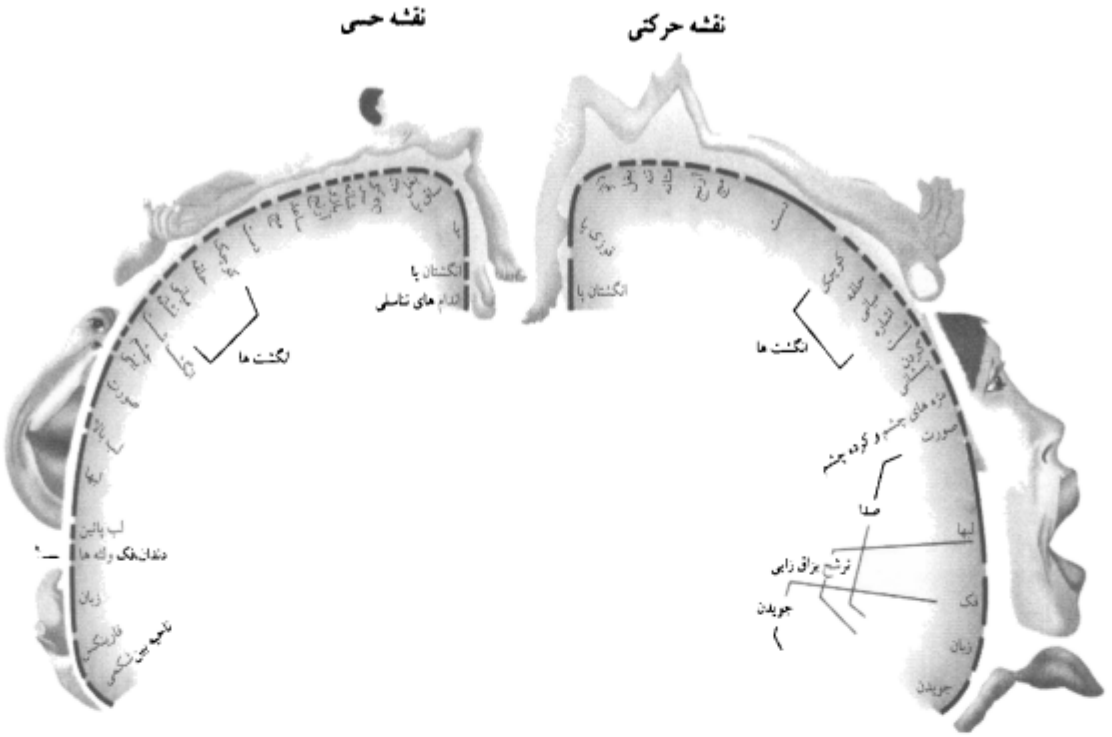
اولین کشف واقعی ما خیلی شگفت‌انگیز بود. برای سه الی چهار ساعت، ما به هیچ جا نرسیدیم. سپس به تدریج شروع به استنباط برخی نکات مبهم و پاسخ‌های متناقض که از تحریک ناحیه‌ای در وسط شبکیه حاصل شده بودند، نمودیم. ما اسلایدهای شیشه‌ای را در لکه سیاه آن درون شکاف افتالموسکوپ[1] نمودیم وقتی که ناگهان روی مونیتور صدا، سلول مانند یک تفنگ ماشینی دررفت. پس از چند بار ترکیب کردن کار ها و انجام دادن کارهای بیهوده، فهمیدیم که چه اتفاقی می‌افتد. پاسخ هیچ ربطی به لکه سیاه نداشت. وقتی اسلاید شیشه‌ای وارد می‌شد، لبه‌اش روی شبکیه سایه‌ای ضعیف ولی واضح می‌انداخت که به صورت یک خط تاریک مستقیم روی یک زمینه روشن بود. این آنچه که سلول می‌خواست بود و همچنین سلول فقط این را در یک محدوده باریک از آرایش ها می‌خواست. قبلاً چیزی در این مورد نشنیده بودیم. اکنون سخت است باور کنیم که چقدر ما از آنچه که سلول‌های قشری در زندگی روزانه یک حیوان انجام می‌دادند، بی اطلاع بودیم.

سلول‌های مکانیکی - حسی، درد، گرما، سرما، لمس، و فشار را درک می‌کنند

پوست ما، خصوصا پوست انگشتانمان در جمع‌آوری اطلاعات حسی ماهر است. در واقع، همه بدن ما دارای تعداد زیادی **گیرنده‌های مکانیکی**[2] است که در بافت‌های مختلفش قرار دارند. این گیرنده ها اغلب باعث آگاهی ما از لامسه، ناحیه و حرکات اعضا یا سر، درد، و درجه حرارت می‌شوند. پستانداران از یک سری سلول‌های گیرنده‌ای استفاده می‌نمایند که لمس و یکسری گیرنده‌های دیگر دما، گرما و درد را حس می‌نماید. گیرنده‌های درد، بنام نوسیسپتورها[3] به تغییرات مکانیکی، گرما و مواد شیمیایی سمی (مثل فلفل تند) پاسخ می‌دهند. عدم حساسیت ژنتیکی به درد اغلب به خاطر جهش در ژن‌های trk می‌باشد که گیرنده فاکتور رشد (NGF) را کد می‌نماید که پروتئینی است که بیشتر در محیط‌های مختلف مطالعه می‌شود. اکنون، NGF و نوروتروفین‌های دیگر به عنوان علائم درد توصیف می‌شوند. گیرنده‌های حرارتی تغییرات دما را درک می‌کنند. این سلول ها به طور ثابت (۲.۵ بار در ثانیه) پتانسیل‌های عمل را می‌فرستند که نشان دهنده دمای کنونی آنهاست. هر محدوده دمایی گیرنده‌هایی دارد که با آن هماهنگ هستند چنانکه سلول‌هایش که عمل می‌نمایند دما را هدایت می‌نمایند.

ارتباط یافتن سلول‌های حسی پوست به مغز سیناپس‌های زیادی را درگیر نمی‌کند. مثلاً، گیرنده‌های مکانیکی در پوست یا مغز حرام[4] که پیام ها را در طول نورون ها به تالاموس منتقل می‌نمایند، مرتبط می‌شوند. یک نورون سوم از آن‌جا به قشر حسی می‌رود. سه نورون از آن‌جا به محیط قشر مغز می‌روند. در این قشر، ورودی‌های

1- Ophtalmoscope
2- Mechanosensors
3- Nociceptors
4- Meduua



▲ **شکل ۲۹ـ۲۳ همونکولوس.** همونکولوس نقشه‌ای است از نواحی قشر مغز که در عملکردهای خاصی نقش دارند. همونکولوس حسی و حرکتی نشان داده شده‌اند. صورت و دستان بخش‌های بزرگتری از ظرفیت حسی و حرکتی مغز را اشغال می‌نمایند.

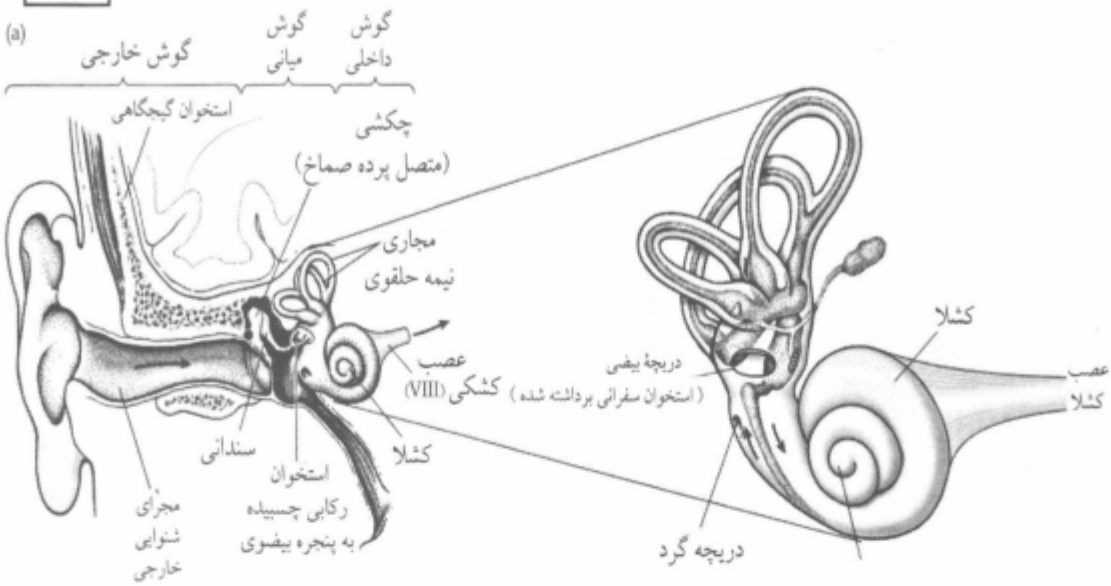
حسی (از طریق نورون‌های بینابینی) با ورودی‌های پروپریوسپتیو[۱] که نواحی ماهیچه ها و مفصل ها را گزارش می‌نمایند ترکیب می‌شوند. این امر، مکان درک آنچه شما حس می‌کنید و اینکه بازویی که در آن ناحیه حس می‌کنید کجا باید باشد را فراهم می‌نماید. گیرنده‌های پروپریوسپتیو چندین شکل مختلف به خود می‌گیرند. برخی از این ها دوک ماهیچه‌ای‌اند که تجمعات حسی می‌باشند که در ماهیچه ها مدفون شده‌اند و اینکه یک ماهیچه چقدر اتساع می‌یابد را گزارش می‌دهند. چنین گیرنده‌های کششی ای برای حرکت ملایم و پاسخ‌های زمان‌بندی شده، ضروری‌اند.

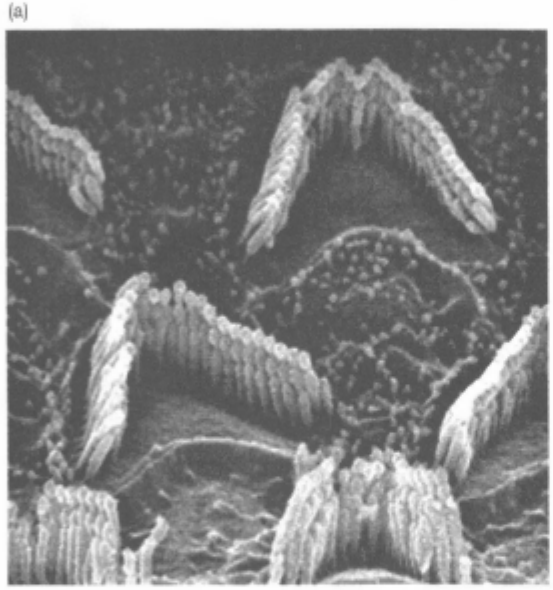
ساختمان بدن در یک نقشه یا دقیق‌تر بگوییم در چندین نقشه در مغز منعکس شده است. ساختمان نورون‌های قشری که به پیام‌های حسی پاسخ می‌دهند از لحاظ فیزیکی به نواحی فضایی پیام ها بستگی دارد. در مغز نورون‌های حسی به صورت یک نقشه بد شکل از بدن نشان داده شده‌اند. نورون‌های حرکتی نیز در یک نقشه می‌تواند با ماهیچه‌هایی که آن را کنترل می‌نمایند چیده شوند. این نقشه‌ها همونکلوس[۲] حسی یا همونکلوس حرکتی نامیده می‌شوند (شکل ۲۶ـ۲۳). همونکلوس یک «انسان کوچک» است که تصویر ماست. ابعاد نقشه متناسب با ابعاد بدن نمی‌باشند، چون همونکولوس‌ها نشان دهنده تعداد سلول‌های حسی یا حرکتی به جای سطح بدن می‌باشند. دست‌ها و پاها خیلی بزرگ نشان داده می‌شوند و فضای زیادی از نقشه حسی را اشغال می‌نمایند.

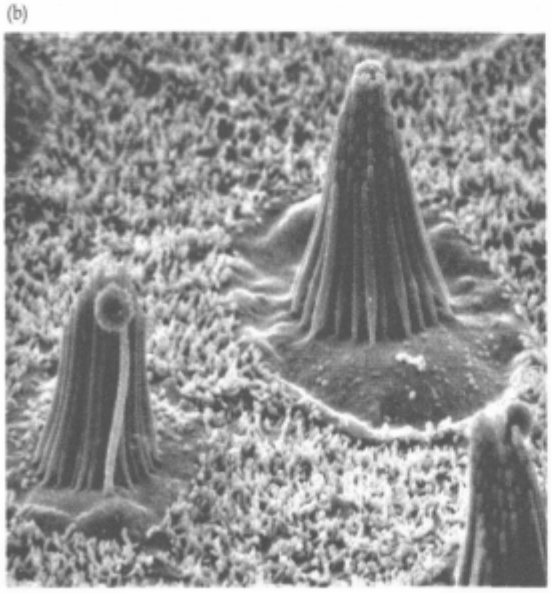
سلول‌های گوش داخلی صدا و موقعیت را منعکس می‌نمایند

گوش خارجی صدا را می‌گیرد که سه استخوان زیر (اسیکل[۳]) را در گوش میانی حرکت می‌دهند که این خود حرکات القا شده توسط صدا را به گوش داخلی یا کُشلا[۴] انتقال می‌دهد (شکل ۳۰a ـ۲۳). کشلا مثل یک حلزون با حدوداً سه پیچ است و واقعا نام آن از کلمه یونانی «حلزون» (کُشلا) گرفته شده است. کُشلا روی **اندام کورتی** قرار دارد که بخش حسی گوش داخلی است که حرکات مکانیکی را به تحریکات الکتریکی تبدیل می‌کند. اندام کورتی[۵] حدود ۱۶۰۰۰ سلول مویی[۶] دارد که در چهار ردیف آرایش یافته‌اند (شکل c و ۳۰b ـ۲۳) و به حدود ۳۰۰۰۰ نورون آوران چسبیده‌اند که هر پیامی را

1- Proprioceptive
2- Homunculus
3- Oscicles
4- Cochela
5- Organ of Corti
6- Hair cell







◀ **شکل ۳۰ـ۲۳ ساختار گوش.** **(a)** صدا وارد گوش خارجی می‌شود و به میانه گوش جایی که سه استخوان کوچک (چکشی، سندانی، و رکابی) ارتعاشات القا شده توسط صدا را از پرده صماخ در طول گوش میانی به سمت گوش داخلی جایی که ارتعاشات مکانیکی به پیام‌های الکتریکی تبدیل می‌شود، انتقال می‌دهند. کُشلای در حالت بازنشده، ۳۳mm طول دارد. **(b)** سطح داخلی اندام کورتی که در کشلا یافت می‌شود، همانطور که با میکروسکوپ الکترونی پویشی (۱) دیده شده است سرهمه مژک‌های شنوایی (سفید) در تماس با غشاء tectonial در گوش دست نخورده است (شکل ۳۱ـ۲۳ را ملاحظه کنید). مژک‌های شنوایی سلول‌های مویی داخلی (ردیف سمت چپ) در یک خط قرار گرفته‌اند، در حالی که سه ردیف از سلول‌های مویی خارجی دارای اشکال **V** مانند مژک‌های شنوایی‌اند. **(c)** بزرگنمایی بیشتر سلول‌های مویی خارجی مژک‌های شنوایی. سلول‌های مویی به استثنای مژک‌ها نرمند، در حالی که سلول‌های پشتیبانی توسط میکروویلی‌ها پوشیده شده‌اند.

1- Scanning electron microscope

به مغز حمل می‌نمایند. سلول‌های مویی مژک‌های شنوایی[1] راتولید می‌نمایند که با نوسانات القا شده توسط صدا حرکت می‌نمایند. نوسانات مژک‌های شنوایی را یکی در میان به یک سمت و سمت مقابلش خم می‌کند و دپلاریزاسیون راکه پتانسیل‌های گیرنده نامیده می‌شوند در ده آکسون یا بیشتر که با هر سلول مویی همراهند، شروع می‌نماید. این پتانسیل‌های گیرنده که ملایم‌تر از پتانسیل‌های عمل کاملند، تا ۲۵mV می‌باشند. سلول‌های مویی و نورون‌هایی که تحت تأثیر آن ها قرار می‌گیرند مسئول فرکانس‌های صدایی متفاوت است. شیبی در خلال کُشلا با فرکانس متفاوت وجود دارد، چنانچه نواحی فضایی سلول‌هایی که تحریک می‌شوند ترکیب فرکانس صدا را نشان می‌دهد. سلول‌های مویی و نورون ها در یک انتهای کُشلا صداهای با فرکانس پایین را می‌شنوند و در انتهای دیگر فرکانس‌های بالا را می‌شنوند. این امر به خاطر تفاوت در هر یک از سلول ها یا نورون ها نیست. حساسیت درجه‌بندی شده به خاطر بافت مخروطی به نام غشا پایه است (شکل ۳۱-۲۳) که در یک انتها به فرکانس‌های پایین و در انتهای دیگر به فرکانس‌های بالا پاسخ می‌دهد. هر فرکانس حرکت را در یک ناحیه خاص از غشاء پایه با طول ۳۳mm تهییج می‌نماید که سپس به سلول‌های مویی نزدیک منتقل می‌شود. آرایش سلول‌های مویی و بخصوص توده‌های مژک‌های شنوایی در آنها، با توجه به غشای پایه‌شان اجازه درک حساس شکست ایجاد شده توسط صدا را نمی‌دهد. قطبیت سلول‌های مویی واسکلت سلولی آنها، عامل انتقال مناسب صدا در پیام‌های الکتریکی است.

برخی از پروتئین‌هایی که ساختار سلول‌های مویی و مژک‌های شنوایی را کنترل می‌نمایند از طریق ژنتیک انسانی، با انتقال ژن‌های مسئول ناشنوایی تعیین می‌شوند. پنج ژن در سندرم اوشر نوع ۱[2] شناسایی شده‌اند که فراوان‌ترین علت ناشنوایی و نابینایی ارثی در انسان می‌باشند. این ژن ها میوزین VIIa، کادهرین ۲۳، پروتوکادهرین ۱۵، یک پروتئین با دُمین PDZ بنام هارمونین[3] و یک پروتئین ساختمانی معروف به نام سانس[4] راکد می‌نمایند. همه این پروتئین ها در مژک‌های شنوایی در دسته‌های موبین شنوایی شناسایی شده‌اند. هارمونین که هم با F- اکتین و هم با کادهرین ها همراه شده است، در این بیماری نقش دارد، در حالی که میوزین VIIa و سانس به هارمونین در مژک‌های شنوایی کمک می‌کنند. این کشفیات از بررسی ژنتیک پزشکی پروتئین ها و آشکار نمودن مژک‌های شنوایی دخیل و حواس شنوایی به دست می‌آید.

پنج مزه اولیه که با زیرمجموعه‌های سلولی هر جوانه چشایی درک می‌شوند

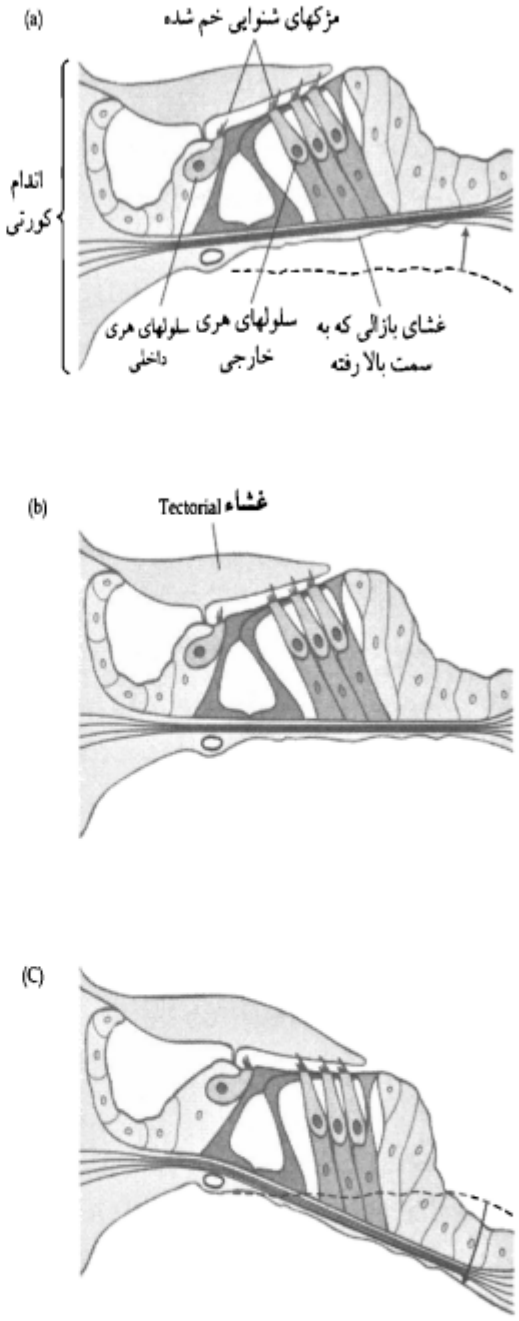
جوانه‌های چشایی در برآمدگی‌هایی بنام پاپیلا[5] قرار دارند که هر جوانه منفذی دارد که مایعی داخل آن جریان دارد. حدود ۱۰۰-۵۰ سلول چشایی در زبان و بخش‌های دیگر دهان فرسایش و پارگی می‌یابند و سلول‌های جوانه چشایی به طور مداوم با تقسیم‌های سلولی در اپی تلیوم زیرینشان جایگزین می‌شوند (یک سلول جوانه چشایی در موش ها طول عمر ۱۰ روز دارد).

سلول‌های چشایی، سلول‌های اپی‌تلیال هستند که برخی عملکردهای نورون ها را نشان می‌دهند. دریافت یک پیام چشایی پتانسیل‌های عمل را آغاز می‌نماید؛ در عوض موجب برداشت Ca^{2+} از کانال‌های Ca^{2+} ولتاژی و رهایش نوروترانسمیترها در سیناپس ها می‌شود. سلول‌های چشایی فاقد آکسونند در عوض در فواصل کوتاه با نورون‌های دیگر پیام رسانی می‌نمایند. در مقابل خیلی از سیستم‌های حسی دیگر، هنوز هیچ تصویر مکان نگاری (توپوگرافیک) در هیچ سطحی از مغز نمی‌توان داشت که نشان دهنده مزه‌های گوناگون باشد.

ما مواد شیمیایی خاصی را که همگی مولکول‌های آبدوست و غیرفرار شناور در بزاق هستند، می‌چشیم. اگر چه همه مزه ها روی همه نواحی زبان حس می‌شوند و هیچ نقشه مکان نگار چشایی برای زبان وجود ندارد ولی سلول‌های خاصی به طور ترجیحی به مزه‌های خاص پاسخ می‌دهند. مزه نیاز کمتری به سیستم عصبی دارد تا بویایی، چون انواع کمتری از مولکول ها در آن وجود دارد. آنچه خیلی مؤثر است، میزان حساسیت چشایی است؛ مولکول‌های تلخ در غلظت‌های پایین‌تر از $10^{-12}M$ یافت می‌شوند. گیرنده‌های شوری، شیرینی، ترشی، umami (مثل منوسدیم گلوتامات و اسیدهای آمینه دیگر) و تلخی (شکل ۳۲c,d,e,f-۲۳) در همه قسمت‌های زبان وجود دارند. دو نوع مختلف گیرنده «طعم»ها وجود دارند: پروتئین کانالی برای مزه‌های شوری و ترشی و پروتئین‌های دارای هفت دُمین گذرنده از غشای (گیرنده‌های متصل به پروتئین G) برای شیرین، umami و تلخی.

شوری توسط اعضای یک خانواده از کانال‌های Na^+ بنام کانال‌های ENaC حس می‌شود اگرچه برای اعضای دیگر این

1- Stereo cilia
2- Usher type1 syndrome
3- Harmonin
4- Sans
5- Papillae



▲ **شکل ۳۱ـ۲۳ (شکل رنگی) حرکت مژک‌های شنوایی.** مژک‌های شنوایی سلول‌های مویی خارجی و داخلی (ارغوانی) توسط حرکات جانبی با توجه به غشای آویزان تحریک می‌شوند که در عوض تحت تأثیر تغییرات فشار مایع نوسان‌کننده در اندام کورتی قرار می‌گیرد. فشار مایع در این اندام با فرکانس صدای ورودی نوسان می‌نماید. **(a)** همانطور که ارتعاش شروع می‌شود غشاء پایه (صورتی) توسط تغییرات فشار مایع (که با فلش ها نشان داده شده) به سمت بالا رانده می‌شود که با توجه به غشای tectorial به یک حرکت به سمت چپ جهت‌گیری می‌شود. بنابراین مژک‌های شنوایی به راست خم می‌شوند. **(b)** در میانه نوسان، مژک‌های شنوایی به حالت استراحت در می‌آیند. **(c)** وقتی نوسان به سمت دیگر می‌رود، و غشاء پایه به سمت پایین حرکت می‌کند (که با فلش ها نشان داده شده) توده‌های مویی در جهت عکس اثر غشای tectorial حرکت می‌کنند.

خانواده از کانالها در عملکردهای متفاوتی مثل حافظه عصبی نقش‌دارند. جریان رو به داخل Na^+ از کانال، سلول را دپلاریزه می‌نماید. نقش کانالهای ENaC به عنوان گیرنده‌های شوری قدیمی است زیرا پروتئین‌های ENaC وضوحاً شوری را در حشرات حس‌می‌کنند. در دروزوفیلا، گیرنده‌های چشایی در چندین مکان شامل پاها، قرار گرفته‌اند به طوری که وقتی مگس روی چیزی طعم‌دار پا می‌گذارد، خرطومش دراز می‌شود تا آن را بیشتر بررسی نماید. به هرحال مطالعات بر روی ENaC با استفاده از لارومگس انجام شده است که اگر هر یک از دو پروتئین ENaC را داشته باشد می‌تواند به شوری پاسخ دهد. دریافت ترشی، درک یون‌های H^+ است که می‌توانند از همان کانالی عبور نمایند که Na^+ عبور می‌کند. همچنین، H^+ به خاطر تداخلش با کانال‌های K^+ و افزایش حاصله در بارهای مثبت داخل سلولی حس می‌شود (یعنی اثر دپلاریزاسیون آن).

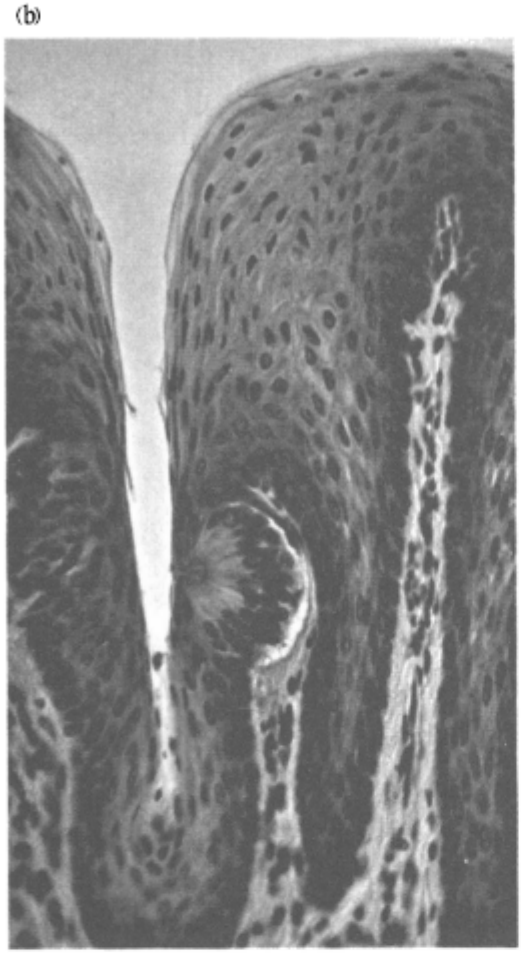
مزه‌های تلخ‌تر متنوع‌تر از شوری‌اند و معلوم شده است که به خانواده‌های متنوعی با حدود ۲۵ ژن که انواع T2Rها را کد می‌نمایند بستگی دارند. T2R پروتئین‌های گیرنده مزه هستند که دارای دُمین‌های مارپیچ آلفای گذرنده از غشاء می‌باشند. آن ها اعضای رده پروتئین‌های شناخته شده گیرنده‌های متصل به G پروتئین (GPCR ها) می‌باشند. این GPCR ها سلول را با شروع کردن فعالیت فسفولیپاز C (PLC) (از طریق G پروتئین‌ها) که غلظت PI3 را افزایش می‌دهند دپلاریزه می‌نمایند (شکل ۳۰ـ۱۵ را ملاحظه کنید). این امر باعث رهایش Ca^{2+} از بخش‌های داخلی سلولی ومتعاقبا دپلاریزاسیون آن می‌شود. یک G پروتئین بنام گاستدیوسین[1] در انتقال مزه تلخ نقش دارد.

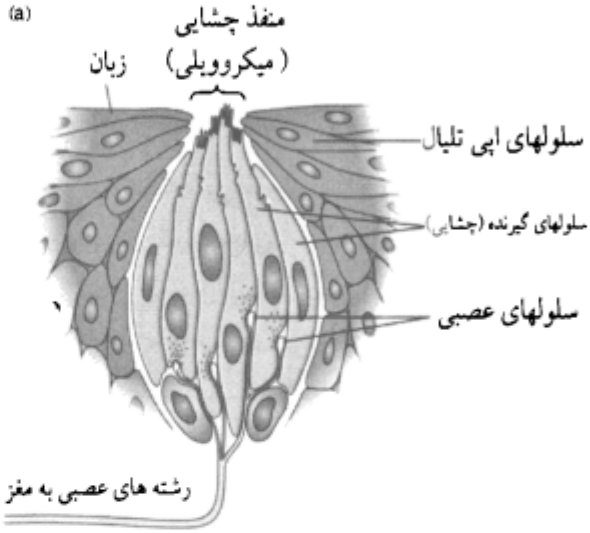
اولین عضو خانواده T2R از مطالعات ژنتیک انسانی حاصل شد که یک ژن آشکارکننده تلخی را روی کروموزوم ۵ نشان داد. چندین نوع T2R می‌توانند در یک سلول چشایی بیان شوند و حدود ۱۵ درصد از این همه سلول‌های چشایی، T2R ها را بیان نمایند. مولکول‌های تلخ مزه ساختار کاملاً مجزایی دارند، که احتمالاً مسئول نیاز به خانواده‌های متنوعی از T2R ها است. موشی که پنج تغییر اسیدی آمینه درگیرنده T2R دارد قادر به چشیدن مزه تلخ سیکلوهگزیمید (یک مهارکننده سنتز پروتئین، فصل ۱) است.

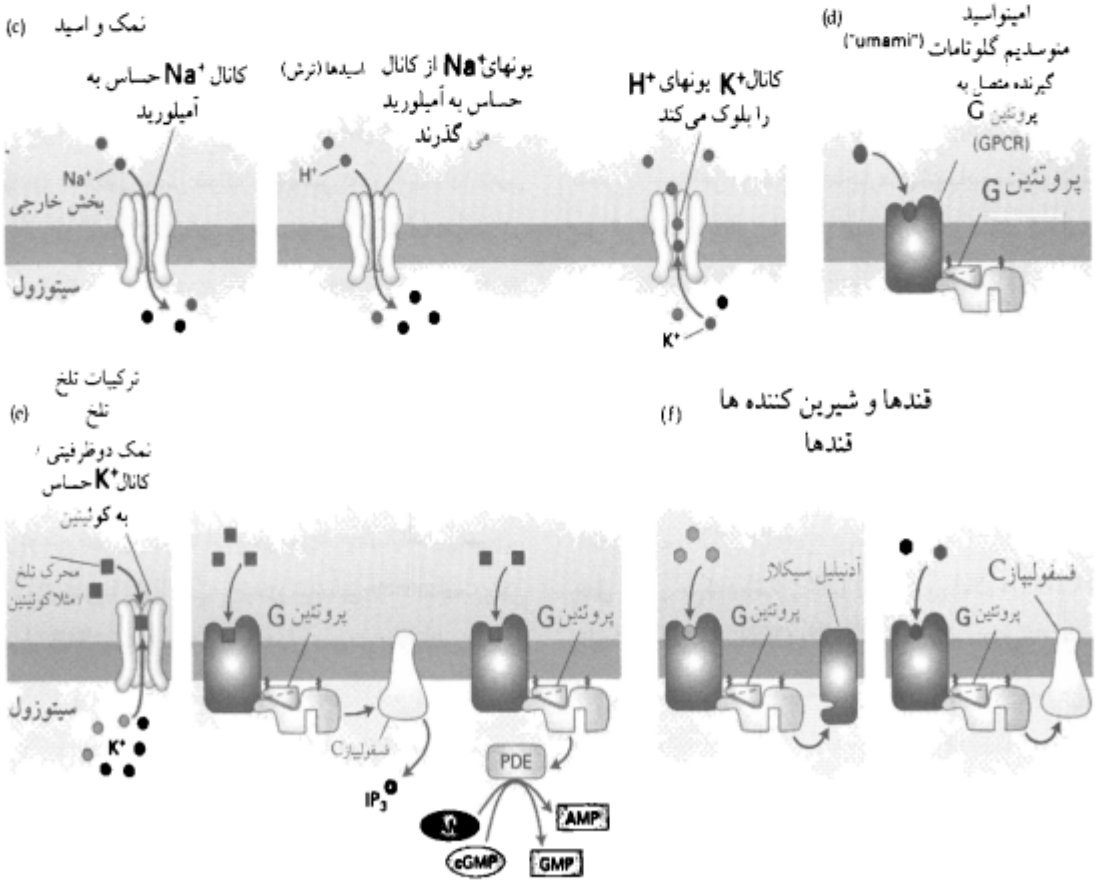
یک آزمایش معاوضه تنظیم ژن برای تعیین نقش پروتئین‌های T2R انجام شد. موش ها برای بیان گیرنده مزهٔ تلخ یعنی یک

1- Gustducin

◀ شکل ۳۲-۲۳ (شکل رنگی) جوانه چشایی پستانداران و گیرنده‌های آن. (a) سلول‌های صورتی سلول‌های چشایی‌اند. این سلول‌های گیرنده اپی تلیال در تماس با سلول‌های عصبی قرار می‌گیرند (زرد). پیام‌های شیمیایی به میکروویلی که در بالا نشان داده شده، می‌رسند. (b) عکس یک جفت جوانه چشایی، نشان دهنده سلول‌های گیرنده. میکروویلی ها در جوانه چشایی سمت چپ کاملاً واضحند. (c-f) انواع گیرنده‌های چشایی







پروتئین T2R، در سلول‌هایی که به طور معمول با احساس مزه شیرین موش ها را جلب می‌کنند، بیان شد. موش ها تمایل زیادی به‌مزه‌های تلخ نشان دادند که آشکارا به علت فرمان مداوم «برو و این را بخور» حتی وقتی مزه تلخ بود، رخ داد. این آزمایش نشان می‌دهد که ویژگی سلول چشایی خود در سلول ها تعیین می‌شود و اینکه پیام‌هایی که آن ها می‌فرستند طبق ارتباطات عصبی ساخته شده توسط این سلول ها تفسیر می‌شود. در عوض این به سیستم بسیار تنظیم شده رده‌های مختلف که سلول‌های گیرنده چشایی را به نواحی ویژه بالاتر در مغز مرتبط می‌سازد، اشاره می‌نماید.

یک مزه تلخ بخصوص به خاطر اینکه اغلب در رده‌های ژنتیکی برای آموزش تنوع انسانی استفاده می‌شود معروف است. فنیل تیوکربامید شیمیایی (PTC)، مزه‌های خیلی تلخ را به خیلی مردم می‌چشاند ولی برای برخی دیگر بی مزه است. حساسیت انسان به PTC به صورت ضریبی از ۱۶ متغیر است. ناتوانی درک PTC به عنوان یک ویژگی بازگشتی به ارث می‌رسد که به معنای غالب بودن چشیدن بر عدم حس چشایی است.

مزه‌های شیرین و umami توسط یک خانواده پروتئینی وابسته به T2R بنام T1R شناسایی می‌شوند. وقتی پروتئین‌های T1R به چشنده ها متصل می‌شود، آن ها به عنوان پروتئین‌های G عمل می‌کنند که کلسیم را به درون سلول آزاد می‌نمایند. سه T1R پستانداران با همدیگر در تعداد کمی از اسید آمینه‌ها فرق دارند. یک پروتئین T1R شبیه GPCR است ولی یک دُمین خارج سلولی بزرگ نیز دارد که بخش متصل شونده به پروتئین در آن است. این دُمین دربرگیرنده گلوتامات حساس به مزه، به شکلی گلوتامات را در بر می‌گیرد که با شبیه‌سازی با تکه مگس ونوس قابل توضیح است. T1R ها دیمر ها و هترودیمر ها را تشکیل می‌دهند و کد پاسخ ها به مولکول‌های متفاوت هنوز بررسی نشده است. موش‌های فاقد T1R2 یا T1R3، شکر را شناسایی نمی‌کنند؛ به نظر می‌رسد که گیرنده اصلی یک هترودیمر از این دو باشد. به نظر می‌آید T1R3 گیرنده‌ای برای هر دو مزه شیرین و umami است و این به خاطر شناسایی شیرینی است که وقتی با T1R2 ترکیب شده و شناسایی umami است وقتی که با T1R1 ترکیب شده است. به همین صورت، سلول‌های چشایی T1R1 یا T1R2 را بیان می‌کنند ولی هر دو را بیان نمی‌کنند و گرنه آن ها یک پیام گیج‌کننده را به مغز مخابره می‌کردند.

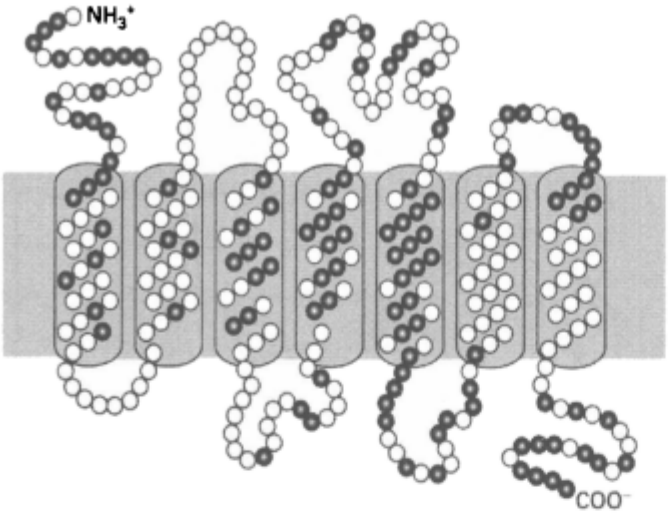
تعداد زیادی گیرنده بو را شناسایی می‌کنند

ادراک مواد شیمیایی فرار معلق در هوا خواسته‌های متفاوتی را نسبت به ادراک نور، صدا، لمس یا مزه تحمیل می‌نماید. نور فقط با چهار مولکول حس می‌شود که با طول موج‌های مختلف هماهنگ است. صدا با اثرات مکانیکی که از موهایی که با طول موج‌های مختلف هماهنگند ادراک می‌شود. حس چشایی تعداد کمی از مواد حل شده در آب را حس می‌کند. در مقابل همه این حواس، دستگاه‌های بویایی می‌توانند بین صدها مولکول معلق در هوا، تمایز قائل شوند. تشخیص بین تعداد زیادی ماده شیمیایی در یافتن غذا یا جفت، احساس فرومون ها و حفاظت در برابر شکارچیان، توکسین ها و آتش‌سوزی‌ها نقش دارد. مثلاً کرم ابریشم نر می‌تواند مولکول‌های تکی پیام را که توسط موجودات ماده به هوا فرستاده می‌شود شناسایی نماید.

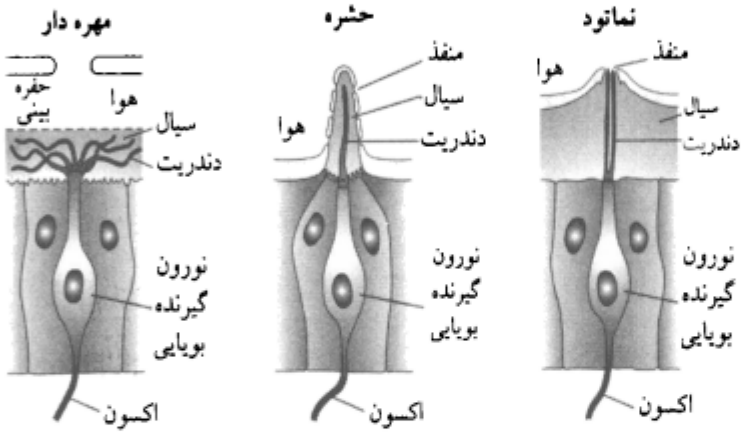
برای مقابله با این همه پیام، دستگاه بویایی یک خانواده بزرگ از پروتئین‌های گیرنده بویایی را به خدمت می‌گیرند. انسان ها حدود یکهزار ژن گیرنده بویایی دارند که حدود یک سوم آن ها عملکردی‌اند (همگی ژن‌های غیرتولید مثلی‌اند) و بخش بزرگی از ۲۵۰۰۰ ژن تخمین زده شده در انسان را تشکیل می‌دهند. موش ها با ۱۳۰۰ ژن که ۱۰۰۰ تای آن ها عملکردی‌اند کارآیی بیشتری دارند. به طور میانگین ۳٪ از ژنوم موش از ژن‌های گیرنده‌های بویایی تشکیل شده است. درزوفیلا حدود ۶۰ ژن گیرنده بویایی دارد. در این بخش ما بررسی خواهیم کرد که چگونه ژن‌های گیرنده بویایی به کار می‌آیند و چگونه مغز می‌تواند تشخیص دهد که کدام بو، احساس شده است (مرحله اول در تغییر دنیای شیمیایی ما). مولکول‌های بودار، معطر[1] نامیده می‌شوند. آن ها ساختارهای شیمیایی متنوعی دارند، پس گیرنده‌های بویایی با همان تغییراتی مواجه هستند که آنتی بادی ها مواجه می‌شوند (نیاز به اتصال و تشخیص انواع مختلفی از مولکول‌های کوچک).

گیرنده‌های بویایی پروتئین‌هایی با هفت دُمین گذرنده از غشاء می‌باشند (شکل ۳۳-۲۲). در پستانداران، گیرنده‌های بویایی توسط سلول‌های اپی‌تلیوم بینی تولید می‌شوند. این سلول ها که نورون‌های گیرنده بویایی (ORNها) نامیده می‌شوند پیام شیمیایی را به پتانسیل عمل تبدیل می‌کنند (شکل ۳۴-۲۳). در دروزوفیلا، ORN ها در شاخک ها قرار دارند. ORN ها آکسونهایشان را به سطح بالاتر بعدی در سیستم عصبی منتقل می‌نمایند که در پستانداران در حباب بویایی مغز قرار دارد. آکسون ORN با دندریت‌های حاصل از نورون‌های زایده‌دار در حشرات (بنام نورون‌های mitral در پستانداران) سیناپس

1- Odorants



◀ **شکل ۳۳ـ۲۳ سازمان‌یابی توالی ساختار در گیرنده‌های بویایی.** گیرنده‌های بویایی از پروتئین‌های گیرنده متصل به پروتئین G با هفت دُمین گذرنده از غشاء تشکیل شده‌اند. استوانه‌ها میزان مارپیچ‌های آلفا را که از غشاء عبور می‌نمایند، نشان می‌دهند. اسیدهای آمینه سیاه بسیار متغیرند و برخی از این تفاوت‌ها مسئول برهمکنش‌های خاص با مواد معطر هستند.



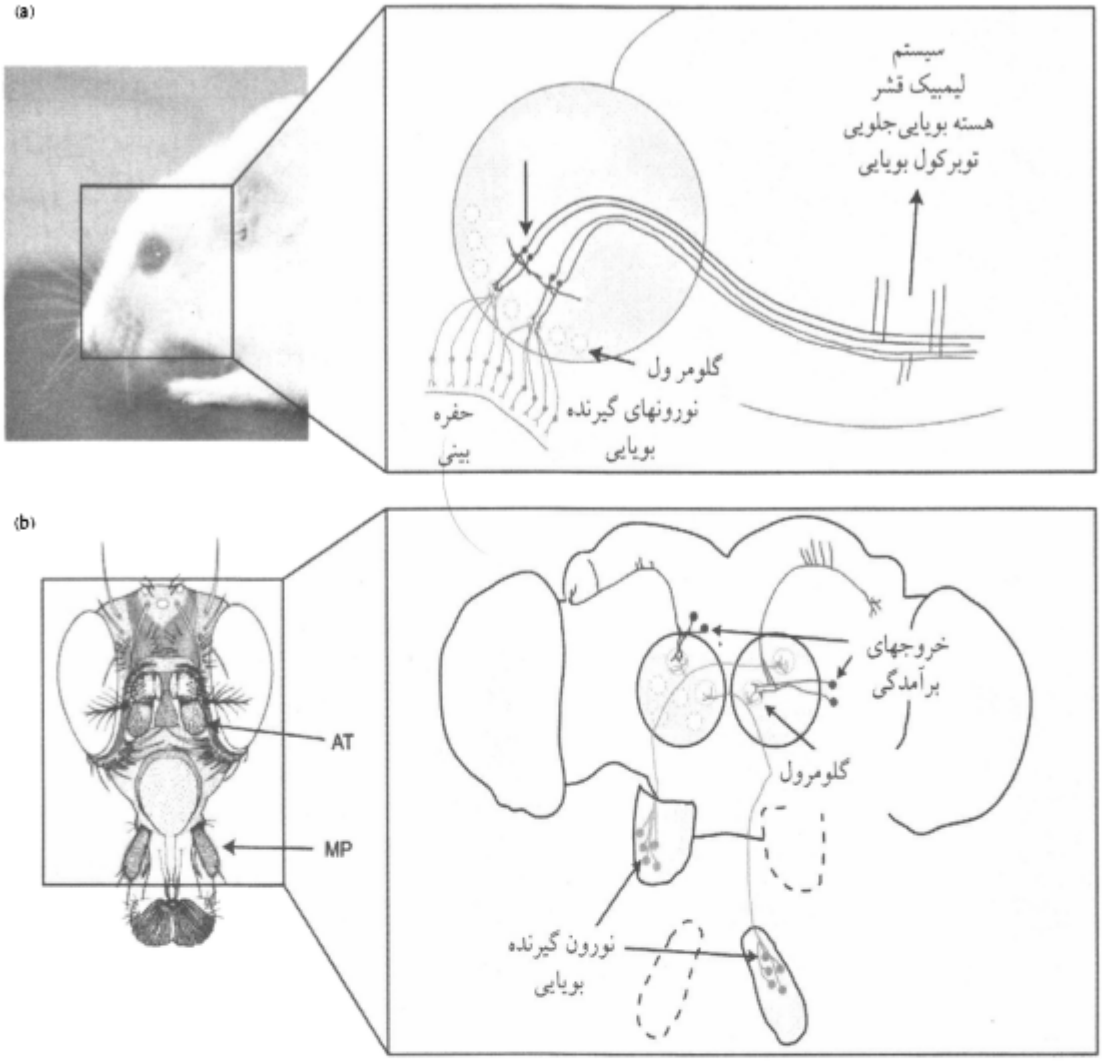
◀ **شکل ۳۴ـ۲۳ ساختارهای نورون‌های گیرنده بویایی.** در طول پهنه وسیعی از فواصل تکاملی (مهره داران، حشرات، نماتودها) نورون‌های گیرنده‌های بویایی اشکال مشابهی دارند. هر یک زواید ظریفی دارند که در معرض مواد معطر قرار در مایع حل می‌شوند. گیرنده‌های بسیار ویژه بویایی (نشان داده نشده) در سلول‌ها مواد معطر را حس می‌کنند. سلول‌های نشان داده شده به همان مقیاس به تصویر کشیده نشده‌اند.

می‌دهند، این‌سیناپس‌ها در دسته‌هایی از ساختارهای سیناپسی به نام گلومرولی رخ می‌دهند. نورون‌های زایده‌دار به مراکز بویایی بالاتر در مغز مرتبط می‌شوند (شکل ۳۵ـ۲۳).

هر ORN فقط یک نوع گیرنده برای مواد معطر تولید می‌کند. هر پیام الکتریکی از آن سلول یک پیام ساده به مغز می‌رساند: «بوی من به گیرنده هایم متصل می‌شود». گیرنده‌ها همیشه برای یک ماده معطر کاملاً ویژه نیستند. برخی گیرنده‌ها می‌توانند به بیش از یک نوع مولکول متصل شوند، ولی مولکول‌های شناسایی شده معمولاً ساختار مشابه دارند. برعکس، برخی مواد معطر به چند نوع گیرنده متصل می‌شوند.

حدود یک میلیون ORN در موش وجود دارد؛ پس به طور میانگین هر هزار یا بیشتر ژن‌های گیرنده بویایی در یکهزار سلول فعال است. حدود ۲۰۰۰ گلومرول (۲ تا برای هر ژن) وجود دارد، پس به طور متوسط آکسون‌ها ۵۰۰ تا ORN دارند که در هر گلومرول همگرا می‌باشند. پس آکسون‌ها حدوداً ۵۰۰۰۰ نورون mitral دارند که حدود ۲۵٪ در هر گلومرول است که به مراکز بالاتر مغز متصل می‌شوند. دقت کنید که برخلاف سیستم بینایی، تفسیر و بهبود بسیار کمی در اپی تلیوم حسی یا حتی نورون‌های دارای زوائد رخ می‌دهد. اطلاعات حسی اولیه بدون پردازش به بخش‌های بالاتر مغز فرستاده می‌شود، که به صورت یک گزارش ساده در مورد آن‌چه شناسایی شده بدون آنالیز یا تفسیر، بیشتر است.

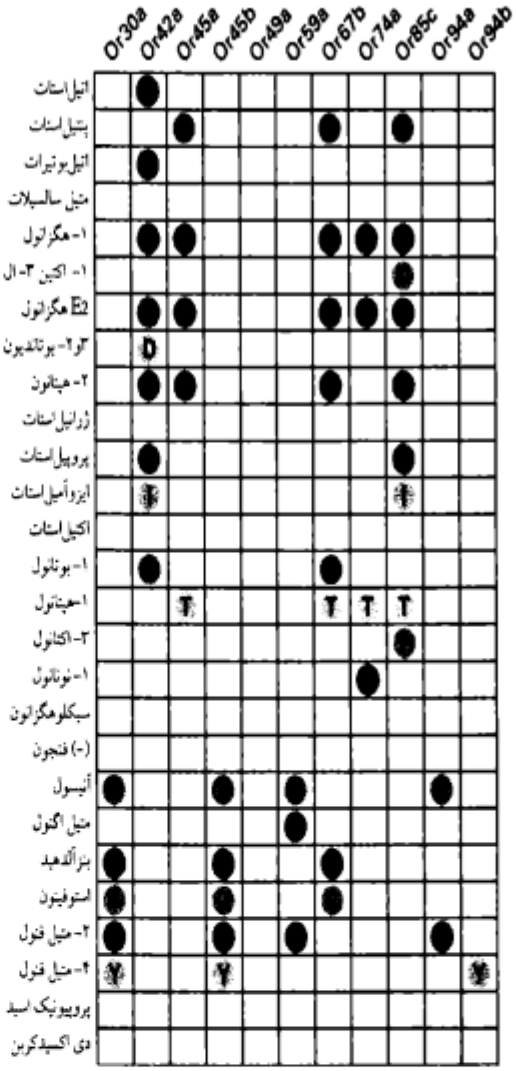
قانون یک نورون - یک گیرنده در دروزوفیلا صدق می‌کند. مطالعات دقیق در لارو ها انجام شده است که در آن ها یک دستگاه ساده بویایی با فقط ۲۱ تا ORN، ۱۰ـ۲۰ ژن بویایی را استفاده می‌نماید. معلوم است که یک گیرنده خاص در یک ORN بیان می‌شود که زوایدش را به گلومرول می‌فرستد. ORN ها می‌توانند پیام‌های تحریکی یا مهاریشان را از انتهای آکسون خودشان، احتمالاً برای تشخیص بوهای جذب‌کننده یا دفع‌کننده بفرستند. ORN ها در بخش شاخکی مغز لارو، به گلومرول‌ها انشعاب می‌یابند. تحقیقات با آزمایشاتی که می‌پرسد کدام مواد بودار به کدام گیرنده‌ها متصل می‌شوند شروع شد (شکل ۳۴ـ۲۳). برخی مواد معطر توسط یک گیرنده خاص شناسایی می‌شوند و برخی دیگر با چندین گیرنده، چنانکه الگوی ترکیبی به خیلی از مواد معطر اجازه تشخیص می‌دهد. تعداد کلی کمی از نورون‌ها اجازه داده است که نقشه‌ای ساخته شود که

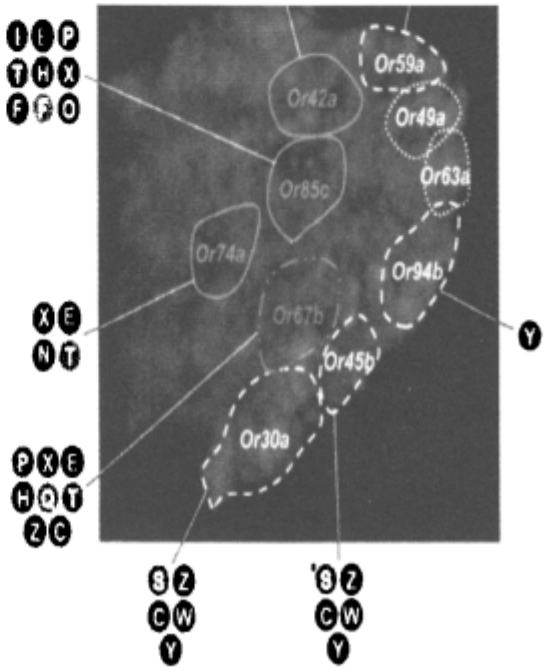


▲ **شکل ۳۵ـ۲۳ (شکل رنگی) آناتومی بویایی در موش و مگس.** هم در موش (a) و هم در مگس (b) نورون‌های گیرنده بویایی (ORNها) که یک نوع گیرنده را بیان می‌کنند، آکسون‌هایشان را به همان گلومرول می‌فرستند. در این شکل رنگ‌های قرمز و آبی ارتباطات عصبی را برای گیرنده که مجزا بیان شده‌اند، نشان می‌دهند. در موش، گلومرول ها در حباب بویایی قرار دارند؛ در مگس آن ها در مغز قرار دارند. در گلومرول، سیناپس‌های ORN با نورون‌های برجسته‌شان در مگس یا نورون‌های mitral در پستانداران وجود دارند. دندریت‌های هر نورون برجسته (یا نورون میترال) در یک گلومرول قرار دارد. پس اطلاعات درباره یک بوی خاص را به مرکز بالاتر در مغز حمل می‌نماید.

نشان دهد کدام ماده معطر توسط هر گلومرول حس می‌شود (شکل ۳۶b ـ۲۳). یک یافته خیلی حساس این است که یکی از گلومرول‌های نزدیک یکدیگر به مولد معطری با ساختارهای شیمیایی مرتبط پاسخ می‌دهند، مثلاً ترکیبات آلیفاتیک خطی یا ترکیبات آروماتیک. این آرایش، تکامل گیرنده‌های جدید را همراه با فرایندی از انشعابات بخش بویایی مغز نشان می‌دهد.

دستگاه ساده حاوی هر سلول فقط یک نوع گیرنده ایجاد می‌کند که همچنین چند شکل مهم دارد: (۱) هر گیرنده باید قادر به تشخیص یک نوع مولکول یا دسته‌ای از مولکول‌های معطر باشد که به اندازه‌ای که موجود زنده نیاز دارد تخصصی شده باشند. یک گیرنده که به فراوانی تحریک می‌شود احتمالاً خیلی مفید نیست. (۲) هر سلول باید یک یا فقط یک گیرنده تولید کند. بقیه ژن ها باید خاموش باشند. همزمان تلاش‌های همه سلول‌های اپی تلیوم بینی برای جمع‌آوری به تعداد کافی از گیرنده ها اجازه تولید داده است تا صد ها گیرنده داشته باشند حتی اگر بیشتر آن ها هرگز استفاده نشوند. ولی این یک تلاش تنظیمی برای روشن کردن یک و فقط یک ژن در هر سلول و استفاده از همه ژن ها در جمعیت کاملی از سلول ها است. (۳) ارتباطات سیستم بویایی باید بین همه مواد معطر ممکن تمایز قائل





◀ شکل ۳۶ـ۲۳ (شکل رنگی) انواع گیرنده‌های منفرد بویایی می‌توانند از لحاظ تجربی به انواع مواد معطر مرتبط باشند و به گلومرول‌های خاص در سیستم بویایی لارو دروزویلا وابسته‌اند. (a) پروتئین‌های گیرنده بویایی مختلفی در بالا فهرست شده‌اند و ۳۷ نوع ماده معطر مورد آزمایش در ستون دست چپ نشان داده شده‌اند. نقطه‌های رنگی نشان دهنده پاسخ‌های قوی به بو می‌باشند. دقت کنید که برخی مواد معطر چندین گیرنده را تحریک می‌نمایند (مثلاً پنتیل استات)، در حالی که بقیه (مثل اتیل بوتیرات) فقط روی یک گیرنده خاص عمل می‌نمایند. دقت کنید که خیلی از گیرنده‌ها مثل Or42a و Or67b ابتدا به ترکیبات آلیفاتیک پاسخ می‌دهند. در حالی که بقیه، مثل or30a و or59a به ترکیبات آروماتیک پاسخ می‌دهند. **(b)** نقشه فضایی اطلاعات بویایی در گلومرول مغز لارو دروزوفیلا. این نقشه با بیان ژن گزارشگر تحت کنترل هر یک از نورون‌های گزارشگر بویایی صورت گرفت. عکس نشان دهنده گلومرول‌هایی است که برجستگی‌های از ORN را دریافت می‌نمایند که هر یک ده نوع پروتئین گیرنده را نشان می‌دهند (Or42a و غیره). همچنین، مواد معطری که هر گیرنده به آنها پاسخی قوی دهد نشان داده شده‌اند (دقت کنید که به جز Or30a و Or45b، هر گلومرول توانایی‌های حسی منحصر به فردی دارد). این استثناء، استثناء نیست اگر الگوهای بیان ژن بویایی بیشتری آزمایش شوند. گلومرول‌هایی که مواد معطری را حس می‌کنند که از لحاظ شیمیایی شبیه‌اند، تمایل دارند نزدیک یکدیگر قرار گیرند. مثلاً، سه گلومرولی که با یک خط تیره آبی نشان داده شده‌اند، ترکیبات آلیفاتیک خطی را حس می‌کنند. آنهایی که خطوط یک در میان زردرنگ دارند، ترکیبات آروماتیک هستند.

شود. این می تواند شامل یک‌سری ارتباطات اتفاقی باشد که براساس تجربه، تفسیر می‌شوند یا یک سری ارتباطات برنامه‌ریزی شده باشد که از یک سلول به سلول دیگر قابل تکرار باشند. مغز باید یاد بگیرد که کدام سلول چه ماده معطری را دریافت می‌کند چنانکه پیام‌های الکتریکی از بینی بتوانند تفسیر شوند. اغلب این موردکه یک پاسخ به یک ماده معطر در ژن‌ها برنامه‌ریزی می‌شود مثل یک پاسخ رفتاری به یک فرومون است. در چنین مواردی، مغز باید بداند کدام سلول ها آن فرومون را شناسایی می‌کنند. وگرنه حیوان زمانی که باید به سرعت فرار کند، احساس رمانتیک دارد.

راه حل مشکل اول تنوع زیاد در پروتئین‌های گیرنده بویایی است که هم درون و هم بین گونه ها باید باشد (شکل ۳۳ـ۲۳ را ملاحظه کنید؛ اسیدهای آمینه سیاه بسیار متنوعند.) راه حل مشکل دوم، بیان یک ژن گیرنده بویایی است که با استفاده از موش

ترانسژنیک بررسی شده است ولی مکانیسم آن هنوز درک نشده است. فقط یک ژن مهندسی شده بویایی برای تولید گیرنده بویایی استفاده می‌شود، ژن‌های دیگر از لحاظ بیان وابسته به برخی انواع بازخورد می‌باشند. اگر یک ژن گیرنده مهندسی شده بویایی بیان شده است که پروتئین گزارشگر تولید می‌کند (نه یک پروتئین گیرنده بویایی) پس ژن‌های دیگر هنوز می‌توانند بیان شوند. سیستم بازخورد باید شامل شناسایی حضور یک پروتئین گیرنده بویایی که عملکردی است باشد.

مشکل سوم این بود که سیستم چگونه به هم مرتبط شده است تا مغز درک کند که کدام بو مشاهده شده است. چنین مشکلی اکنون تا حدی پاسخ داده است. اولا، ORNهایی که همان تعداد گیرنده را بیان می‌نمایند آکسون هایشان را به همان گلومرول می‌فرستند. پس همه سلول‌هایی که به یک بوی مشابه پاسخ می‌دهند، زوایدشان را به همان مرکز می‌فرستند. این فرایند همگرایی می‌تواند به خاطر (۱) یک پیام جذب‌کننده باشد که تا حدی ویژه یک گیرنده خاص بویایی است یا (۲) به خاطر تشخیص دوطرفه، و رشد هماهنگ بعدی آکسون ها که همان گیرنده روی سطحشان است، (۳) یا به خاطر یک فرایند هرس کردن که در آن خیلی ارتباطات ساخته می‌شوند ولی فقط آنهایی که یک سیستم گیرنده بویایی را دارند که احتمالاً در اثر فعالیت نورونی تنظیم شده‌اند، باقی می‌مانند. بررسی تکاملی نشان می‌دهد که آکسون‌های ORN به یک «شکاف خالی» به گلومرولی نمی‌رسند. گلومرول، نورون‌های برجسته‌اش را پیش از رسیدن آکسون‌های ORN سازماندهی می‌کند. این سیستم تا حدی ارتباطات پیچیده‌ای دارد.

در موش با کشف اینکه گیرنده‌های بویایی دو نقش مهم در ORNها بازی می‌کنند، کلیدی مهم درباره الگوبرداری سیستم بویایی حاصل شد. این دو نقش مهم عبارتند از: اتصال مواد معطر و راهنمایی آکسون‌ها طی تکامل. چندین آکسون ORN که یک گیرنده را بیان می‌کنند به یک مرکز گلومرولی راهنمایی می‌شوند. مکانیسم کامل آن شناخته نشده است ولی معلوم است که آکسون ORN هم به گیرنده بویایی خودش و هم به مولکول‌های استاندارد راهنمای آکسون که در بخش‌های دیگر سیستم عصبی استفاده می‌شوند، کمک می‌کند. در بخش بعدی آن ها را بحث خواهیم نمود.

نکات کلیدی بخش ۴-۲۳

سلول‌های حسی بینائی، شنوائی، چشائی و بویایی و لامسه

■ چشم نور را بر روی یک سطح حساس به نور بنام شبکیه متمرکز می‌کند که دارای دو نوع سلول فوتورسپتوری هستند. سلول‌های استوانه‌ای بسیار حساس (برای مشکی، خاکستری و سفید) و سلول‌های مخروطی کم حساس (برای رنگ‌ها) که بعد از تحریک، پیام‌های الکتریکی را در پاسخ به نور تولید می‌کنند (شکل ۲۴-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ سلول‌های دارای گیرنده نوری برخلاف سایر نورون‌ها به جای دپلاریزه شدن، هیپرپلاریزه می‌شوند.

■ پیگمانهای حساس به نور با نام اپسین‌ها و رودوپسین‌ها سلول‌های دارای گیرنده نوری را قادر به دریافت نوری می‌کنند (شکل ۲۵-۲۳ را ملاحظه کنید)

■ پیامهای ترکیبی از سلول‌های دارای گیرنده نوری متعدد در یک الگوی روشن و تاریک در هم ادغام می‌شوند سلول‌های گانگلیون شبکیه که پیامها را از شبکیه به قسمتهای بالایی مغز هدایت می‌کند برای پاسخ دهی به مجموعه‌ای از سلول‌های دارای گیرنده نوری در الگوهای مرکز تاریکی و محیط روشن لازم است (شکل ۲۶-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ الگوهای ساده اولیه مرکزی با سلول‌های سطح بالاتر برای تولید کمپکس‌های تصویری از دنیای اطراف ترکیب می‌شوند (شکل ۲۸-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ سلول‌های مکانیکی - حسی در پستانداران موقعیت بدن، درد، گرما، سرما و فشار را تعیین می‌کنند. پیامهای تولید شده توسط این گیرنده‌ها نقشه بدن را بر روی سطح مغز ایجاد می‌کنند که همونکولوس نامیده می‌شود (شکل ۲۹-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ گوش درونی حرکت را حس کرده و به حفظ تعادل کمک کرده و صدا را تشخیص می‌دهد (شکل ۳۰-۲۳ را ملاحظه کنید). تشخیص دهنده صدا، اکولا همراه با اندام کورتی می‌باشد. ارتعاشات ایجادشده توسط استخوانهای کوچک از قسمت بیرونی به درونی، مایع را حرکت داده که آن هم به نوبه خود موهایی به نام استرسیلیا را حرکت می‌دهد (شکل ۳۱-۲۳ را ملاحظه کنید). حرکت این سیلیاها پتانسیل‌های گیرنده‌ای را در سلول‌های موئی تولید می‌کند که آن هم از صدا دریافت شده است.

■ فقط تعداد کمی از گیرنده‌های چشایی مواد شیمیایی موجود در بزاق را تشخیص می‌دهد بعضی از اینها پروتئین‌های هفت بار گذار غشایی هستند و این الگوهای هومو و هترودیمری مختلف می‌توانند مزه‌های مختلفی را شناسایی کنند (شکل ۳۲-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ گیرنده‌های بویایی که گیرنده‌های جفت شونده با G پروتئین‌های دارای هفت قسمت گذرنده از غشاء هستند توسط مجموعه‌های بزرگ و متنوعی از ژنها کد می‌شوند. هر نوع نورون گیرنده بویایی فقط یک ژن گیرنده را بیان می‌کند. سپس پیام تولید شده از آن سلول به مغز، طبیعت ترکیب شیمیایی را مشخص می‌کند. OKNهایی که ژن گیرنده مشابهی را بیان می‌کنند آکسونهای آن‌ها را در منطقه مشابهی در مغز می‌فرستند (اشکال ۲۳-۲۳ و ۲۶-۲۳ را ملاحظه کنید).

۲۳-۵ مسیر موفقیت: کنترل رشد و جهت‌گیری آکسون

در قلب عملکردهای سیستم عصبی، خصوصا عملکردهای پیشرفته، محیط پیچیده قرار دارد. با توضیحاتی که در مورد سلول‌های عصبی، انتقال پیام الکتریکی، انتقال شیمیایی در سیناپس ها و سلول‌های حسی داده‌ایم، اکنون به مسئله نحوه تشکیل ارتباطات بین نورون ها می‌پردازیم. تکامل نورونی را می‌توان از جنبه‌های مختلفی نگریست. تشکیل نواحی جنینی[۱] در جاهایی که نورون‌های جدید از سلول‌های بنیادی به وجود می‌آیند، تعهد سلول‌هایی تازه تشکیل شده به نورون ها یا گلیا، مهاجرت سلولی، تشکیل آکسون و دندریت، رشد آکسون ها به دنبال کلیدهای راهنما (گاهی در مسیرهای طولانی)، تشکیل سیپناس‌ها، هرس نمودن ارتباطات فراوان، و مرگ برنامه‌ریزی شده برخی نورون‌ها.

سلول پیش ساز نورون اغلب در ظاهر شکل خاصی ندارد و یک سلول گرد ساده است. رشد دندریت ها و آکسون‌ها، به صورت تغییر شکل است. آکسون ها در پاسخ به سیستم‌های راهنما، با استفاده از پیام‌هایی از سلول‌های دیگر تشکیل می‌شوند. انتهای رهبر و در حال رشد **آکسون، مخروط رشد**[۲] نامیده می‌شود. مولکول‌های پیام رسان در مخروط رشد به گیرنده‌ها متصل می‌شود که روی اسکلت سلولی اثر می‌گذارد و باعث رشد مخروط به سمت پیام یا در خلاف جهت آن می‌شود. مخروط رشد یک حسگر و جستجوگر است.

«از نقطه نظر عملکردی، مخروط رشد به عنوان یک نوع کانون یا دژکوب است که دارای حساسیت‌های شیمیایی دقیق با حرکات آمیبی سریع است و با یک نیروی تحریکی خاص که به خاطر آن قادر به هل دادن به جلو و غلبه بر موانع سرراهش است که با فشار از درزهای سلولی عبور می‌کند تا وقتی که به مقصدش برسد». **نقلی از رامون ای کاجال، ۱۸۹۰**

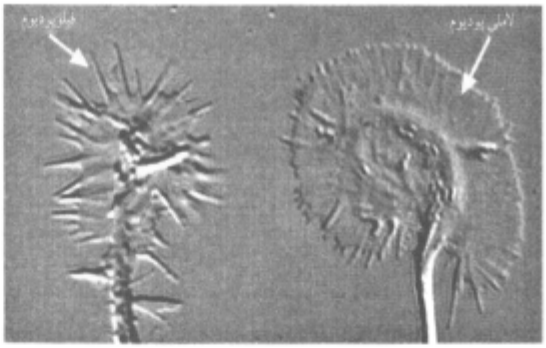
در این بخش ما بر تشکیل و رشد آکسون ها و سیستم‌های راهنمایی که به آکسون ها اجازه رشد به سمت هدفشان و سپس تشخیص وسیناپس با هدف ها که به آن ها می‌رسند، می‌دهد می‌پردازیم. مخروط رشد قلب این مسئله است، که زائده سلولی است که آکسون طویل شونده را از پیچ و خم‌هایش هدایت می‌کند. رفتار آمیبی مخروط رشد به طور صحیحی توسط رامون ای کاجال در ۱۹۸۰ توضیح داده شده و اکنون ماکمی بیشتر درباره مولکول‌هایی که به مخروط ویژگی‌های قابل توجهش را می‌دهند، می‌دانیم. مخروط رشد به پیام‌هایی که مسیر رشدش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نتیجه اتصالات و ارتباطات در سیستم عصبی تأثیر می‌گذارد.

مخروط رشد یک ساختار راهنمای حسی حرکتی است

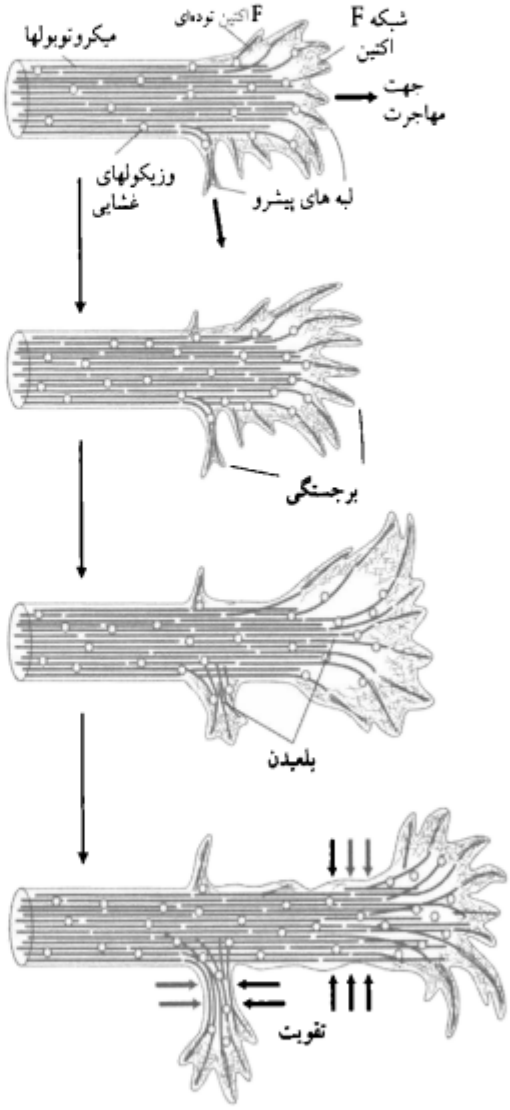
شکل مخروط‌های رشد خیلی متفاوت است ولی عموما در دو شکل اصلی وجود دارند: یک پراکندگی وسیع از مواد مسطح به نام لاملی پودیوم[۳] و یک انشعاب از خارهای متعدد تیزبنام فیلوپودیا[۴] (شکل ۳۷-۲۳). لاملی پودیوم نوعا پهنای ۱۰-۱۰۰μm دارد و فیلوپودیا تا ۲۰μm طول دارند. همانطور که مخروط رشد از جسم سلولی به بیرون حرکت می‌کند، یک ناحیه مخروطی پشت سرش باقی می‌گذارد که محور آکسون هاست. مطالعات در قالب زمان نشان می‌دهند که همانطور که مخروط رشد پیش می‌رود، فیلوپودیایی که در جلو قرار دارند، به اطراف لاملی پودیوم حرکت می‌کنند و پشت مخروط رشد جایی که زواید یک آکسون می‌شوند، جمع می‌شوند.

سه مرحله گسترش مخروط رشد تعریف شده‌اند: پیش‌آمدگی[۵]، بلعیدن[۶] و تقویت[۷] (شکل ۳۸-۲۳). پیش آمدگی توسعه لاملی پودیوم و فیلوپودیاست، بلعیدن بادکردن هر دوی آنهاست وقتی مخروط رشد آن ها را احاطه می‌نماید، و تقویت، باریک شدن فعال مخروط رشد است هنگامی که محور آکسون می‌شود. این سه مرحله به طور مداوم با هدایت لبه مخروط رشد، پیش می‌روند. داروهایی که عناصر اسکلت سلولی را مهار می‌نمایند، برای بررسی سهم سیستم‌های رشته‌ای در این سه مرحله استفاده شده‌اند. پلیمریزاسیون اکتین برای پیش آمدگی و حفظ مخروط رشد لازم است؛ سیتوکالازین B که موجب دپلیمریزاسیون اکتین می‌شود (فصل ۱۷)، منجر به تجمع و تغییر مسیر مخروط‌های رشد می‌شود. هم لاملی پودیوم ها و هم فیلی پودیا طی پلیمریزاسیون اکتین

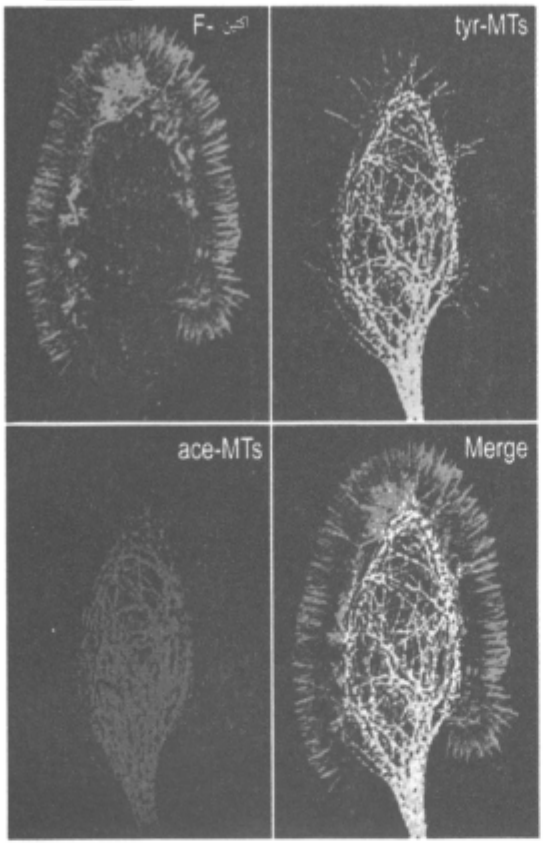
1- Germinal
2- Growth cone
3- Lamellipodium
4- Filopodia
5- Protrusion
6- Engorgement
7- Consolidation



▲ **شکل ۲۳ـ۳۷ مخروط رشد.** مخروط‌های رشد موادی به نام لاملی پودیوم را دارند که بسیار پراکنده‌اند که از آنها خارهای بسیار تیزی بنام فیلوپودیوم خارج می‌شود.



▲ **شکل ۲۳ـ۳۸ پیشرفت مخروط رشد.** طی برجسته شدن، فیلوپودیا و لاملی پودیا با فشار از شبکه‌های F- اکتین داخل سلولی و توده‌های دراز شده (ریب‌ها) بیرون می‌زنند. طی فرایند تقویت، دپلمیریزاسیون اکتین در گردن مخروط رشد با باریک شدن سلول در اطراف دسته‌های میکروتوبولی برای تشکیل محور آکسون، دنبال می‌شود. یک برآمدگی جدید می‌تواند با انشعاب یافتن بخش جانبی آکسون استوانه‌ای تشکیل شود.



▲ **شکل تجربی ۲۳ـ۳۹ نشان‌گذاری با آنتی بادی، اجزای اسکلت سلولی را در مخروط‌های رشد هیپوکامپ کشت داده شده نشان می‌دهد.** یک مخروط رشد سه بار نمایش داده می‌شود که در هر مورد با یک آنتی بادی برای یک ساختار متفاوت، نشان‌گذاری شده است: F- اکتین، میکروتوبول‌های تیروزینه (tyr-MT) و میکروتوبول‌های استیله (ace-MT). تصویر چهارم ترکیبی از سه تای دیگر را نشان می‌دهد. به فقدان وابسته میکروتوبول ها در لبه‌های پیشرو و محیط غلظت اکتین در آنجا توجه کنید.

تشکیل می‌شوند. کلشیسین که موجب دپلیمریزاسیون میکروتوبول ها می‌شود (فصل ۱۸) منجر به انقباض آکسون شده ولی سریعاً مخروط‌های رشد را بر هم نمی‌زند. همچنین کلشی‌سین باعث می‌شود که رشد ظاهری لاملی‌پودیا و فیلوپودیا به بیرون در طول محور آکسون به این موضوع اشاره نماید که میکروتوبول ها به طور طبیعی مانع تجمع میکروفیلامنت ها در آکسون ها می‌شوند.

غلظت اکتین در محیط و لبه راهنما در مخروط رشد نقش‌های متفاوت را که توسط این دو بازی می‌شود، منعکس می‌نماید (شکل ۲۳ـ۳۹؛ همچنین فصل ۱۷ را ملاحظه کنید). اکتین به شکل فیلامنت ها در مخروط رهبر تجمع می‌یابد، شبکه فیلامنتی اکتین همانطور که مخروط پیش می‌رود به سمت عقب جریان می‌یابد و

اکتین با تبدیل مخروط به آکسون از حالت تجمع یافته در می‌آید. انتقال اکتین به سمت عقب در فیلوپودیا و لاملی پودیوم رخ می‌دهد و توسط یک موتور میوزین به جلو رانده می‌شود. توجه نمایید که این کاملاً متفاوت از حرکت چرخ دنده‌ای[1] است (فصل ۱۷). حرکت شبکه اکتین با توجه به مخروط رشد عبارت است از حرکت همه رشته ها با سرعت ۱-۷μm/min که به میوزین چسبیده‌اند. برای یک فیلوپودیم در حال پیشروی، سرعت پلیمریزاسیون اکتین در لبه پیشرو باید از سرعت جریان برگشتی بیشتر باشد.

رشته‌های اکتین به عنوان تعیین‌کننده‌های اصلی در برگرداندن مخروطهای رشد دیده می‌شوند که فرایندی است که برای پاسخدهی نورون به پیام‌های راهنما حیاتی است. میکروتوبول ها نیز نقش دارند زیرا داروهای مهارکننده میکروتوبول چرخش را مهار می‌نمایند. میکروتوبول‌ها در سانتروزوم[2] نورون تجمع می‌یابند و توسط موتورهای داینئین به سمت مخروط‌های رشد در حال پیشروی حرکت می‌نمایند در حالی که انتهای مثبت آنها، انتهای پیشرو می‌باشد.

میکروتوبول‌های در حال حرکت متحمل پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون می‌شوند. یک شکل تیروزینه توبولین ترجیحاً در بخش‌های پیشرفته‌تر مخروط رشد وجود دارد، در حالی که توبولین استیله در بخش‌های پیرو و مرکزی و در خود آکسون غنی شده است (شکل ۲۳-۳۹ را ملاحظه کنید). نقش چنین تغییرات پس از ترجمه در فصل ۲ توضیح داده شده است، یک فرایند منظم تجمع و تغییر توبول در تکامل مخروط رشد مؤثر است.

همانطور که دیده‌ایم (فصل ۱۷)، پلیمریزاسیون اکتین توسط مجموعه نسبتاً بزرگی از پروتئین‌های تنظیمی کنترل می‌شود. بیش از ۲۰ پروتئین متصل شونده به اکتین در مخروط‌های رشد، کشف شده‌اند، که بیشتر آن ها هسته زایی یا پلیمریزاسیون رشته‌های اکتین را کنترل می‌کنند یا رشته‌ها را به غشاء محدود می‌نمایند. خیلی از پروتئین‌هایی که به اکتین متصل می‌شوند، اهداف وقایع انتقال پیام هستند که با راهنمایی پیام‌های آکسون که ما در بخش بعدی خواهیم دید شروع می‌شوند.

نقشه رتینوتکتال[3] یک سیستم منظم از ارتباطات آکسون را نشان می‌دهد

محققان دو ایده عمومی را درباره مسیر یابی نورون ها بحث می‌کنند. یکی «فرضیه رزونانس» است که فرض می‌کند که سلول ها آکسون ها را در طول مسیرهایی که با نیروهای مکانیکی تعریف شده‌اند، می‌گسترانند. پس از انتخاب خیلی از مسیرها و ایجاد خیلی ارتباطات، آنهایی که کار می‌کنند حفظ می‌شوند، در حالی که بقیه حذف می‌شوند. ایده دوم بنام «فرضیه مسیرهای ویژه» نشان می‌دهد که آکسون ها مسیرهایشان را با تمایل شیمیایی انتخاب می‌کنند و مولکول‌هایی که روی آکسون‌های در حال رشد قرار دارند، با مولکول‌هایی که در طول مسیر هستند، تماس یافته و پیام‌ها یا راهنمایی ایجاد می‌کنند. در سال ۱۹۶۳ روگر اسپری، نوعی از ایده مسیرهای ویژه به نام «فرضیه تمایل شیمیایی» را فرض نمود. او نشان داد که مخروط‌های رشد، مسیرشان را از طریق کلیدهای مولکولی که شیبی از نقطه شروع تا مقصد ایجاد می‌کنند، می‌یابند که یک پروپوزال اولیه است که برای دهه ها قابل سنجش نبود. پروپوزال اسپری براساس مطالعاتش در مورد چگونگی آرایش آکسون‌های سلول‌های گانگلیون شبکیه که عصب بینایی را تشکیل می‌دهد، وقتی که به tectum بینایی می‌رسند است. tectum بینایی در سقف مغز میانی قرار دارد و مقصد آکسون‌های سلول گانگلیونی است که از شبکیه رشد می‌نمایند. نورون‌های ورودی شبکیه‌ای نقشه‌ای را روی tectum (**نقشه retinotectal**) تشکیل می‌دهند که آرایش استوانه‌ها و مخروط ها را در شبکیه و دنیای بصری اطراف را نشان می‌دهد (شکل ۲۳-۴۰). نقشه فضایی شبکیه در مغز کپی شده است.

اسپری آزمایشاتی روی چشم و مغز قورباغه انجام داد تا دو مدل «رزونانس» در مقابل «تمایل شیمیایی» را تشخیص دهد که چگونگی رسیدن آکسون ها به چنین نقشه‌ای را توضیح می‌دهد (شکل ۲۳-۴۱). اگر عصب بینایی قورباغه بریده شود، قابل احیاست و الگوی تشخیص - یافتن مسیر توسط آکسون‌ها نشان می‌دهد که آکسون ها چگونه هدایت می‌شوند. در آرایش طبیعی، آکسون‌های سلول گانگلیون شبکیه از بخش شکمی چشم به بخش میانی tectum متصل می‌شوند، در حالی که آکسون ها از بخش پشتی چشم به tectum جانبی متصل می‌شوند (شکل ۲۳-۴۱a را ملاحظه کنید). برای هر چشم، ارتباطات در بخش مخالف مغز ایجاد شده‌اند، برای چشم راست به مغز چپ و چشم چپ به مغز راست. سپس، اسپری یک جراحی دوم را به آزمایش افزود. چرخاندن یک چشم به اندازه ۱۸۰° طوریکه بخش‌های شکمی و پشتی معکوس شوند (شکل ۲۳-۴۱b). اگر فرضیه رزونانس درست باشد، یعنی، نیروهای مکانیکی و سپس یک فرایند دسته‌بندی بر احیای نورون ها نظارت کند،

1- Treademilling
2- Centrosome
3- Retinotectal

سیستم بینایی باید به عملکرد طبیعی‌اش خاتمه دهد زیرا ارتباطات مناسب تشکیل و حفظ خواهند شد (شکل ۴۱c-۲۳، چپ). اگر یک سیستم راهنمای تمایل شیمیایی وجود داشته باشد، سپس بینایی باید معکوس شود زیرا علیرغم چرخش، آکسون‌های شکمی به tectum جانبی و آکسون‌های پشتی به tectum میانی راه می‌یابند (شکل ۴۱c-۲۳، راست). در این مورد، چشم منجر به بینایی معکوس قورباغه خواهد شد: ممکن است چیزی را بالا ببینید و فکر کنید زیر است (شکل ۴۱d-۲۳). نتایج آشکار بودند: پس از احیا، قورباغه در پاسخ به مگسی که بالای سرش پرواز می‌کرد زبانش را به پایین پرتاب می‌نمود. آکسون‌هایی که از مکان‌های غیرطبیعی منشأ می‌گرفتند هنوز مسیرشان را به ارتباطات راست نمی‌توانستند بیابند. در نتیجه چشم واژگون، مغز قورباغه را گول می‌زد. فرضیه تمایل شیمیایی اثبات شد:

«این نتیجه‌گیری به نظر ضروری می‌آید که... سلول‌ها و رشته‌های مغز و نخاع باید برخی انواع علائم نشانه را حمل نمایند که فرضا طبیعت سیتوشیمیایی دارند که با آن در خیلی نواحی یک نوع را از نوع دیگر تا حد یک نورون منفرد تشخیص می‌دهند» (روگر اسپری ۱۹۶۳).

شواهد مهمی وجود دارند که نشان می‌دهند ایده‌های عمومی اسپری درست بودند وگرنه خیلی چیز ها باید در مورد چگونگی چنین تجمع موفقی از ترکیب‌های بسیار پیچیده مدارهای عصبی، یاد بگیریم. اهمیت نسبی پیام رسانی ناحیه‌ای در برابر دامنه بلند، نقش‌های گلیا، تأثیر فعالیت الکتریکی عصبی و انتقال پیام و تغییرات اسکلتی سلولی که پاسخ به پیام ها را شکل می‌دهند، همگی مسائل مهمی در تحقیقات کنونی‌اند. این زمینه بسیار اساسی ما را می‌فریبد چون درک نحوه ارتباطات نورون ها با هم به کارکرد مغز بستگی دارد و همزمان با درک چگونگی تحریک ترمیم مدارهای عصبی تخریب شده اهمیت دارد.

چهار خانواده از مولکول‌های راهنمای آکسون وجود دارند

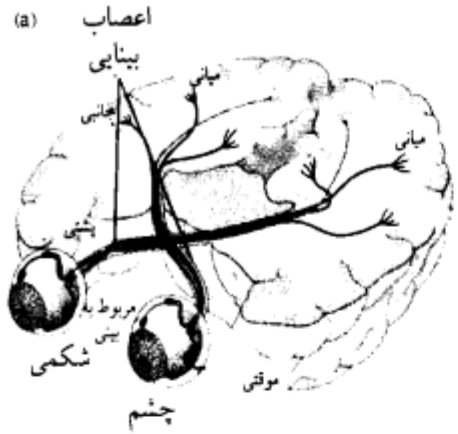
سالیان سال، تلاش زیادی برای تعیین مولکول‌های راهنمای آکسون انجام شده است. یافته ها شامل تولید آنتی‌بادی‌ها علیه مولکول‌های سطحی، نورون‌های در حال کشت و عصاره‌های مورد آزمون برای توانایی آن ها در مجبور کردن مخروط رشد به پیچیدن است و استفاده از ژنتیک برای شناسایی جهش یافته‌هایی که قادر به برقراری ارتباطات مناسب با سیستم عصبی نیستند. همه این تلاش ها تا حدی عمل می‌کردند ولی ژنتیک قوی‌ترین دستیابی بود زیرا مولکول‌های ناشناخته را شناسایی نمود و به طور متقاعدکننده‌ای اهمیت آن ها را در موجود زنده نشان داد.

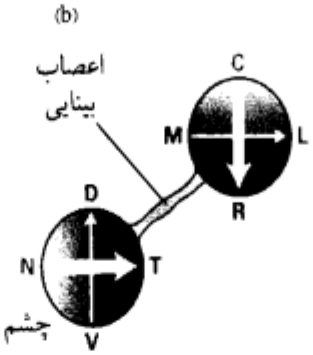
ما می‌توانیم یک استاندارد بالا برای آنچه که یک مولکول راهنمای مناسب را نشان دهد، در نظر بگیریم: این استاندارد باید توسط سلول‌هایی تولید شود که واقعا نورون ها را به محیط زنده هدایت می‌نمایند، و این باید برای هدایت لازم باشد. سلول‌های هدایت شده باید برای پاسخ‌دهی دارای حسگرها و امکانات انتقال پیام برای پاسخ‌دهی باشد و اشتباه در مکان‌یابی پیام باید منجر به چرخیدن در جهت غلط در سلول ها شود.

در اینجا چهار خانواده از پروتئین ها را بحث خواهیم نمود (شکل ۴۲-۲۳) که در زمینه موردنظر ما فعالند و با گیرنده هایشان اطلاعات مهمی برای آکسون‌های در حال رشد فراهم می‌نمایند: افرین‌ها[1]، سمافُرین‌ها[2]، نترین ها[3] و دو پروتئین دیگر بنام‌های روبو[4] و اسلیت[5]. این پروتئین ها هر دو اثر جاذبه و دافعه را روی پیام ها دارند و ارتباطات آنها دوطرفه است. پس از تشکیل ارتباطات اولیه، با حفظ ارتباطاتی کار می‌کنند و آنهایی را که در عملکرد عصبی نقش دارند حفظ می‌نمایند، ارتباطات رشته ها بهبود می‌یابد. خیلی از سلول ها که قادر به ایجاد ارتباطات مناسب نیستند طی آپوپتوز از بین می‌روند.

افرین‌ها: نقشه رتینوتکتال که در بالا توضیح داده شد مثالی قابل توجه از سادگی سیستم عصبی است که توده ظاهراً درهم برهم نورون ها را در بخش بینایی مغز در هم می‌ریزد. این پدیده جالب، به خاطر سیستم پیام رسانی قابل توجهی است که مستلزم اِفرین می‌باشد که خانواده‌ای از پروتئین‌های پیام رسان سطح سلول بوده و گیرنده های آن ها به نام اِفس[6] است. («افس» از دودمان سلولی سرطانی سلول‌های کبدی تولیدکننده اریتروپوئیتین گرفته شده است که پروتیئن ها در آنجا برای اولین بار یافت شدند). اِفس‌ها از بزرگترین خانواده‌های تیروزین‌کیناز گیرنده‌ای (RTK، فصل ۱۶)، با ۱۴ تا اِفس و ۸ تا اِفرین در موش‌ها هستند. اگرچه اِفس‌ها معمولاً به عنوان گیرنده‌های اِفرین عمل می‌نمایند ولی در برخی انواع سلول‌ها، پیام رسانی می‌تواند از جهت سلول دارای اِفس به سلول دارای اِفس برود. در تکامل نقشه رتینوتکتال، بیشتر پیام رسانی ها از افرین به گیرنده اِفس صورت می‌گیرد. هر گیرنده اِفس به طور ویژه به یک یا

1- Ephrins
2- Semaphorins
3- Netrins
4- Robo
5- Slit
6- Ephs



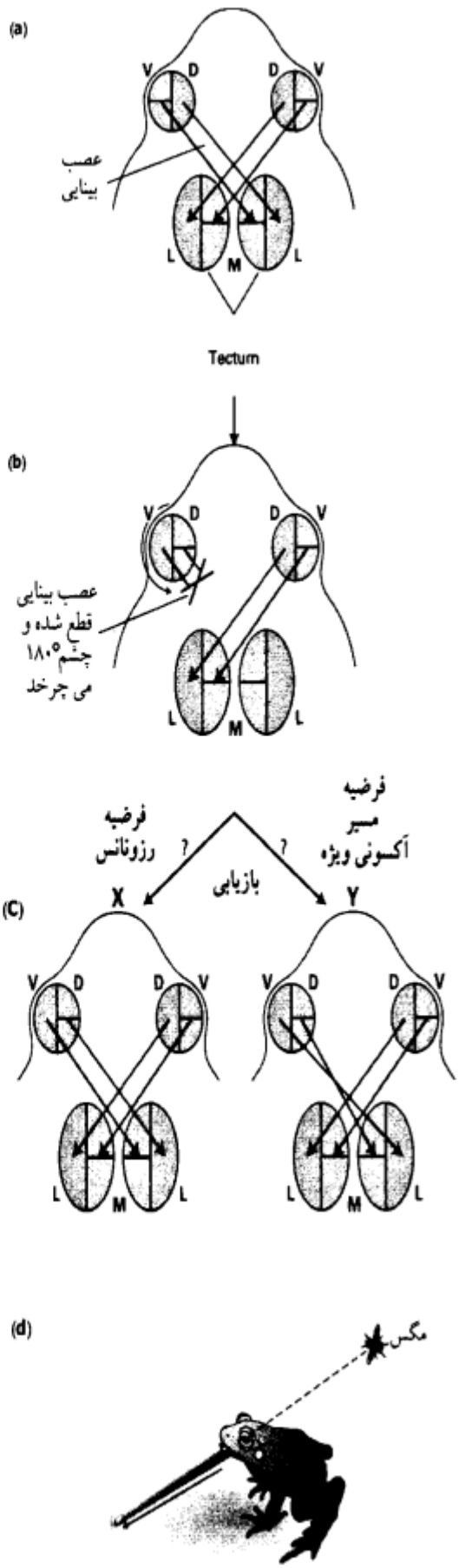


◀ شکل ۴۰-۲۳ نقشه‌های retinotectal. (a) شبکیه پشتی به tectum جانبی در بخش مخالف مغز مرتبط است، و شبکیه شکمی به tectum میانی در جهت مخالف مرتبط است. متشابهاً محور بینی - گیجگاهی (T-N) چشم در نقشه (Rosetural-Caudal) از tectum منعکس شده است. (b) نقشه‌های دنیای دیداری در شبکیه و tectum مطابق با آن °۹۰ می‌چرخد ولی در این صورت ثبت می‌شوند. فلش نشان می‌دهد که چگونه الگویی از نور روی شبکیه به صورت دسته‌ای از ارتباطات سلولی گانگلیون در شبکیه، در tectum تولید می‌شوند، به tectum پستانداران superior colliculus گویند.

تعداد کمی از اِفرین ها متصل می‌شود. اِفس‌ها و یک رده از افرین‌ها، رده A، توسط اتصالات GPI به غشاهای سطح سلول متصل می‌شوند. افرین‌های B (رده دیگری از افرین‌ها)، پروتئین‌های گذرنده از غشاء هستند (شکل ۴۲-۲۳ را ملاحظه کنید). پروتئین‌های افرین بر مهاجرت سلولی، راهنمایی آکسون، تکامل سیناپس وتکامل عروقی اثر می‌گذارند، ولی تمرکز ما بر نقش آن ها در راهنمایی و تشکیل نقشه رتینوتکتال است.

اِفس‌ها و افرین ها در شیب‌هایی توزیع شده‌اند چنانکه آکسون‌های در حال رشد می‌توانند در جهت اهداف، رشد و تشخیص مناسب داشته باشند. آنتی‌بادی‌های علیه اِفرین A5 شیبی ازپروتئین را با بیشترین میزان در جهت مقابل نشان می‌دهند. موش‌های فاقد اِفرین A5 دارای نواقص راهنمایی آکسون‌ها هستند؛ آکسون‌هایی که باید در جهت جلوی tectum می‌رفتند به نواحی پشتی آن رفتند.بررسی‌های بیشتر نشان داد که سلول ها پروتئین‌های گیرنده اِفس را در دو شیب برای کنترل راهنمایی آکسون در طول هر یک از دو محور بیان می‌نمایند (شکل ۴۳-۲۳). در هر محور، مقادیر مشخص گیرنده در سلول‌های گانگلیون شبکیه به حساسیت متمایز برای افرین‌های ویژه منتشر شده از اهداف tectum اشاره می‌نماید. اِفس A ها و اِفرین Aهایی که یک محور را کنترل می‌نمایند، با اِفس B ها و افرین Bهایی که محور دیگر را کنترل می‌نمایند. پس، آکسون ها می‌توانند مکان‌هایشان را در سیستم هماهنگ XY با خواندن سطوحی که لیگاندهایشان برای آن گیرنده دارند، «یاد بگیرد.» به عنوان مثال، آکسون‌هایی که گیرنده‌های اِفس B2، B3 و B4 دارند به نقاطی جذب می‌شوند که مقادیر بالایی از لیگاندهای افرین B1 وجود دارند، چنانکه آکسون‌هایی از شبکیه شکمی منشاء می‌گیرند با همه شیب هایشان پیچیده ترند و خیلی درک نشده‌اند. انتقال پیام تیروزین کینازی اِفس بر GTPaseهای کوچک Rho، Cdc42 و Rac اثر می‌گذارد. بنابراین تجمع اسکلت سلولی اکتین، کنترل راهنمایی مخروط رشد را بر عهده دارد. فعال‌سازی یک گیرنده اِفش ممکن است باعث جذب یا دفع مخروط رشد بسته به سلول شود.

سمافورین‌ها: سمافورین ها خانواده‌ای متنوع‌اند (شکل ۴۲-۲۳ را ملاحظه کنید)، و خیلی چیز ها باید در مورد اثرات آن ها یاد بگیریم. آن ها به خاطر سیستم الفبایی علائم پیام رسانی که برای ایجاد ارتباط در فواصل دور بودند به این نام، نامیده شدند پیام‌های سمافور هر نوع پیامی را می‌توانند بخوانند ولی در سیستم عصبی سمافورین ها تا حد زیادی پیام را حمل می‌نمایند: برو. آن ها دافع‌های قوی‌اند. خانواده دو گلیکوپروتئین سمافورین بی‌مهرگان و پنج تا در مهره داران (شکل ۴۲-۲۳) شامل آنهایی می‌شود که ترشحی‌اند و آنهایی که متصل به غشاء هستند. این امر نشان می‌دهد که برخی از آن ها روی سلول‌های مجاور عمل می‌نمایند، در حالی که بقیه برد وسیع‌تری دارند. نورون‌های حرکتی، حسی، بویایی و هیپوکامپی می‌توانند توسط پیام‌های سمافورین دفع شوند. سمافورین ها به گیرنده‌هایی بنام **پلکسین ها** متصل می‌شوند که پروتئین‌های یک بار گذرنده از غشاء هستند. این تصویر کلی از پروتئین‌های گیرنده است که به عنوان داربست قادر به حمل بین داخل و خارج سلول و همچنین

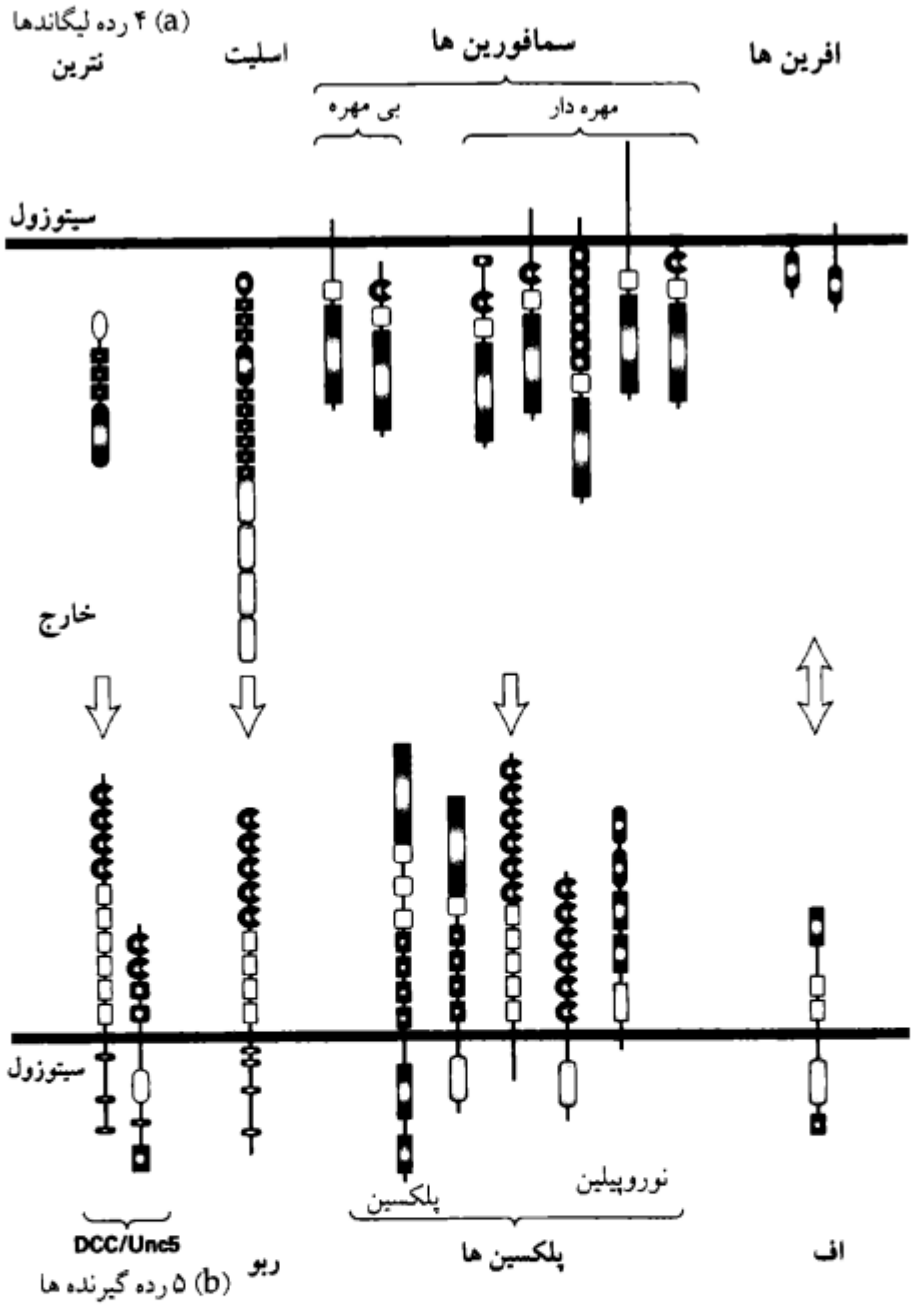


◀ شکل تجربی ۴۱ـ۲۳ آزمایشات چرخش چشم ویژگی‌های مسیریابی در آکسون را می‌آزمایند. (a) برآمدگی طبیعی اعصاب، از چشم پشتی (D) تا tectum جانبی (L) و چشم شکمی تا tectumمیانی. (b) نمایش شماتیک دو عمل متوالی، (۱) بریدن عصب بینایی و (۲) چرخش °۱۸۰ چشم (یا هیچ چرخشی در آزمایش کنترل). سپس اجازه احیای اعصاب را دادند. دقت کنید که در چشم چپ، نیمه دارای سایه سیاه، اکنون به سمت پشت آرایش می‌یابد (D)، ولی بهرحال هنوز دارای شبکیه شکمی است همانطور که در (a) نشان داده شده است. به علاوه، نیمهٔ روشن چشم که شبکیه پشتی را احاطه نموده است اکنون آرایش شکمی پیدا کرده است (V). (c) دو نتیجه ممکن، بسته به اینکه کدام فرضیه درست باشد. فرضیه رزونانس پیش‌بینی می‌کند X: بینایی ای است که ذخیره شده است زیرا عملکرد ارتباطات مناسبی را انتخاب می‌نماید. فرضیه مسیر آکسونی پیشنهاد می‌کند که Y: دیدی است که معکوس شده است زیرا آکسون‌های شبکیه‌ای پشتی به tectum جانبی می‌روند چون تمایل شیمیایی تخصص یافته است حتی اگر شبکیه پشتی اکنون در ناحیه شکمی قرار داشته باشد. (d) نتایج از فرضیه Y پشتیبانی می‌کنند؛ بینایی قورباغه معکوس شده است.

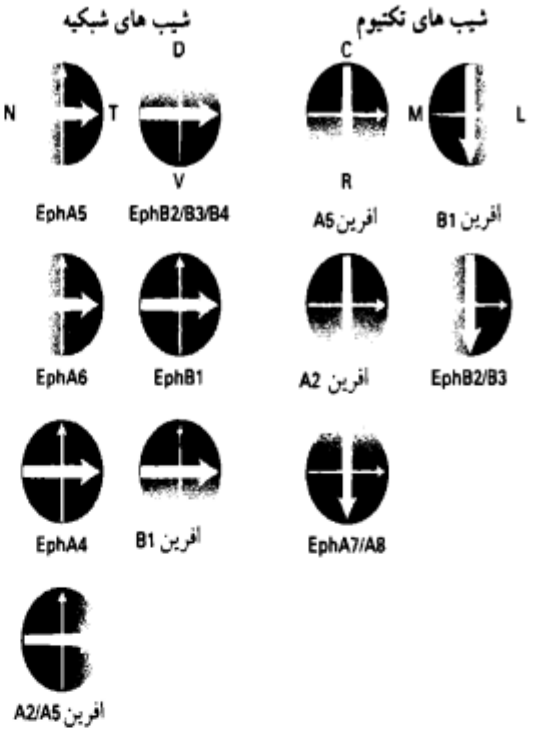
مونتاژ کمپلکس‌های پروتئینی و تغییر فعالیتهایشان هستند. این، امر چگونه رشد مخروط رشد را در ناحیه‌ای از تحقیقات کنونی ممکن می‌سازد؛ حداقل بخشی از پاسخ، پیوستگی تمایزی به سلول ها در مجاورت مخروط رشد نسبت به بقیه است.

نترین‌ها: نترین ها پروتئین‌های ترشحی‌اند که با لامینین ارتباط دارند (شکل ۴۲ـ۲۳). آن ها در بررسی‌های ژنتیکی که نورون‌های با مسیر غلط را در *C.elegans* که کرم نماتودی است که در آن هر سلول و هر نورون مشخص شده است، کشف شده‌اند. حدود ۳۰ ژن یافت شدند که سه تا از آن ها روی مسیریابی شکمی - پشتی نورون‌های حسی و ماهیچه‌ای اثر می‌گذارند (شکل ۴۴ـ۲۳): unc-6 که یک پروتئین نترین را کد می‌کند؛ unc-40 که گیرندهٔ نترین (بنام DCC در پستانداران) را کد می‌کند و unc-5 که نوع دوم از گیرنده نترین را کد می‌کند. جهش‌های نترین unc6/ بر زوائد رشد کرده در جهت شکمی و پشتی اثر می‌گذارد. نترین‌های مهره داران در مطالعات چگونگی مسیریابی نورون‌های رابط (عرضی) در نخاع‌شوکی یافت شده‌اند (شکل ۴۴ـ۲۳ را ملاحظه کنید). این نورون ها از نواحی پشتی نخاع شوکی ظاهر می‌شوند و اطراف محیط نخاع به سمت خط میانی شکمی گسترش می‌یابند.

برای آزمودن حضور مولکول‌ها، بخشی از نخاع شوکی به صورت

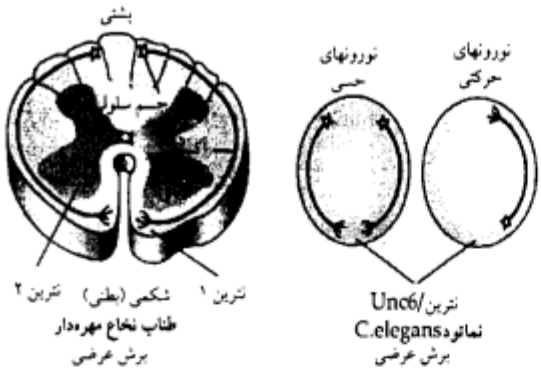


▲ **شکل ۴۲-۲۳ (شکل رنگی) خانواده‌های مولکول‌های راهنما.** چهار نوع پروتئین پیام رسان اطلاعات مهمی برای راهنمایی رشد آکسون تأمین می‌نماید. لیگاند ها (a) پروتئین‌های نترین، رُبو/اسلیت، سمافورین و اِفرین می‌باشند. گیرنده ها (b) به شرح زیرند: نترین با گیرنده‌اش DCC در مهره داران برهمکنش دارد؛ گیرنده‌ای متفاوت ولی مشابه در نماتود ها Unc5 نامیده می‌شود. هر دو حاوی دُمین‌های ایمنوگلوبولین (هلال‌های آبی رنگ) و انواع دُمین‌های دیگرند که در شکل نشان داده شده است. لیگاند Slit با گیرنده Rabe که دُمین‌های Ig دارد برهمکنش می‌نماید. سمافورین ها با انواع گیرنده ها که عموماً پلکسین نامیده می‌شوند، برهمکنش می‌نمایند. برخی برهمکنش ها از طریق دُمین‌های "sema" (میله‌های قرمز) می‌باشند که هم در لیگاند و هم در گیرنده وجود دارند. بقیه به دُمین Ig نیاز دارند. لیگاندهای اِفرین با گیرنده‌های Eph برهمکنش می‌نماید گرچه به نظر می‌رسد پیام رسانی در هر دو جهت پیش می‌رود و در برخی موارد اِفرین بیشتر شبیه گیرنده ها عمل می‌نماید. همه گیرنده ها دُمین‌های گذرنده از غشای تکی دارند. لیگاندهای نترین و اسلیت همگی ترشحی‌اند و متصل به غشاء نمی‌باشند. لیگاندهای سمافورین می‌توانند با غشا ها در درجات مختلف متصل شوند - البته برخی از آن ها نه همگی. افرین ها به غشاء متصل شده‌اند. متن را برای بحث دقیق در مورد این چهار خانواده ببینید. علاوه بر این چهار خانواده از پروتئین ها، پروتئین‌های دیگری شامل تنظیم‌کننده‌های تکاملی Wnt و Shh، در اطلاعات راهنمای اضافی سهم دارند.



▲ **شکل ۴۳-۲۳ (شکل رنگی) شیب‌های پروتئین‌های Eph از دو سیستم پیام رسانی متعامد شیب‌های گیرنده.** Eph در شبکیه چپ نشان داده شده‌اند، شیب‌های افرین در برجستگی فوقانی (tectum) در سمت راست. شیب ها در طول محورهای بینی - موقتی (شبکیه) و پشتی - فوقانی (tectum) به رنگ آبی نشان داده شده‌اند، شیب ها در طول محورهای شکمی - پشتی (شبکیه) و جانبی - میانی (tectum) به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند. هرچه رنگ ها بیشتر شوند، پروتئین بیشتری وجود دارد. فلش‌های سفید و طرح کلی فلش ها نشان می‌دهند که چگونه این نقشه‌ها با هم ارتباط دارند (شکل ۴۰-۲۳ را ملاحظه کنید). افرین برای آکسون‌های بیان‌کننده EphA دافع شیمیایی‌اند، چنانکه سلول‌های گانگلیون شبکیه که حامل گیرنده‌های EphA هستند تمایل دارند که از منشاء خود در ناحیه موقتی شبکیه به مقصدشان در tectum فوقانی جایی که غلظت افرین A ها پایین‌تر است بروند.

جداگانه یا با هم کشت داده شد. وقتی بیشتر بخش پشتی نزدیک به بخش شکمی کشت داده شد، آکسون ها به سمت بافت شکمی رشد داده شدند. هیچ رشد آکسونی وقتی دو بخش به طور جداگانه کشت شدند، مشاهده نشد. عصاره‌های بخش شکمی همان فعالیت را داشتند که رشد آکسون را به خارج از بافت پشتی تحریک می‌نماید. طی یک تخلیص موفق پروتئین ، که از حدود ۲۰۰۰۰ مغز جنین جوجه شروع شد، و با تعیین دو پروتئین که علائم جاذب شیمیایی قوی بودند ادامه یافت. هر دو پروتئین، نترین بودند. نترین ۱ به مقدار

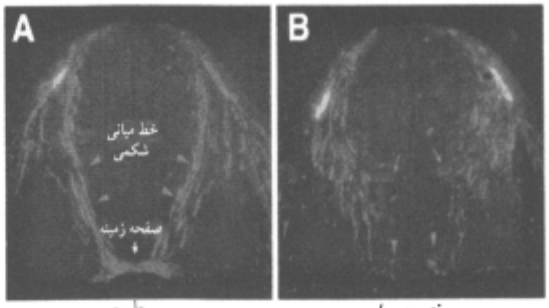


▲ **شکل ۴۴-۲۳ حفاظت تکاملی پیام رسانی نترین.** در نخاع شوکی مهره داران، نورون‌های رابط با اجسام سلولی‌شان در بخش پشتی، آکسون ها را به سمت خط میانی شکمی رشد می‌دهند، که با پیام‌های نترین جذب می‌شوند. در کرم C.elegans نورون‌های حسی، مسیر مشابهی را به سمت Ucn6/netrin طی می‌نمایند، در حالی که نورون‌های حرکتی مسیر مخالف که از نترین/ Ucn6 دور می‌شود، طی می‌کنند. آکسون‌های خاص در مهره داران نیز توسط نترین ها دفع می‌شوند، نترین ها در کرم ها از طریق جهش‌هایی که مسیریابی را با نورون‌های حسی تغییر می‌دادند و در مهره داران به صورت مولکول‌های ترشحی که می‌توانستند بر مسیریابی نورون‌های رابط در نخاع شوکی اثر بگذارند، کشف شدند.

زیاد در صفحه پایین نخاع شوکی در شکمی‌ترین بخش یافت می‌شود. اثبات بیشتری در مورد نقش نترین ها از طریق از تخریب‌کردن ژن موش به دست آمد که در آن نورون‌های رابط قادر به یافتن مسیر مناسبشان نبودند (شکل ۴۵-۲۳). نترین‌ها، آکسون‌ها را به خط میانی شکمی در نماتودها، مگس‌ها، و مهره داران به عنوان مثالی از حفاظت تکاملی عملکرد پروتئین در بیش از نیم میلیارد سال، هدایت می‌نمایند.

نوع کرمی این پروتئین دو عملکرد دارد: آکسون‌های نورون ها را به سمت خط میانی شکمی رشد می‌دهد و آکسون‌های نورون‌های حرکتی را به دور از خط میانی شکمی رشد می‌دهد. ساده‌ترین امکان‌این بود که نترین جذب آکسون ها شود و از بقیه دفع شود. در واقع شواهدی دیده شد که نورون‌های مهره داران خاصی نترین را دفع‌کننده یافتند. بررسی ژنتیکی در کرم ها نشان داد که گیرنده Unc40 برای جذب توسط نترین ها لازم است، در حالیکه گیرنده Unc5 در ترکیب با Unc40 برای دفع توسط نترین لازم است.

معمای دیگر این است که اگر آکسون‌های نورون‌های رابط توسط نترین از خط میانی شکمی جذب شوند، آکسون ها چگونه به رشد پس از اینکه از خط میانی گذشته‌اند، ادامه خواهند داد؟ می‌توان



▲ **شکل تجربی ۴۵-۲۳ (شکل رنگی) جهش‌های نترین - / - موش باعث نواقص نورون‌های رابط می‌شود.** (a) ردیابی نورون‌های رابط (قرمز) در موجود طبیعی که از قسمت پشتی شروع می‌شود (بالا) و به سمت خط میانی شکمی (بر فلش‌های سبز) رشد می‌کند و تحت اثر نترین تولید شده توسط خط میانی شکمی (صفحه زمینه) از آن عبور می‌نماید. (b) جهش یافته‌های موش-/ - نترین هموزیگوت: خیلی از نورون‌های رابط در مسیر (فلش‌های سبز) قبل از رسیدن به ناحیه شکمی پراکنده می‌شوند و بقیه (سرفلش‌های سبز) به جای اینکه از خط میانی شکمی عبور نمایند می‌چرخند.

انتظار داشت که بر گردند و در جهت معکوس حرکت کنند. راه حل این معما از بازیگران کلیدی دیگری حکایت دارد که در کشف هدایت آکسون، کمک کنند یعنی Robo,Slit و Comm.

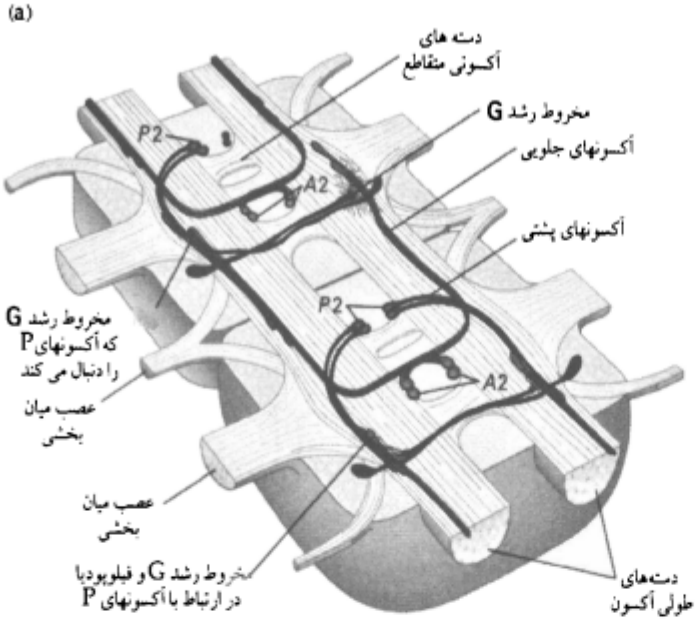
مولکول‌های هدایت‌گر Robo و Slit: مسیر آکسون‌های در حال رشد در نخاع عصب حشره، از بقایای یک نقشه مجرای زیرزمینی است (شکل ۴۶a-۲۳). ژنتیک اجازه کشف ژن‌ها و پروتئین‌هایی را می‌دهد که با تغییر نقشه بر فرایند مسیریابی اثر می‌گذارند. یک سری بزرگ از جهش‌های اتفاقی در ژنوم دروزوفیلا ایجاد شد تا جهش‌های کشنده حاصل نماید. جهش‌ها در هتروزیگوت‌ها حمل می‌شد و وقتی هتروزیگوت‌های هر دودمان آمیزش داده می‌شدند، یک چهارم فرزندان آن‌ها برای جهش تازه القا شده، هموزیگوت هستند. این فرزندان برای مشاهده نخاع عصبی رنگ‌آمیزی شدند. این نخاع عصبی معادل نخاع شوکی ماست که در نوع طبیعی شبیه یک نردبان است (شکل ۴۶b-۲۳). در دودمان‌های مگس‌ها جهش در ژنی که برای راهنمایی آکسون لازم بود رخ می‌داد، نواقصی در نخاع عصبی دیده می‌شود. در میان ژن‌هایی که به این روش تعیین شدند سه ژن بنام‌های Slit، (robo)[1] و (comm)[2] وجود داشتند. آن‌ها دسته مهم دیگری از مولکول‌های راهنمای آکسون هستند که از لحاظ تکاملی حفاظت شده‌اند.

Slit یک پروتئین ترشحی است (شکل ۴۲-۲۳ را ملاحظه کنید) که از گلیای خط میانی ساخته شده است. گیرنده Slit، Robo است که یک پروتئین یک بار گذرنده از غشاء است که فقط یک توالی کوتاه در سیتوپلاسم و دُمین‌های فیبرونکتین و ایمنوگلوبولین را در خارج غشای پلاسمایی دارد (شکل ۴۲-۲۳ را ملاحظه کنید). کمپلکس Robo/Slit یک برهمکنش غیرشیمیایی است. وجود Slit در خط میانی در دفع آکسون‌های دارای گیرنده‌های Robo نقش دارد، بنابراین در مورد عدم عبور نورون‌های یک سمت بدن به سمت مخالف اطمینان حاصل می‌نماید. در جهش یافته‌های فقدان عملکرد slit یا در جهش یافته‌های دوتایی که فاقد دو ژن robo در دروزوفیلا هستند آکسون‌ها به خط میانی می‌روند ولی هرگز نمی‌توانند آن را ترک کنند (شکل d و ۴۶c-۲۳). این امر می‌تواند با این حقیقت توضیح داده شود که در نبود گیرنده‌های Robo یا لیگاندهای آن، برهمکنش دافعه شیمیایی Robo/slit در خط میانی رخ نمی‌دهد.

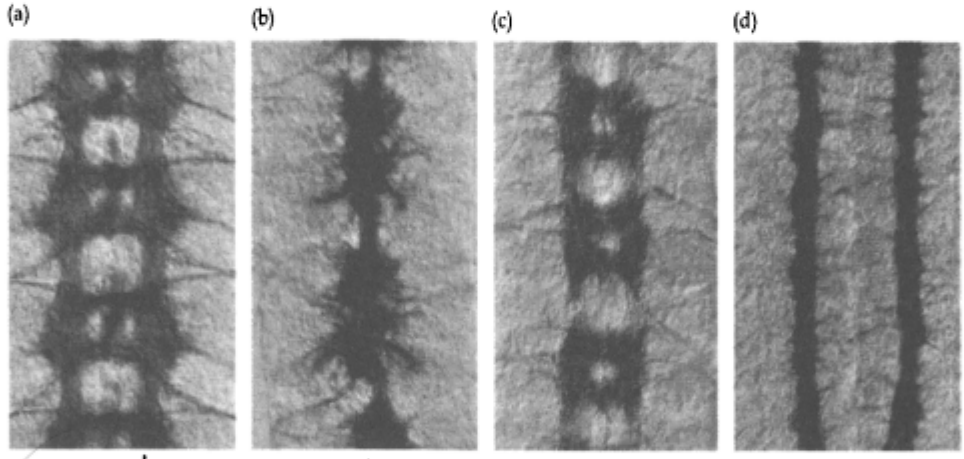
این امر این سؤال را ایجاد می‌کند که چگونه یک آکسون که نیاز به عبور از خط میانی دارد ابتدا جذب آن می‌شود و سپس از آن دفع می‌شود. یک آکسون که از خط میانی عبور می‌کند پروتئین Robo تولید می‌کند و باید با slit دفع شود ولی آکسون در ابتدا به پیام slit مقاوم است زیرا پروتئین Robo در شبکه گلژی توسط پروتئین گلژی بنام (Comm) بدام می‌افتد و هرگز به غشای سلول نمی‌رسد. وقتی آکسون به خط میانی برسد، comm غیرفعال می‌شود و دوباره به سطح می‌رسد. گیرنده‌ای که به تازگی در دسترس قرار گرفته است به Slit در خط میانی پاسخ می‌دهد و آکسون از خط میانی دورتر به خارج رشد می‌کند. فقدان عملکرد Comm به Roboهای اضافه اجازه راهیابی به سطح را می‌دهد، اگر آکسونی از خط میانی عبور ننماید (شکل ۴۶a-۲۳). بیان Comm به طور طبیعی چنان تنظیم شده است که در سلول‌هایی که آکسونشان در بخش‌های چپ یا راست طول آکسون است، خاموش باشد و در سلول‌هایی که آکسونشان باید به سمت دیگر عبور نماید، روشن باشد.

هیچ یک از این سیستم‌های راهنمای پروتئین منحصراً برای سیستم عصبی وقف نشده‌اند؛ در واقع همه آن‌ها در بافت‌های دیگر برای اهداف مختلفی به کار رفته‌اند. در واقع بیشتر توزیعات خاص سلول‌های نورونی کم و بیش انواع مبالغه‌آمیز از زواید معمول برای خیلی یا همه سلول‌ها هستند. این در موارد ذیل معلوم است (۱) در قطبی شدن نورون‌ها از دندریت تا آکسون، که پروتئین‌های تقارنی سلول را به کار می‌برند، (۲) در سیستم‌های انتقال اندامک بین سلولی

1- Roundobout 2- Commissureless



◀ **شکل ۴۶-۲۳ (شکل رنگی) فنوتیپ جهش‌ها در جهش یافته‌های راهنمای آکسون در نخاع عصبی حشره.** (a) این دیاگرام مثالهایی را که مسیرهایی نورون ها برای عبور به کار می‌برند و رابط ها را تشکیل می‌دهند، نشان می‌دهد. «رابط» ها پله‌های نردبان هستند که با دسته‌های طولی آکسون بهم مرتبط شده‌اند. این دیاگرام از مطالعات رشد آکسون در ملخ به دست آمده بود که در آن ها هر نورون می‌تواند تعیین شوند و به خاطر اندازه بزرگ چنین دنبال شوند. مثلاً نورون‌های A2 و P2 می‌توانند تشخیص داده شوند. ارتباطات بسیار شبیه به آنچه است که در جنین درزوفیلا مشاهده شده است. در جنین درزوفیلا بررسی‌های ژنتیکی برای تعیین مولکول‌های لازم برای مسیریابی مناسب آکسون (b-c) نشان داده شده‌اند. الگوی قهوه‌ای رنگ رابط ها در جنین درزوفیلا می‌تواند برای مشاهده جهش یافته‌هایی که مسیریابی آکسون را به درستی انجام نمی‌دهند، استفاده شده است. در (b) الگوی طبیعی دیده می‌شود. تعداد کمی از هسته ها در شکل برای نشان دادن خط میانی، به رنگ آبی هستند. در (c-e) نخاع‌های عصبی جنین‌های هموزیگوت برای سه نوع جهش متفاوت نشان داده شده‌اند.

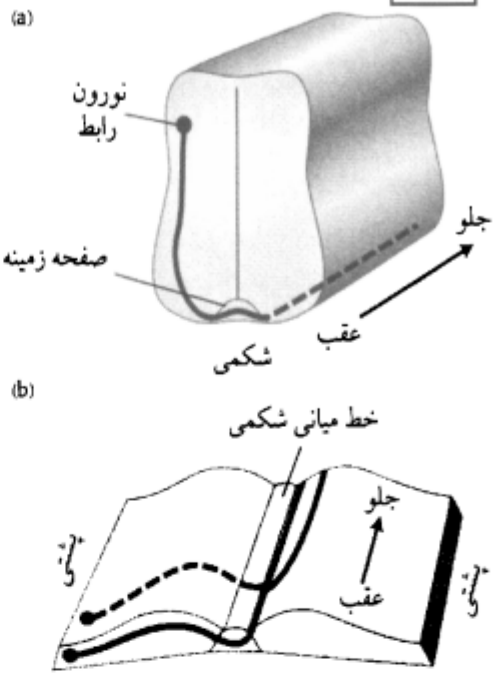


نورونی که به انواع اگزوسیتوز و اندوسیتوز وابسته‌اند، (۳) در رشد آکسون ها و دندریت ها که اشکالی از شیمیوتاکسی را دارند و (۴) در استفاده از پروتئین‌های کانالی برای حفظ جریان یونی. نورون ها یک نوع تصویری از بیولوژی سلولی‌اند، یک نوع با توانایی عملکردی خیلی بالا!

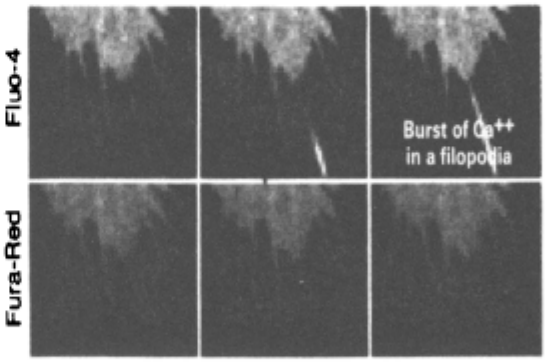
تنظیم‌کننده‌های تکاملی نیز آکسون ها را هدایت می‌نمایند

در فصل ۲۲ با دسته‌ای از پروتئین‌های ترشحی که سرنوشت سلول و در برخی موارد تقسیم سلولی را در دست دارند آشنا شدیم. چون این ها به خاطر نقششان در تکامل و تمایز کشف شدند، در آغاز به آن ها به عنوان مولکول‌های راهنمای آکسون نگاه نمی‌کردند. اکنون معلوم شده که حداقل سه دسته تنظیم‌کننده سرنوشت سلول بنام پروتئین‌های Wnt، BMP و هجهوگ[1] (خصوصا هجهوگ

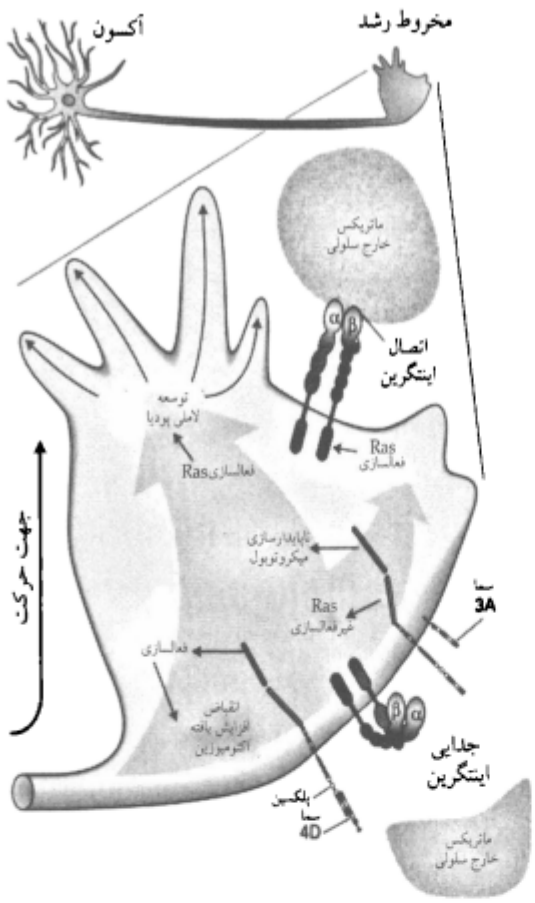
1- Hedgehog



▲ **شکل ۴۷-۲۳ (شکل رنگی) پیام‌های Wnt طویل شدن جلویی - عقبی نورون‌های رابط را در نخاع شوکی موجب می‌شوند.** (a) نخاع شوکی یک جنین ۱۳ روزه با مسیر یک نورون رابط که به رنگ قرمز نشان داده شده است. (b) تصویر «جزوه - باز» از همان مسیر که مسیرهای مختلف را که با نورون‌هایی (سبز) که تا نزدیکی خط میانی می‌رسند و نورون‌هایی (قرمز) که مسیر جانبی بیشتری را می‌گذرانند، نشان می‌دهد. هر دو به پیام‌های Wnt که خیلی جلوتر هستند، پاسخ می‌دهند.



▲ **شکل تجربی ۴۸-۲۳ (شکل رنگی) جریان‌های Ca^{2+} می‌توانند در مخروط رشد نسبت به زمان اندازه‌گیری شوند.** (a) رنگ حساس به Ca^{2+} (فلو-۴) برای نشان دادن تغییراتی در Ca^{2+} داخل سلولی استفاده می‌شود؛ رنگ فورا - قرمز به Ca^{2+} حساس نیست و به عنوان یک کنترل داخلی استفاده می‌شود. به افزایش ناگهانی Ca^{2+} در یکی از فیلوپودیا ها توجه کنید.



▲ **شکل ۴۹-۲۳ سمافورین ها موجب چرخش مخروط‌های رشد می‌شوند.** سمافورین‌های محلول مثل Sema3A یا سمافورین‌های روی سلول‌های گلیا مثل Sema4D برای چرخاندن مخروط رشد از طریق گیرنده‌های پلکسین و مسیرهای داخل سلولی عمل می‌نمایند. عدم تقارن پیام در سمت راست این سلول موجب تفکیک مخروط رشد از اینتگرین (به خاطر غیرفعال‌سازی Ras)، ناپایداری میکروتوبول‌ها، و افزایش انقباض اکتومیوزین می‌شود (از طریق فعال‌سازی Rho). در ضمن در سمت چپ، لاملی‌پودیا تحت اثر Rac فعال طویل می‌شود و اتصال اینتگرین به ماتریکس خارج سلولی تحت اثر Ras فعال شده صورت می‌گیرد.

صوتی[1] Shh) نیز می‌توانند مولکول‌های راهنمای آکسون باشند. در حالی که مجموع کل پیچیدگی مولکول‌های راهنمای دیگر نسبت به تلاش میلیون ها آکسون برای مسیریابی در مسیرهای کمپلکس خیلی کم است، ولی قابل توجه است.

در نخاع شوکی در حال رشد (شکل ۴۴-۲۳ را ملاحظه کنید)، حتی در غیاب نترین ۱ برخی از آکسون‌های رابط هنوز به سمت خط

1- Sonic hedgehog

میانی شکمی توسعه می‌یابند. یک پروتئین دیگر یعنی shh که در صفحه زمینه ساخته شد سؤال باقی ماندن فعالیت راهنماست. اثبات نقش shh از این کشف به دست آمد که (۱) سلول‌های کشت یافته که shh را ترشح می‌نمایند آکسون‌های رابط را در عصاره‌های بافتی بازآرایی می‌نمایند، (۲) نورون‌های ایزوله در محیط کشت به سمت یک منبع خالص پروتئین shh می‌چرخند، (۳) جهش یافته‌هایی که بر انتقال پیام shh اثر می‌گذارند با مسیریابی آکسون تداخل می‌نمایند. پس آکسون‌های رابط توسط نترین ۱ و shh به سمت خط میانی شکمی هدایت می‌شوند. برعکس، پروتئین‌های BMP که از نواحی پشتی منشاء می‌گیرند از نورون‌های رابط دفع می‌شوند. دیده شده که جهش یافته‌های موش در ژن‌های خاص BMP، دارای نواقصی در راهنمایی آکسون‌های رابط هستند. پس نورون‌های رابط به هل دادن توسط نترین ۱ و shh و «هل دادن» توسط BMP پاسخ می‌دهند.

در نخاع شوکی در حال رشد، پس از رسیدن آکسون‌های نورون‌های رابط به خط میانی شکمی و عبور از آن، آن ها به سرعت به سمت سر بر می‌گردند (شکل ۴۷-۲۳). در واقع، خیلی از آکسون ها باید مسیرشان را در طول محور جلویی - پشتی (A-P) (در جهت سر به دم) بیابند، ولی در مورد راهنمایی در این بُعد اطلاعات کمتری وجود دارد. کشفیات به دست آمده در کرم الگانس، دروزوفیلا و موش نشان می‌دهد که پیام‌های پروتئینی ترشحی Wnt نقش مهمی در الگوی A-P بازی می‌کنند. کاربرد یک سیستم پیام رسانی مجزا برای رشد A-P نسبت به D-V ممکن است مانع بهم پیچیدن سلول ها در حدود محور می‌شوند و زمانیکه سلول ها در مورد محور ها به طور همزمان تصمیم می‌گیرند، نقش بازی می‌کند. در اصل Wnt نیز نقش دارد. این پروتئین در شیب صفحه زمینه لوله عصبی با بیشترین مقدار نزدیک به سر تولید می‌شود. نورون‌های کشت شده می‌توانند جذب پیام‌های Wnt شوند و تداخل با انتقال پیام Wnt موجب نواقصی در مهاجرت نورون‌های رابط به جلو می‌شود. پیام‌های Wnt همچنین در هدایت رشد نورون‌های گانگلیون به سمت tectum بینایی نقش دارند (شکل ۴۰-۲۳ را ملاحظه کنید).

مولکول‌های راهنمای آکسون موجب بازگشت مخروط رشد می‌شوند

مخروط رشد لزوما یک جستجوگر است که همسایگانش را برای تصمیم‌گیری در مورد اینکه کدام راه برای گسترش آکسون مناسب است، مورد آزمایش قرار می‌دهد. علاوه بر پیام‌های پروتئینی که ما در موردش بحث کردیم، مخروط‌های رشد در محیط کشت می‌توانند به طرف نوروترانسمیترهایی مثل استیل‌کولین جذب شوند. مولکول‌های راهنما بر مخروط رشد با تنظیم مستقیم اکتین و اسکلت سلولی میکروتوبول عمل می‌نمایند. نیروهای دافعه موجب ممانعت از پیشرفت مخروط رشد می‌شوند یا باعث چرخش آن می‌شوند. جاذب ها مخروط رشد را تحریک به حرکت در جهتشان می‌نمایند. چرخش مخروط رشد با ایجاد امکان پایداری بیشتر یا گسترش بیشتر فیلوپودیا یا لاملی پودیا (یا هر دو) در یک طرف مخروط انجام می‌شود یا برعکس با فرو ریختن آن ها بر بخش دیگر، انجام می‌شود. چگونه همه فاکتورهای راهنما روی مخروط رشد اثر می‌گذارند؟ درک چگونگی پاسخ مخروط رشد به بیش از یک سیستم راهنما به یکباره، یک مسأله جالب در بیولوژی سلولی مولکولی است.

Ca^{2+} اثر زیادی بر رفتارهای مخروط رشد می‌گذارد. تغییرات زیادی در غلظت Ca^{2+} طی دوره‌های کمتر از یک ثانیه رخ می‌دهد (شکل ۴۸-۲۳)، که به خاطر عملکردهای پمپ‌ها، کانال ها و پروتئین‌های جداکننده کلسیم است. Ca^{2+} عموماً رشد نورونی را به خارج مهار می‌نماید، در نتیجه $[Ca^{2+}]$ کلی کاهش می‌یابد، خصوصا برای زمان‌های طولانی می‌تواند رشد را تحریک نماید. تغییرات موضعی‌تر و ظریف‌تر در کلسیم می‌تواند بر رشد جهت‌دار اثر بگذارد. افزایش $[Ca^{2+}]$ موضعی عموماً در جنب مخروط رشد در نزدیک‌ترین نقطه به جاذب رخ می‌دهد.

سمافورین و دافع‌های دیگر افت مخروط‌های رشد را با دپلیمریزاسیون اکتین موجب می‌شوند (شکل ۴۹-۲۳). از هم باز شدن اسکلت سلولی، ترجیحاً در جنب مخروط در نزدیک‌ترین نقطه به پیام رخ می‌دهد. همزمان، تداخل با اینتگرین ها در مجاورت سلول به طور انتخابی به بخشی از مخروط رشد اجازه شکستن به صورت مستقل از ماتریکس خارج سلولی می‌دهد. فقدان اکتین منجر به فقدان میکروتوبولها در جایی می‌شود که مخروط رشد توسعه می‌یابد. دافعه مخروط رشد وابسته به افرین به یک از سری مراحل که Rho را غیرفعال می‌سازند و تجمع اکتین را کاهش می‌دهند بستگی دارد. پس موجب از بین رفتن مخروط رشد می‌شوند.

نکات کلیدی بخش ۵-۲۳

روش موفقیت: کنترل رشد و هدایت آکسون

■ رشد مخروطها با نام لاملوپدیا در انتهای در حال رشد یک آکسون صورت می‌گیرد (شکل ۳۷-۲۳ را ملاحظه کنید). آن‌ها حاوی مناطق انگشت مانند کوچکی هستند که فیلوپودیا

نامیده می‌شود.

■ مخروطهای رشد، رشد آکسون را هدایت کرده و بنابراین تعیین کنندهٔ اصلی الگوی شروع توسعه در سیستم عصبی هستند.

■ اسکلت سلولی که رشد مخروطی را شکل می‌دهد، حاوی مجموعه‌ای از میکروتوبولهاست که در یک مجموعه از فیلامانهای اکتینی کوچک قرار گرفته‌اند (شکل ۳۸-۲۳ را ملاحظه کنید). اکتین‌ها در قله رشد مخروط رشد به صورت فیلامانت هایی تجمع یافته و بعد از گذار از مخروط رشد از هم پراکنده می‌شوند. میکروتوبولها گسترش را در این فرایند انجام می‌دهند تا رشد مخروط به خوبی صورت می‌گیرد (شکل ۳۹-۲۳ را ملاحظه کنید.)

■ الگوهای روشنایی در شبکیه به تکتوم که محل بینائی در مغز است برده می‌شوند و در قالب یک نقشه نمایش داده می‌شوند (شکل ۴۰-۲۳ را ملاحظه کنید). سلول‌های گانگلیون شبکیه که شبکیه را به تکتوم پیوند می‌دهند نظم این الگو را حفظ کرده و در نتیجه نقشه شبکیه با نقشه موجود در تکتوم مطابقت پیدا می‌کند.

■ آکسونهای رشد یافته از شبکیه به تکتوم به دو صورت میانی - جانبی و پشتی - شکمی می‌باشند (شکل ۴۱-۲۳ را ملاحظه کنید). این رشد توسط پیامهای پروتئینی متنوعی صورت می‌گیرد. اتصالات متفاوت بین سطوح مخروطهای در حال رشد و سایر نورون‌ها و ماتریکس خارج سلولی بر مسیر انتخابی مخروطهای رشد تأثیر می‌گذارد.

■ چهار سیستم هدایت مولکولی تا به حال جداسازی شده است (شکل ۲۴-۲۳ را ملاحظه کنید): افرین‌ها و Ephs ؛ سمافورین‌ها و پلکسین‌ها ؛ نترین‌ها و گیرنده‌های DCC و اسلیت‌ها (Slits): روبوس (Robus) و کامس (Cumms). تعداد اعضای زیاد این دسته از خانواده‌های پروتئینی اغلب تفکیک نقش تک‌تک آنها را مشکل کرده است. تمامی این خانواده‌ها به طور محکم در طول تکامل حفاظت شده‌اند و حتی بعضی از عملکردهای ویژه آنها در تکوین مانند هدایت جانبی - وسطی رشد آکسون به طور کامل حفاظت شده است.

■ افرین‌ها و Ephs‌ها در هدایت آکسونهای گانگلیون شبکیه مهم هستند (شکل ۴۳-۲۳ را ملاحظه کنید). دسته‌های مختلف پروتئین‌های Eph در هر کدام از دو جهت عمل کرده و سیستم دوبعدی تشکیل می‌دهند.

■ پیامهایی سمافورین با عمل بر روی گیرنده‌های پلکسینی آنها اثرات دافعه بر روی مخروطهای رشد دارند (شکل ۴۹-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ پیامهای نترین برای رشد مخروطهای حاوی گیرنده‌های نترین مانند DCC جذاب هستند اما همچنین نترینها می‌توانند پیامهای دافعه‌ای نیز داشته باشند (شکل ۴۴-۲۳ را ملاحظه کنید). نترین‌ها آکسونها را به سمت جانبی - میانی در طناب نخاعی مهره‌داران هدایت می‌کنند.

■ غربالگری ژنتیکی منجر به کشف پروتئین‌های روبو، اسلیت و کامس شده است. اسلیت پیامهایی را ترشح می‌کند که بر روی گیرنده روبو عمل کرده در حالیکه کامس یک پروتئین گلژی است که چگونگی رسیدن روبو به سطح سلول را کنترل می‌کند.

مجموعه این دو پیامهایی را ایجاد می‌کند که به آکسونها اجازه می‌دهد که به سمت میانی رشد کرده و متناوباً از آن رشد پیدا کنند (شکل ۴۶-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ سه نوع از پروتئین‌های ترشحی نخستین بار به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد شناسایی شدند که اعمال هدایت را انجام می‌دادند. BMPs، Wnts و هجهوگ (شکل ۴۷-۲۳ را ملاحظه کنید).

■ مولکولهای هدایت گر آکسونی به طور مستقیم یا غیر مستقیم رشد مخروط را سبب می‌شوند. شروع رشد به علت اثرات موضعی فاکتورهای هدایتگر بر روی غشای مخروط رشد می‌باشد. اتصال پیام هدایتگر می‌تواند سبب نوسانات در کلسیم شده و فعالیت کینازها و فسفاتازها را تغییر داده و در فعالیتهای مختلف GTPaseهای کوچک مثل Ras که همایش اسکلت سلولی را کنترل می‌کند نقش داشته باشد (شکل ۴۹-۲۳ را ملاحظه کنید).

چشم‌اندازی به آینده

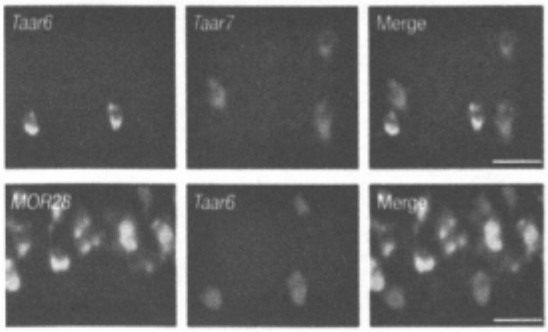
در این فصل با ویژگی‌های قابل توجه سلول‌های عصبی آشنا شدیم که ارتباط ما را با دنیای اطراف ما تأمین می‌کند. دیدیم که چگونه اندامک ها و پروتئین ها (دستگاه‌های جامع عملکرد سلول) با نیازهای خاص نورون ها مطابقت یافته‌اند. اسکلت سلولی، سلول ها را شکل می‌دهد چنانکه برخی یک متر طول دارند و بقیه الگوی منشعب و بسیار پیچیده‌ای دارند. فرایندهای انتقال و کنترل قطبیت، اندامک ها و ماکرومولکول ها را به نواحی مناسب برای عملکردشان

تبدیل می‌نماید. موتورها به سلول‌ها اجازه مهاجرت و گسترش زوایدشان را می‌دهند. سیستم‌های پیام رسانی آکسون‌های در حال توسعه را به سمت اهدافشان شامل برخی پیام‌ها که همچنین در تکامل خیلی بافت‌ها و اندام‌های دیگر استفاده می‌شوند، هدایت می‌نمایند. مولکول‌های پیوستگی سلول به سلول ارتباطات انتخابی و برگشت‌پذیر بین سلول‌ها ایجاد می‌نمایند. به طور مجزاء پروتئین‌های کانالی که احتمالاً برای صادرات یا واردات مولکول‌های متابولیک یا برای کنترل هموستازی غلظت‌های یونی تکامل یافته‌اند با تنظیم ویژگی‌های الکتریکی سلول‌ها سازگار شده‌اند. کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی و لیگاندی، پتانسیل‌های استراحت تولید می‌نمایند و سپس اجازه انتقال یکطرفه پتانسیل‌های عمل خیلی سریع را می‌دهند. سیستم جامع اندوسیتوز و اگزوسیتوز با نیازهای انتقال شیمیایی در طول سیناپس‌ها سازگار شده است. پروتئین‌های دیگر، سلول‌های حسی حساس به نور، لمس، درد، صدا، بو و مزه ساخته‌اند. علاوه بر خود نورون‌ها، گلیا، عایق‌سازی می‌نماید، تشکیل سیناپس را تحریک می‌کند و حفاظت ایمنی را تأمین می‌نماید. سلول‌های بنیادی ابتدا نورون‌ها و گلیا را شکل می‌دهند و برخی از آن‌ها در موجود بالغ بقا یافته و بازیابی را ادامه می‌دهند. پیشرفت‌هایی که در زیست‌شناسی سلولی سیستم عصبی رخ می‌دهد با پیشرفت‌های فراوان در جستجو برای چگونگی انجام تفسیر اطلاعات حسی، تفکرات آنالیتیکال، مکانیسم‌های باز خوردی توسط مدارهای عصبی برای کنترل تحرک، ایجاد و بازیابی خاطرات، و پاسخ‌های احساسی توسط مدارهای عصبی همراه است. برخی آزمایشات با تکنولوژی‌های غیرتهاجمی انجام می‌شوند که هزاران تا میلیون‌ها نورون را مشاهده می‌نماید و فعالیت الکتریکی جامعی را آشکار می‌نماید. بقیه فعالیت‌ها با مشاهده تعداد کمی سلول به طور همزمان با استفاده از الکترودهایی که در سلول وارد شده‌اند، صورت می‌گیرد. از دیدگاه زیست‌شناسی سلولی مولکولی برخی از بزرگترین تهییج‌ها در ناحیه جستجو در مورد مکانیسم حافظه بوده است. در بیشتر موارد حافظه به تشکیل نورون‌های جدید بستگی ندارد، در عوض نورون‌های موجود تغییر یافته‌اند. تغییرات در تعداد و مقاومت سیناپس‌ها اغلب در ایجاد و پایداری خاطرات مؤثر است. مطالعات کنونی به تغییر مولکولی که سیناپس‌ها هم در سلول‌های پیش سیناپسی و هم پس سیناپسی تغییر می‌یابند، اشاره می‌نماید. پس یک مشکل مهم این است که به نظر می‌آید تعدادی نورون است که از طریق تفکیک‌های زیست‌شناسی سلولی مولکولی امکان‌پذیر شده است در این امر نقش دارند. یک درک کامل از حافظه نیاز به یافتن راه‌هایی برای ارتباط بیولوژی سلول - مولکولی با اطلاعات دقیق‌تری در مورد مدارهای جامع دارد. این امر احتمالاً با پیشرفت‌های حاصل در روش‌های تصویربرداری که تهاجمی یا غیرتهاجمی است در ترکیب با توسعه راه‌های بهتری برای دستکاری فعالیت‌های نورون‌های منفرد یا تعداد زیادی از نورون‌ها به طور همزمان می‌باشد. این پیشرفت‌ها می‌توانند چشم‌اندازی هیجان‌انگیز برای درک مغز و انجام یک کار بهتر برای درمان بیماری‌هایی حاصل کنند که روی سیستم عصبی اثر می‌گذارند.

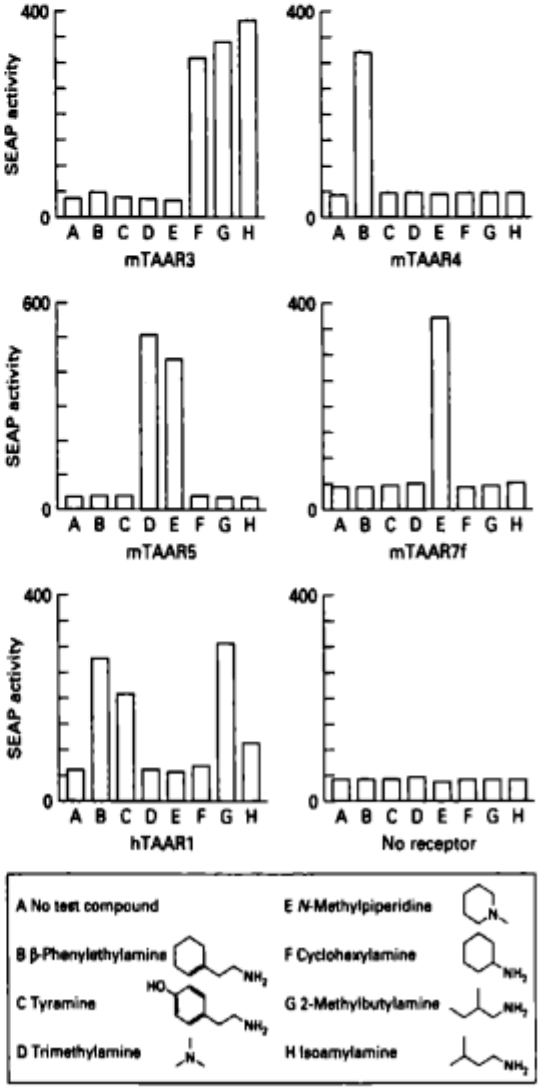
تجزیه و تحلیل داده‌ها

وقتی ترکیبات فرار به گیرنده‌های بویایی، متصل می‌شوند، بویایی رخ می‌دهد. در پستانداران، بویایی زمانی رخ می‌دهد که اپیتلیوم بویایی بینی یک نوع منفرد گیرندهٔ بویایی را بیان کند. این گیرنده‌های بویایی یک خانوادهٔ بزرگ مولتی ژن (با بیش از ۱۰۰۰ عضو) از پروتئین‌های وابسته را تشکیل می‌دهد. اتصال ذرات معطر به گیرنده، یک آبشار پیام‌دهی را که توسط پروتئین G وساطت می‌شود (به نام $G_{\alpha olf}$) القا می‌نماید. مطالعات اخیر نشان می‌دهد تعداد کمی از نورون‌های حسی بویایی در اپیتلیوم بینی وجود دارند که اعضای خانوادهٔ گیرندهٔ همراه با اثر آمینی (trace-amine) (TAAR) و گیرنده شیمیایی که گیرنده‌های متصل به پروتئین G می‌باشند، هستند (GPCRs) ولی مستقل از گیرنده‌های کلاسیک بویایی می‌باشند. ژنوم موش ۱۵ نوع TAAR را کد می‌کند، در حالی که ژنوم انسان ۶ تا کد می‌کند.

a . محققان برای آزمایش الگوی بیان TAARها در اپیتلیوم بویایی بینی، TAAR RNA را با هیبریداسیون در جا (in situ) قرار دادند. همهٔ جفت ترکیب‌های ۱۵ TAAR موش مورد آزمایش قرار گرفت. مثال نوعی نتایج به دست آمده در سری بالایی شکل زیر نشان داده شده است که در آن TAAR6 و TAAR7 با کاوشگرهای (Probe) فلورسانت در اپیتلیوم بینی موش تعیین مکان شده‌اند. کاوشگر aar با رنگ فلوئورسنت سبز و TAAR7 با رنگ فلوئورسنت قرمز نشانه‌گذاری شدند. سری پایینی شکل، جایگاه گیرندهٔ ۲۸ بویایی موش، (MOR28؛ سبز) یک گیرندهٔ کلاسیک بویایی و TAAR6 (قرمز) را نشان می‌دهد. هر تکه رنگ شده در تصاویر الگوی رنگ‌آمیزی یک نورون بویایی منفرد می‌باشد. تصاویر ترکیبی، ۲ تصویر هم‌پوشان دیگر را نشان می‌دهد. این اطلاعات چه پیشنهادی درباره الگوهای بیان TAARها می‌دهد؟

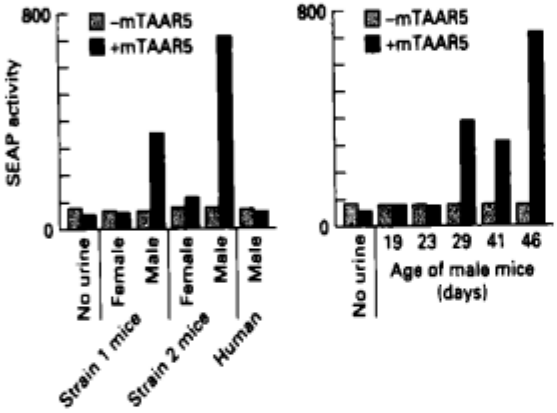


b . تعدادی از دودمان‌های سلولی که نه گیرنده‌های کلاسیک بویایی ونه TAARها را بیان می‌کردند نیز با ژنهای کدکنندهٔ TAARهای مختلف آلوده شدند. همینطور سلول‌ها به یک ژن کدکنندهٔ آلکالین فسفاتاز (SAEP) ترشح شده تحت کنترل عنصر مسئول cAMP آلوده شدند. سپس سلول‌ها همانطور که در شکل زیر نشان داده شده است در معرض آمین‌های مختلف قرار می‌گیرند و فعالیت SEAP، تعیین می‌شود. این شکل اطلاعاتی را برای برخی TAARهای نمونه نشان می‌دهد (m= موش، h= انسان). این اطلاعات چه چیزی را دربارهٔ TAARها آشکار می‌سازند؟ سنجش فعالیت SEAP



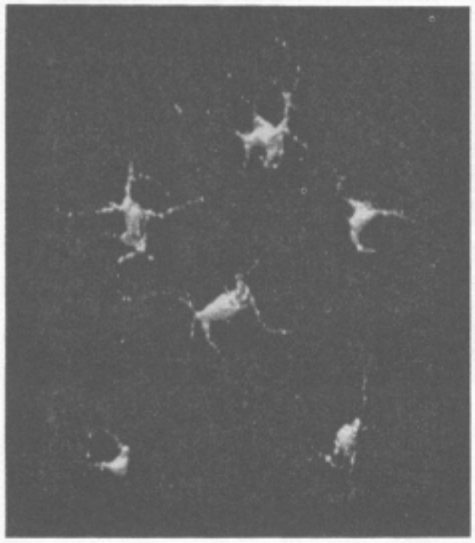
چه چیزی را دربارهٔ مسیرهای پیام‌دهی که با دریافت مواد شیمیایی مثل TAAR رخ می‌دهد، نشان می‌دهند؟

c . در سری سوم مطالعات، فعالیت SEAP در سلول‌هایی که TAAR5 موش (mTAAR5) را به دنبال قرار گرفتن سلول‌ها در معرض ادرار رقیق شده که از ۲ نژاد موش یا از انسان به دست می‌آید، بیان می‌نمایند اندازه‌گیری شد که اینها در گراف زیر نشان داده شده‌اند. موش‌ها در سن یک ماهگی به بلوغ می‌رسند. این اطلاعات چه چیزی ممکن است درباره فعالیت زیستی نورون‌های TAAR5 در موش پیشنهاد کند؟ چه مطالعاتی باید برای پشتیبانی از فرضیه‌هایتان ارائه دهید؟



فصل ۲۴

ایمنی‌شناسی



سلول‌های دندریتیک پوست در سطح خود مولکول‌های MHC کلاس دو را دارند. در این تصویر به منظور بیان، پروتئین اتصالی MHC-GFP دست‌کاری شده‌اند.

رئوس مطالب

۲۴-۱ نمای کلی دفاع‌های میزبان

۲۴-۲ ایمونوگلوبولین‌ها: ساختار و عملکرد

۲۴-۳ تنوع آنتی‌بادی و تکامل سلول‌های B

۲۴-۴ MHC و پردازش آنتی‌ژن

۲۴-۵ سلول‌های T، رسپتورهای سلول‌های T و تکامل سلول‌های T

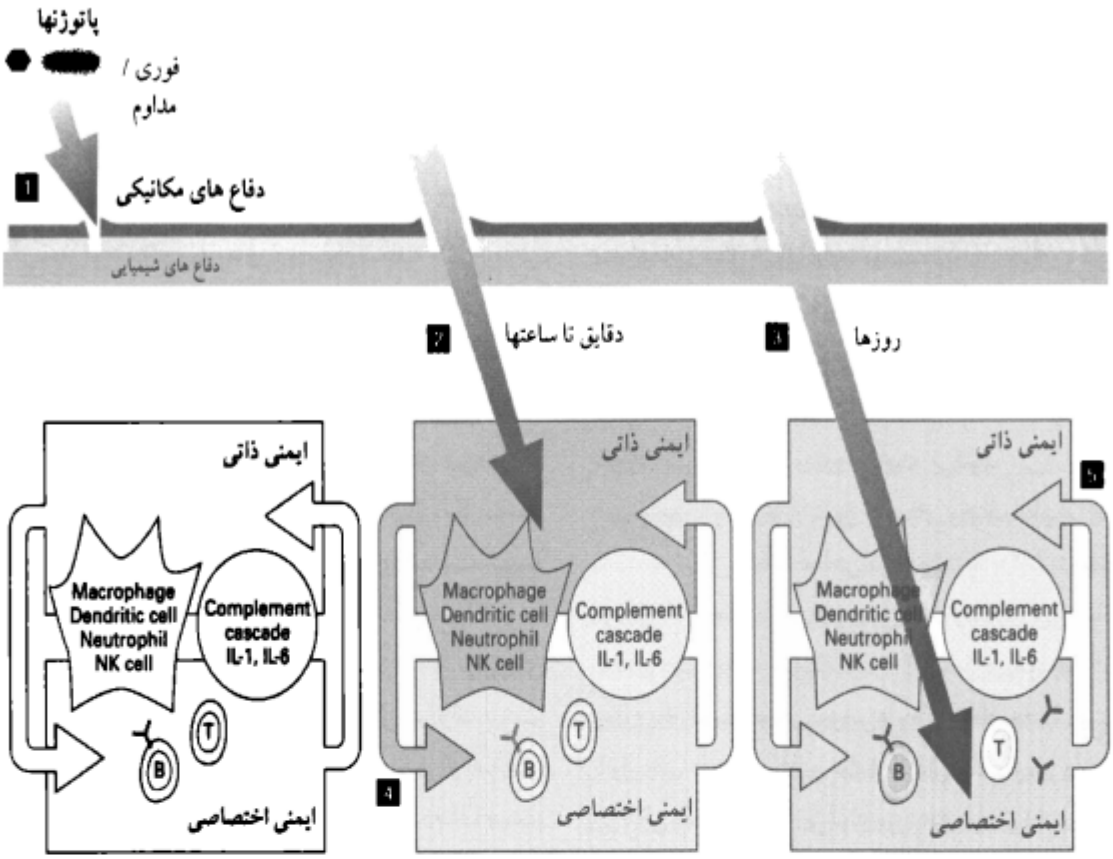
۲۴-۶ همکاری سلول‌های سیستم ایمنی در پاسخ‌های ایمنی آداپتیو

ایمنی وضعیت حفاظتی در برابر رویارویی با عوامل مضر پاتوژن می‌باشد. سیستم دفاعی میزبان اشکال مختلفی می‌تواند داشته باشد و همه پاتوژن‌های **موفق** راه‌هایی برای فلج کردن سیستم ایمنی یا دستکاری آن به نفع خودشان یافته‌اند. بنابراین عمل متقابل بین پاتوژن یک عمل تکاملی در این فرآیند می‌باشد و به همین دلیل ما مورد حمله ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها واقع می‌شویم. شیوع بیماری‌های عفونی، نقص سیستم‌های دفاعی را بیان می‌کند اما از بین بردن میزبان ضرورتاً فایده‌ای برای عامل پاتوژن ندارد، زیرا حذف کامل میزبان بلافاصله منجر به حذف منابعی می‌شود که پاتوژن در آن تکثیر کرده و زنده می‌ماند. سیستم ایمنی که بتواند یک ایمنی استریل عالی را ایجاد کند منجر به ایجاد دنیای بدون پاتوژن خواهد شد که بطور واضح با چیزی که ما از دنیای زنده می‌شناسیم مغایرت دارد. در عوض تکامل هم راستای پاتوژن‌ها و میزبان‌هایشان، به پاتوژن‌هایی که زمان تولید مثل نسبتاً کوتاه دارند اجازه می‌دهد تا روش‌های مقابله‌ای پیچیده‌ای را برانگیزند که اگر میزبان نتواند سیستم دفاعیش را بهبود بخشد مجبور به سازگاری با پاتوژن شود. سیستم ایمنی قادر به جمع‌آوری پاتوژن‌های شدیداً متنوع و همچنین سریعاً پیش‌رونده می‌باشد و ممکن است در این حین برعلیه سلول‌ها و بافت‌های خود میزبان واکنش داده و پدیده‌ای به نام **خودایمنی**[1] را به وجود آورد.

در این فصل ما اساساً به سیستم ایمنی مهره‌داران می‌پردازیم و بر روی مولکول‌ها، سلول‌ها و مسیرهایی که به طور انحصاری سیستم ایمنی را از دیگر سلول‌ها متمایز می‌کند تأکید می‌کنیم. دفاع میزبان از سه سد تشکیل شده است: (۱) دفاع‌های مکانیکی و شیمیایی، (۲) ایمنی ذاتی و (۳) ایمنی آداپتیو [اختصاصی] (شکل ۱-۲۴). دفاع‌های مکانیکی و شیمیایی بطور دایمی عمل می‌کنند. پاسخ‌های ایمنی ذاتی مستلزم سلول‌ها و مولکول‌هایی هستند که در همهٔ زمان‌ها حضور دارند و سریعاً فعال می‌شوند (دقیقه تا ساعت)، اما توانایی آنها محدود به تمایز بین پاتوژن‌های مختلف است. در عوض، پاسخ‌های ایمنی آداپتیو طی چندین روز و به صورت کاملاً اختصاصی، بطور کامل تکامل می‌یابند به عبارت دیگر، آنها پاتوژن‌های مشابه را براساس تفاوت‌های خیلی کوچک در ساختارشان می‌توانند تمایز دهند.

شناسایی رفتار **آنتی‌ژن‌ها** (هر مادهٔ بیگانه‌ای که بتواند

1- Autoimmunity



▲ **شکل ۱-۲۴ (شکل رنگی) سه سد دفاعی مهره‌داران.** چپ: دفاع‌های مکانیکی شامل اپی‌تلیال و پوست می‌باشد. دفاع‌های شیمیایی شامل pH پایین محیط معده و آنزیم‌های ضدباکتریال در اشک می‌باشد. این سدها حفاظت مداومی را در مقابل مهاجمان فراهم می‌آورند. پاتوژن‌ها باید بطور فیزیکی این سدهای دفاعی (❶) را بشکنند و باعث عفونت شوند. وسط: پاتوژن‌هایی که سد دفاعی مکانیکی و شیمیایی را بشکنند (❷) با سلول‌ها و مولکول‌های ایمنی ذاتی (آبی) که شامل سلول‌های فاگوسیت (نوتروفیل‌ها، سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها)، سلول‌های طبیعی (NK)، پروتئین‌های کمپلمان و اینترکولین‌های ویژه (IL-6 و IL-1) می‌باشد، مواجه می‌شود. دفاع‌های ذاتی در عرض چند دقیقه تا چند ساعت بعد از عفونت فعال می‌شوند. راست: پاتوژن‌هایی که توسط سیستم ایمنی ذاتی حذف نشوند با سیستم ایمنی آداپتیو (❸) به ویژه سلول‌های B و T مواجه می‌شوند. فعال‌سازی کامل سیستم آداپتیو چندین روز طول می‌کشد. محصولات ایمنی ذاتی ممکن است پاسخ ایمنی آداپتیو رخ داده را تقویت کند. (❹) علاوه بر این، محصولات پاسخ ایمنی آداپتیو، شامل آنتی‌بادی‌ها (علامت Y شکل)، ممکن‌است پاسخ سیستم ایمنی ذاتی را تسهیل کند (❺). چندین نوع سلول و محصولات ترشحی در مرز بین ایمنی ذاتی و ایمنی آداپتیو قرار گرفته‌اند و کمک می‌کنند تا این دو سد دفاعی، به هم مرتبط شوند.

پاسخ‌های سیستم ایمنی را تحریک کند) و چگونگی حذف این مواد بیگانه توسط سیستم ایمنی اساس منحصر به فرد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی این سیستم را نشان می‌دهد. ما این فصل را با خلاصه‌ای از سازمان‌دهی پستانداران، معرفی ایفاگران ضروری سیستم ایمنی ذاتی و اختصاصی و توصیف التهاب، یک پاسخ موضعی به صدمه یا عفونتی که منجر به فعال سازی سلول‌های سیستم ایمنی و فراخوانی آنها به محل اثر می‌باشد، شروع می‌کنیم. در دو بخش بعدی، ساختمان و عملکرد مولکول‌های آنتی‌بادی که به ساختارهای مولکولی اختصاصی آنتی‌ژن [اپی‌توپ] وصل می‌شوند و چگونگی تنوع در ساختار آنتی‌بادی که به شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن‌ها کمک می‌کند را بحث می‌کنیم. تنوع فوق‌العاده زیاد آنتی‌ژن‌ها که توسط سیستم ایمنی شناسایی می‌شوند برای ما نحوهٔ چگونگی بازآرایی منحصر به فرد عناصر ژنتیکی در لنفوسیت‌های B و T، که معمولاً **سلول‌های B و سلول‌های T** نامیده می‌شوند، و سلول‌های سفید خونی بوده و شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن را انجام می‌دهند، آشکار می‌سازد. بازآرایی ژنی، گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن‌ها را روی لنفوسیت‌ها کنترل و سرنوشت نهایی فرآیند تکاملی آنها را تعیین می‌کند.

اگرچه مکانیسم‌هایی که منجر به ایجاد گیرنده‌های اختصاصی

آنتی‌ژن بر روی سلول‌های B و T می‌شود خیلی مشابه‌اند اما نحوهٔ شناسایی آنتی‌ژن‌ها توسط این گیرنده‌ها خیلی متفاوت است. گیرنده‌های سلول‌های B با آنتی‌ژن‌های دست‌نخورده بطور مستقیم واکنش می‌دهند اما گیرنده‌های سلول‌های T نمی‌توانند این کار را انجام دهند. در عوض، همان طوری که در متن ۳-۲۴ شرح داده می‌شود، گیرنده‌های سلول‌های T، اشکال شکافته شده (پردازش شده) آنتی‌ژنی سطح سلول‌های هدف که به وسیلهٔ گلیکوپروتئین‌های کد شده توسط مجموعه ژنی سازگاری نسجی اصلی (MHC) ارائه می‌شود را شناسایی می‌کنند. چگونگی تشکیل گلیکوپروتئین‌های کد شده توسط MHC نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های پردازش شده برای فهم ما از نحوهٔ آغاز به کار سیستم ایمنی اهمیت دارد. همچنین گلیکوپروتئین‌های کد شده توسط MHC، سرنوشت تکاملی سلول‌های T را تعیین می‌نمایند به صورتی که بافت‌ها و سلول‌های خود موجود زنده (آنتی‌ژن‌های خودی) برخلاف آنتی‌ژن‌های بیگانه، بطور نرمال نمی‌توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند. ما این فصل را با یک دید تلفیقی از پاسخ‌های ایمنی، پاتوژن و تأکید بر همکاری بین سلول‌های مختلف سیستم ایمنی که برای یک پاسخ مؤثر لازم هستند به پایان می‌رسانیم.

۲۴-۱ نمای کلی از دفاع‌های میزبان

از آنجائیکه سیستم ایمنی تکامل یافته با پاتوژن‌ها مقابله کند پس ما نیز دید کلی دربارهٔ دفاع میزبان را با بررسی جایگاهی که پاتوژن‌های معمول یافت می‌شوند و جایگاه تکثیرشان شروع می‌کنیم. بعداً مفهوم اساسی ایمنی ذاتی و آداپتیو را که شامل بعضی از ایفاگران اصلی سلولی و مولکولی می‌باشند، معرفی می‌کنیم.

پاتوژن‌ها از طرق مختلف وارد بدن شده و در جایگاه‌های مختلف تکثیر می‌یابند

پاتوژن‌ها که بر همهٔ اشکال حیات تأثیر می‌گذارند قادر به تکثیر مستقل هستند. دو دسته متداول از پاتوژن‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها، اساساً در روش‌های تکثیرشان با هم تفاوت دارند. به استثناء پلی‌مراز که در همانندسازی مادهٔ ژنتیکی نقش دارد، ویروس‌ها بطور کلی در ماشین‌های لازم برای سنتز اجزایشان نقص دارند. بنابراین برای تکثیر، کاملاً به سلول‌های میزبان وابسته می‌باشند. در عوض، بیشتر باکتری‌ها از لحاظ متابولیکی مستقل هستند و برای تکثیر به سلول‌های میزبان تکیه نمی‌کنند که همین مسئله اجازهٔ رشد در آزمایشگاه در محیط‌های کشت مناسب را به آنها می‌دهد (به استثناء باکتری‌هایی که فقط در سلول‌های میزبان پستاندار توانایی تکثیر دارند). باکتری‌ها به علت دارا بودن فاکتورهای بیماری‌زایی که بر روی فیزیولوژی و متابولیسم میزبان عمل می‌کنند می‌توانند باعث ایجاد بیماری شوند. انگل‌ها نیز موجوداتی هستند که می‌توانند باعث بیماری شوند. به علت پیچیدگی رو به افزایش روش زندگی تک یاخته‌هایی مثل تریپانوزوم، مسبب بیماری خواب و گونهٔ پلاسمودیوم، مسبب مالاریا (رجوع به شکل ۴-۱)، روش‌های مقابله‌ای در برابر این پاتوژن‌ها نیز بطور فزاینده‌ای پیچیده می‌شود. باکتری، تک یاخته و قارچ (به ویژه آنهایی که باعث بیماری در حیوانات می‌شوند) اغلب **میکروب** نامیده می‌شوند.

مواجهه با پاتوژن‌ها از طریق مسیرهای مختلف اتفاق می‌افتد. پوست به تنهایی منطقهٔ سطحی در حدود ۲۰ sq.ft دارد؛ سطح اپی‌تلیال که راه‌های هوایی، معده روده‌ای و ژنیتال را می‌پوشاند، سطحی قابل توجه در حدود ۴۰۰۰ sq.ft را شامل می‌شود. همهٔ این سطوح بطور دایم در معرض ویروس‌ها و باکتری‌های محیط هستند. پاتوژن‌های موجود در غذا و عوامل انتقال یافته از راه جنسی، اپی‌تلیالی را که با آن مواجه می‌شوند، مورد هدف قرار می‌دهند. عطسهٔ یک فرد مبتلا به آنفولانزا میلیون‌ها ذرهٔ آئروسل را رها می‌کند که برای استنشاق به وسیلهٔ شخص بعدی آماده است تا او نیز مبتلا شود. آسیب‌دیدگی پوست، حتی اگر تنها یک خراشیدگی جزئی باشد یا ورود از بین سطح اپی‌تلیالی که بافت‌های تحتانی را محافظت می‌کند، یک مسیر آسان برای آلودگی توسط پاتوژن‌ها فراهم می‌آورد که بعداً این مسیر ورود یک منبع غنی از مواد مغزی برای باکتری و سلول‌های مورد نیاز برای تکثیر ویروس را فراهم می‌آورد.

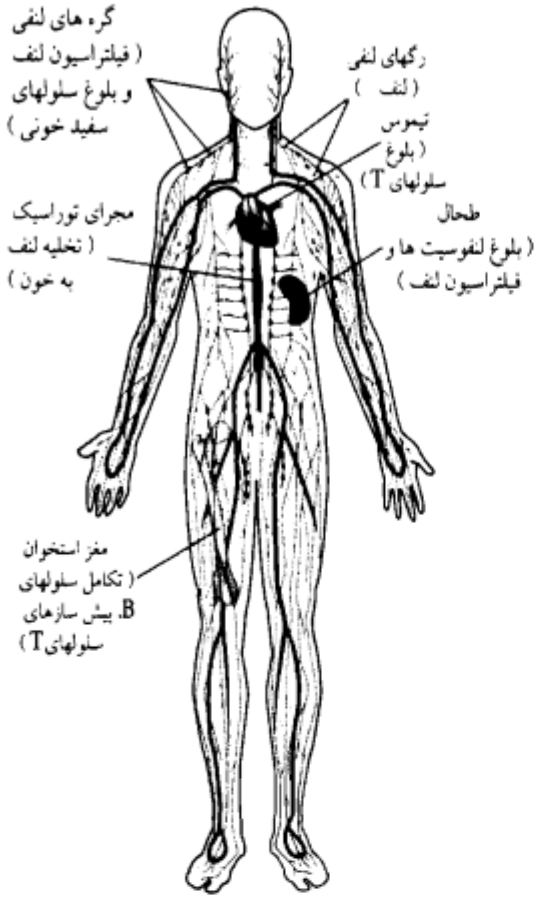
تکثیر ویروس‌ها دقیقاً محدود به سیتوپلاسم و هستهٔ سلول‌های میزبان می‌باشد جائی که سنتز پروتئین و تکثیر مواد ژنتیکی ویروس اتفاق می‌افتد. ویروس‌ها همچنین به سلول‌های دیگر به صورت ذره‌های ویروسی آزاد (ویریون) یا از طریق سلول به سلول گسترش می‌یابند. بیشتر باکتری‌ها قادر به تکثیر در فضاهای بین سلولی هستند اما در بعضی موارد، بطور اختصاصی به سلول‌های میزبان حمله کرده و در آنجا زندگی می‌کنند. چنین باکتری‌های داخل سلولی که به وسیلهٔ عمل آندوسیتوز یا فاگوسیتوز وارد سلول می‌شوند یا در وزیکول‌های غشادار و یا اگر موفق به فرار از این وزیکول‌ها نشوند در سیتوپلاسم زندگی می‌کنند. بنابراین سیستم دفاعی مؤثر میزبان نه تنها باید قادر به حذف ویروس‌ها و باکتری‌های آزاد باشد بلکه مخفیگاه سلولی چنین پاتوژن‌ها را نیز باید از بین ببرد.

لکوسیت‌ها در سرتاسر بدن گردش کرده و در بافت‌ها و گستره‌های لنفی لانه‌گزینی می‌کنند

به استثناء اریتروسیت‌ها[1] (گلبول‌های قرمز)، تعداد خیلی معدود سلول وجود دارد که بتواند در مسیر عملکردی معین خودش، همان مسافت طی شده توسط سلول‌های ایمنی را طی کند. گردش خون پستانداران به عنوان وسیلهٔ انتقالی ضروری برای اریتروسیت‌ها، لکوسیت‌ها و پلاکت‌ها عمل می‌کند. اگرچه عملکرد اریتروسیت‌ها به عنوان انتقال‌دهندگان اکسیژن، آنها را ملزم به عدم خروج از گردش خون می‌کند اما لکوسیت‌ها (گلبول‌های سفید خون) از گردش خون فقط به عنوان یک مسیر انتقالی استفاده نمی‌کنند و ممکن است در مسیر انجام وظایفشان، گردش خون را ترک کرده و مجدداً به آن بازگردند.

سیستم ایمنی، سیستمی مرتبط به هم از رگ‌ها، اندام‌ها و سلول‌ها می‌باشد که به دو ساختار لنفوئیدی اولیه و ثانویه تقسیم می‌شود (شکل ۲-۲۴). ارگان‌های لنفاوی اولیه (جائی که **لنفوسیت‌ها** (زیرمجموعه‌ای از لکوسیت‌ها شامل سلول‌های B و T) تولید شده و خصوصیات عملکردیشان راکسب می‌کنند) تیموس راکه محل تولید سلول‌های T و مغز استخوان راکه محل تولید سلول‌های B می‌باشد، شامل می‌شود. سلول‌هایی با منشاء خونساز که توسط کبد جنین در دوران جنینی و توسط مغز استخوان در سرتاسر عمر تولید می‌شود در همهٔ ارگان‌های لنفاوی وجود دارند. مجموع کل لنفوسیت‌ها در یک فرد بزرگسال جوان ۵۰۰×۱۰^{۹} تخمین زده می‌شود. تقریباً ۱۵ ٪ در طحال، ۴۰ ٪ در ارگان‌های لنفاوی ثانویه (گره‌های لنفی، لوزه‌ها)، ۱۰ ٪ تیموس و ۱۰ ٪ در مغز استخوان وجود دارد و بقیه در جریان خون گردش می‌کنند.

لکوسیت‌ها برای انجام وظایفشان باید گردش خون را ترک کرده و وارد بافت‌ها شوند. فشار شریانی مثبتی که توسط پمپاژ قلب ایجاد می‌شود اجازهٔ خروج از طریق رگ‌های خونی مهره‌داران و درنتیجه خروج از گردش خون را می‌دهد. این مایع نه تنها شامل مواد مغذی است بلکه دارای پروتئین‌هایی است که عملکرد دفاعی دارند. به منظور حفظ هموستازی، مایعی که گردش خون را ترک می‌کند، در نهایت باید دوباره به آن بازگردد و مایع لنف نیز همین کار را از طریق رگ‌های لنفاوی انجام می‌دهد. حجم کلی لنف حداکثر سه برابر حجم کل خون است. رگ‌های لنفی در دورترین نقطه انتهایی‌شان به صورت باز هستند تا عمل جمع‌آوری مایع بینابینی که سلول‌ها را در بافت‌ها غوطه‌ور می‌سازد، انجام دهند. رگ‌های لنفاوی به رگ‌های جمع‌آوری‌کننده بزرگ‌تری می‌پیوندند که لنف را به گره‌های لنفی



▲ **شکل ۲-۲۴ سیستم‌های گردش خون و لنفاوی.** عمل پمپاژ قلب موجب ایجاد فشار شریانی مثبتی می‌شود که خون را از گردش خون به فضای بینابینی بافت‌ها وارد کرده و بدین ترتیب همه سلول‌های بدن به مواد مغذی دسترسی پیدا کرده و مواد زائد خودشان را دفع می‌کنند. مایع بینابینی بطور کلی حجمی سه برابر حجم خون در گردش دارد و این مایع از بین ساختمان‌های آناتومیکی خاصی بنام گره‌های لنفی عبور کرده و به صورت لنف به گردش خون بازمی‌گردد. مغز استخوان که پیش سازهای سلول‌های B و T و تیموس که سلول‌های T را تولید می‌کنند جزء ارگان‌های لنفاوی اولیه هستند. آغاز پاسخ‌های ایمنی، اعضای لنفاوی ثانویه مانند طحال و گره‌های لنفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

تحویل می‌دهد. گره لنفی شامل کپسولی می‌باشد که آن را به مناطقی تقسیم می‌کند که توسط انواع سلول‌های ساکن در آن مورد شناسایی قرار می‌گیرد. رگ‌های خونی وارد گره لنفی شده و سلول‌های B و T را به داخل آن آزاد می‌کند. لنف علاوه بر آنتی‌ژن‌های محلول، سلول‌هایی را که با آنتی‌ژن برخورد کرده‌اند (نمونه‌برداری شده) نیز

1- Erythrocyte

حمل می‌کند و این لنف جمع‌آوری شده از بافت‌ها به وسیلهٔ رگ‌های لنفاوی آوران ویژه به گره لنفی تخلیه می‌شود. گره‌های لنفی با دارا بودن سلول‌ها و مولکول‌های لازم برای عملکرد پاسخ ایمنی آداپتیو و توانایی پاسخ‌دهی به آنتی‌ژن‌های جدیدتر کسب شده و عملکردهای مؤثر لازم برای رهایی بدن از پاتوژن‌ها را فراهم می‌آورد (شکل ۳-۲۴).

گره‌های لنفی را می‌توان به عنوان فیلترهایی در نظر گرفت که اطلاعات آنتی‌ژنیک جمع‌آوری شده از نقاط دور سرتاسر بدن را به شکل مناسب به سیستم ایمنی ارائه می‌دهند تا پاسخ ایمنی مناسبی را بر علیه آنها برانگیزانند. همه مراحل مربوطه که منجر به فعال‌سازی لنفوسیت‌ها می‌شود در ارگان‌های لنفاوی اتفاق می‌افتد. سلول‌هایی که آموزش صحیح را دریافت کرده‌اند، از لحاظ عملکردی فعال شده و گره لنفی را از طریق رگ‌های لنفاوی وابران ترک کرده و در نهایت به جریان خون تخلیه می‌شوند. چنین سلول‌های فعال شده‌ای توسط جریان خون دوباره گردش می‌کنند (حالا آماده برای عمل) و ممکن است در مناطقی دوباره جریان خون را ترک کنند، به سمت بافت‌ها حرکت کنند، مهاجمان پاتوژنیک را جستجو کنند یا سلول‌های عفونی شده با ویروس را بکشند.

خروج لنفوسیت‌ها و دیگر لکوسیت‌ها از جریان خون، فراخوانی این سلول‌ها به محل‌های عفونت، پردازش اطلاعات آنتی‌ژنیک و بازگشت سلول‌های ایمنی به جریان خون به صورت دقیقی توسط فرایندهایی مثل بروز چسبندگی سلولی ویژه، الگوهای کموتاکسی و عبور از سدهای اندوتلیال تنظیم می‌شوند و ما بعداً به آن می‌پردازیم.

سدهای مکانیکی و شیمیایی نخستین سد دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهد

همان طوریکه قبلاً نیز ذکر شد، دفاع‌های مکانیکی و شیمیایی اولین خط دفاعی میزبان در مقابل پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهند (شکل ۱-۲۴ را ملاحظه کنید). دفاع‌های مکانیکی شامل پوست، اپی‌تلیال و اسکلت خارجی بندپایان، سدهای دفاعی هستند که تنها بوسیلهٔ آسیب‌های مکانیکی یا از طریق حملهٔ آنزیماتیک شیمیایی ویژه از هم می‌پاشند. دفاع‌های شیمیایی نه تنها pH پایین ترشحات معده بلکه آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم اشک را نیز شامل می‌شود که بطور مستقیم به میکروب‌ها حمله می‌کند.

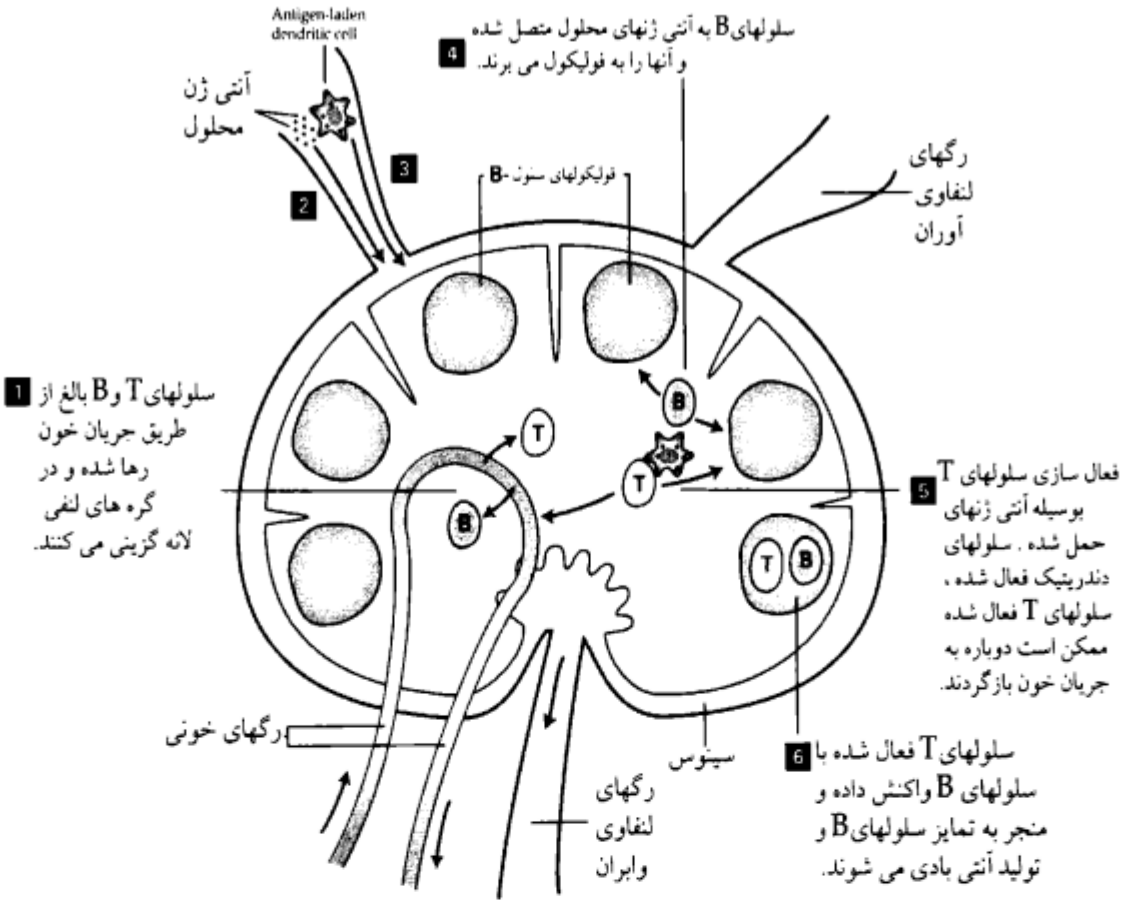
اهمیت دفاع‌های مکانیکی که به صورت دایمی عمل می‌کنند بی‌تردید در مورد قربانیان سوختگی واضح است. زمانی که یکپارچگی اپیدرم از بین می‌رود، منابع غنی مواد مغذی موجود در بافت‌های تحتانی در معرض قرار می‌گیرند و باکتری‌های مؤثر در هوا یا باکتری‌های بی‌ضرر موجود در پوست، به صورت کنترل نشده‌ای تکثیر می‌یابند و در نهایت میزبان را از پای درمی‌آورند. همچنین ویروس‌ها و باکتری‌ها برای از بین بردن یکپارچگی سدهای فیزیکی، راهکارهایی را تکامل داده‌اند. مثلاً ویروس‌های پوشش‌دار مانند HIV، ویروس هاری و ویروس آنفولانزا پروتئین‌های غشایی دارند که ویژگی‌های چسبندگی به آن می‌دهد و بنابراین ویریون به منظور عفونی کردن سلول، به سطح آن اتصال می‌یابد و چسبندگی مستقیم پوشش ویروس با غشای سلولی میزبان، موجب آزادسازی مواد ژنتیکی به درون سیتوپلاسم میزبان می‌شود که همانندسازی، رونویسی و ترجمه در آنجا برای ویروس امکان‌پذیر است (شکل‌های ۴-۴۷ و ۴-۴۹ را ملاحظه کنید) و یا باکتری‌های بیماری‌زای ویژه‌ای مانند S اورئوس، آنزیم کلاژناز را ترشح می‌کنند که یکپارچگی بافت پیوندی را از بین برده و راه ورودی باکتری‌ها را آسان می‌سازد.

ایمنی ذاتی سد دفاعی دوم را بعد از شکست سدهای مکانیکی و شیمیایی فراهم می‌آورد

به محض شکست سیستم‌های دفاعی مکانیکی و شیمیایی، سیستم ایمنی ذاتی فعال شده و حضور مهاجم حس می‌شود. سیستم ایمنی ذاتی شامل سلول‌ها و مولکول‌هایی است که بلافاصله برای پاسخگویی به پاتوژن در دسترس می‌باشند. فاگوسیت‌ها[1]، سلول‌هایی که پاتوژن‌ها را بلع کرده و از بین می‌برند، در سرتاسر بافت‌ها و اپی‌تلیال گسترده شده و می‌توانند به محل‌های عفونت فراخوانده شوند. همچنین پروتئین‌های محلول متعددی که به صورت دایمی در خون حضور دارند و یا در پاسخ به عفونت یا التهاب تولید می‌شوند توانایی کمک به دفاع ذاتی را دارند. موجودات زنده‌ای مثل حشرات که سیستم ایمنی آداپتیو ندارند برای مقابله با عفونت صرفاً به سیستم دفاعی ذاتی خود متکی هستند.

فاگوسیت‌ها و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن: سیستم ایمنی ذاتی شامل ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های دندریتیک[2] می‌باشد. همهٔ این سلول‌ها فاگوسیتیک هستند و گیرنده‌های شبه تول (TLRs)[3] دارند. اعضای این خانواده از پروتئین‌های سطحی سلول، الگوی گسترده‌ای از مارکرهای ویژه پاتوژن را مورد شناسایی

1- Phagocytes
2- Dendritic cells
3- Toll-like receptors



▲ **شکل ۳-۲۴ شروع پاسخ‌های ایمنی آداپتیو در گره‌های لنفی.** شناسایی آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های B و T (لنفوسیت‌ها) موجود در گره‌های لنفی منجر به شروع پاسخ‌های ایمنی آداپتیو می‌شود. لنفوسیت‌ها جریان خون را ترک کرده و در گره‌های لنفی لانه‌گزینی می‌کنند (❶). لنف آنتی‌ژن‌ها را به دو شکل حمل می‌کند (آنتی‌ژن‌های محلول و آنتی‌ژن‌های حمل شده توسط سلول‌های دندریتیک). هر دوی این‌ها از طریق رگ‌های لنفاوی آوران به گره‌های لنفی وارد می‌شوند (❷). (❸) آنتی‌ژن‌های محلول توسط سلول‌های B شناسایی می‌شوند. (❹) و آنتی‌ژن‌های حمل شده توسط سلول‌های دندریتیک به سلول‌های T ارائه می‌شوند. (❺) واکنش متقابل زایا بین سلول‌های B و T (❻) موجب حرکت سلول‌های B به داخل وزیکول‌ها و تمایز آنها به پلاسماسل می‌شود که مقدار زیادی ایمونوگلوبولین (آنتی‌بادی) تولید می‌کنند. رگ‌های لنفاوی وابران لنف را از گره لنفی به گردش خون بازمی‌گردانند.

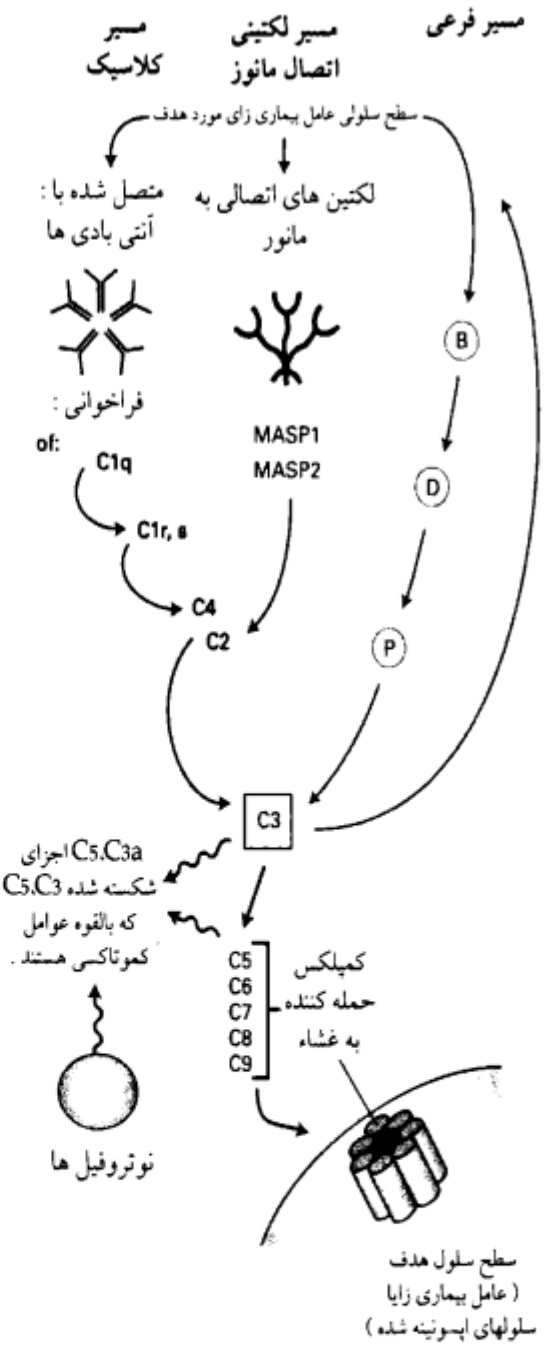
قرار می‌دهند. بنابراین پروتئین‌های مهمی برای شناسایی حضور مهاجمان باکتریایی یا ویروسی محسوب می‌شوند. درگیری گیرنده‌های شبه تول در برانگیختن مولکول‌های مجری مثل پپتیدهای ضدمیکروبی اهمیت بسزایی دارد. همچنین گیرنده‌های شبه تول سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها، پاتوژن‌ها را شناسایی کرده و به عنوان عرضه‌کننده آنتی‌ژن[1] (APCs) عمل کرده و مواد بیگانه پردازش شده را به سلول‌های T ویژه آنتی‌ژن عرضه می‌کنند. جزئیات ساختار و عملکرد گیرنده‌های شبه تول و نقش آنها در فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک در بخش ۶-۲۴ شرح داده می‌شود.

سیستم کمپلمان: یکی دیگر از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی، کمپلمان است که مجموعه‌ای از پروتئین‌های سرمی ضروری که بطور مستقیم به سطوح میکروبی و قارچی انتقال یافته و منجر به فعال شدن آبشار پروتئولیتیک شده و پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منفذ بنام کمپلکس حمله‌کننده به غشاء[2] (MAC) را ایجاد کرده و در نتیجه غشای محافظ پاتوژن را نفوذپذیر می‌کند (شکل ۴-۲۴). سیستم کمپلمان را می‌توان شبیه به آبشار انعقادی خون تصور کرد یعنی هر مرحله از واکنش که به صورت موفقیت‌آمیز فعال شود، واکنش بعدی را گسترش می‌دهد. حداقل سه مسیر مجزا می‌تواند کمپلمان را فعال کند. مسیر کلاسیک[3] که به حضور آنتی‌بادی تولید شده در پاسخ‌های ایمنی آداپتیو و اتصال یافته به سطوح میکروبی

1- Antigen - Presenting Cells

2- Membrane attack complex

3- Classical pathway



◀ شکل ۴-۲۴ سه مسیر فعال‌سازی کمپلمان. مسیر کلاسیک شامل تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی است که اجزای کمپلمان مانند C_{1q} را فراخوانده و منجر به فعال شدن C_{1r} و C_{1s} می‌شود و این کمپلکس نیز به ترتیب C_4 و C_2 را فعال می‌کند که بعداً C_3 را به فرم فعالش تبدیل می‌کنند. در مسیر MBL، ساختارهای غنی از مانوز موجود در سطح اکثر پاتوژن‌ها به وسیلهٔ MBL شناسایی می‌شوند و واکنش بینابینی آنها منجر به فعال‌سازی دوسرین پروتئاز، MASP-1 و MASP-2 می‌شود. مسیر فرعی به فرم ویژه‌ای از پروتئین اصلی کمپلمان بنام C_3 نیاز دارد که بر روی سطوح میکروبی قرار می‌گیرد و فعالیت‌های بعدی C_3 توسط فاکتورهای موجود در سرم بنام فاکتور B، D و P انجام می‌گیرد. هر کدام از اجزای مسیر فعالیت کمپلمان توسط آبشار پروتئازی مورد شناسایی قرار می‌گیرند که اجزای رو به پایین آنها نیز فعالیت پروتئازی دارند. هر مرحله‌ای که به صورت موفقیت‌آمیزی طی شود موجب گسترش فعالیت مراحل بعدی می‌شود. هر سه مسیر به تشکیل C_3 فعال می‌انجامد که شکل‌گیری MAC را به راه انداخته و منجر به تخریب سلول‌های هدف می‌شود. قطعات کوچک ایجادشدهٔ C_3 و C_5 در مسیر کمپلمان موجب فراخوانی نوتروفیل‌ها و سلول‌های فاگوسیت‌کننده‌ای می‌شود که باکتری‌ها را در زمان کوتاه از بین برده و یا می‌بلعند.

نیاز دارد. مسیر فرعی[1] که مستقیماً توسط بیشتر سطوح میکروبی فعال می‌شود و بالاخره مسیر لکتین اتصالی مانوز (MBL)[2] که توسط پاتوژن‌هایی با دیوارهٔ غنی از مانوز فعال می‌شود. به این صورت که MBL به مانوز اتصال یافته و موجب فعال‌سازی دو پروتئاز وابسته به لکتین اتصالی مانوز[3]، یعنی MASP-1 و MASP-2 می‌شود که اجازهٔ فعالیت رو به پایین اجزای آبشار کمپلمان را می‌دهد.

در مسیر فعال شدن کمپلمان، پروتئین‌های کمپلمان C3 و C4 نقش ویژه‌ای بر عهده دارند. این دو پروتئین به مقدار فراوان در سرم موجود هستند و به صورت پیش‌سازهایی سنتز می‌شوند که دارای پیوند تیواستر داخلی بین ریشه‌های اسید آمینه سیستئین و گلوتامات در مجاورت نزدیک به هم می‌باشند. این پیوند تیواستر شدیداً توسط فعالیت پروتئولیتیکی مولکول‌های فرادست مربوط به خودشان شکسته شده و در نتیجه C3 و C4 فعال می‌شوند. پیوند تیواستر فعال شده می‌تواند با گروه آمین اولیه یا هیدروکسیل مجاور خود واکنش دهد و بدین ترتیب منجر به ایجاد پیوند کووالان بین C3 یا C4 با یک پروتئین و یا کربوهیدرات در دسترس شود. اگر چنین واکنش‌دهندگانی در دسترس نباشند پیوند تیواستر به آسانی هیدرولیز می‌شود. چنین نحوه عملکردی تضمین می‌کند که قطعات C3 و C4 تا زمانی که کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در مجاورت هم باشد پیوند کووالانی خود را حفظ کنند.

بدون توجه به اینکه کمپلمان از کدام مسیر فعال می‌شود، C3 فعال شده اجزای انتهایی آبشار کمپلمان را از C5 تا C9 فعال کرده و منجر به تشکیل MAC می‌شود که به داخل اکثر غشاهای زیستی نفوذکرده و میزان نفوذپذیری آنها را تغییر می‌دهد. در نتیجهٔ از دست دادن الکترولیت‌ها و مواد محلول کوچک، سلول هدف لیز شده و می‌میرد. هر زمانی که کمپلمان فعال شود MAC نیز فعال شده و منجر به مرگ سلولی می‌شود که کمپلمان روی آن فعال شده بود. چنین تأثیر میکروب‌کشی مستقیم در نتیجه فعال شدن آبشار

1- Alternative pathway

2- Mannose - binding lectin pathway

3- Mannose - binding lectin - associated proteases

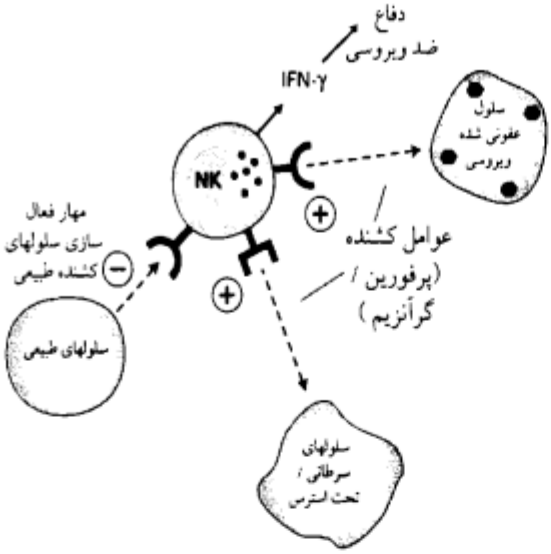
کمپلمان به طور کامل، یک عملکرد حفاظتی مهمی در بدن محسوب می‌شود.

هر سه مسیر فعال شدن کمپلمان قطعات شکسته شدهٔ C3a و C5a را تولید می‌کنند و به گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G، اتصال یافته و به عنوان عوامل کموتاکسی برای نوتروفیل و سلول‌های دیگر درگیر در التهاب عمل می‌کنند. در هر سه مسیر، قطعات حاصل از فعالیت کمپلمانی C3 سلول‌ها را مورد هدف قرار داده و منجر به تغییر آرایش کووالانسی این ساختارها می‌شود. سلول‌های فاگوسیت‌کننده، این برچسب‌های مشتق شده از C3 را برای شناسایی، بلع و تخریب چنین ساختارهای تغییر یافته به کار می‌برند و این فرآیند در اصطلاح اپسونیزاسیون[1] نامیده می‌شود.

سلول‌های کشنده طبیعی (NK): سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی، علاوه بر مهاجمان باکتریایی در مقابل ویروس‌ها نیز به دفاع می‌پردازند. زمانی که حضور سلول عفونی ویروسی تعیین شد، با وجود اینکه دیگر سلول‌های ایمنی ذاتی فعال می‌شوند، سلول‌های NK، هدف‌های ویروسی شده را جستجو کرده و آنها را می‌کشند. برای مثال بیشتر سلول‌های عفونی ویروسی، **اینترفرون نوع یک**[2] را تولید می‌کنند که برای فعال‌سازی سلول‌های NK لازم است. فعال شدن سلول‌های NK نه تنها حفاظت مستقیمی را به وسیلهٔ کارخانه سازنده ذره‌های ویروسی ایجاد می‌کند بلکه اینترفرون γ را ترشح می‌کند که برای هماهنگی بیشتر جنبه‌های دفاع ضد ویروسی ضروری می‌باشد (شکل ۵-۲۴). اینترفرون‌ها، به عنوان سایتوکاین طبقه‌بندی می‌شوند و پروتئین‌های ترشح شده کوچکی هستند که با روش‌های مختلف به تنظیم سیستم ایمنی کمک می‌کنند. ما با سایتوکاین‌های دیگری مواجه خواهیم شد و در مورد بعضی از گیرنده‌هایشان در بخش‌های بعدی بحث خواهیم کرد.

التهاب پاسخ پیچیده بدن به آسیب می‌باشد که هم ایمنی ذاتی و هم ایمنی آداپتیو را در بر می‌گیرد

زمانی که بافت دارای عروق صدمه ببیند، یک سری پاسخ‌های معمولی را به دنبال دارد که **التهاب** نامیده می‌شود. صدمه می‌تواند برشی ساده توسط کاغذ و یا عفونتی توسط عامل پاتوژن باشد. التهاب یا پاسخ‌های التهابی توسط چهار علامت مشخص شناسایی می‌شوند: قرمزی، ورم، گرما و درد. علامت‌ها ناشی از نشت افزایش یافته مولکول‌ها از رگ‌های خونی (اتساع عروقی)، جذب سلول‌ها به



▲ **شکل ۵-۲۴ سلول‌های کشنده طبیعی.** سلول‌های کشنده طبیعی منبع مهم ترشح سایتوکاین اینترفرون γ (IFN - γ) هستند و سلول‌های سرطانی و آلوده به ویروس را به وسیله پرفورین[3] می‌کشند. پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منفذ به سرین پروتئازهایی به نام گرآنزیم[4] اجازه می‌دهند وارد سیتوپلاسم سلول شده و آنها را از بین ببرند (بخش ۲۱).

محل صدمه دیده و توسط واسطه‌های محلول مسئول احساس گرما و درد می‌باشد. التهاب از طریق فعال‌سازی سلول‌ها و تولید محصولات محلول که به کمک یکدیگر باعث پاسخ ایمنی ذاتی می‌شوند سطح حفاظتی فوری ایجاد می‌کند و علاوه بر آن، التهاب موضعی ایجاد می‌کند که موجب آغاز پاسخ‌های ایمنی آداپتیو می‌شود. البته اگر التهاب به صورت صحیحی کنترل نشود می‌تواند مسبب اصلی آسیب‌های بافتی نیز بشود.

شکل ۶-۲۴ ایفاگران اصلی پاسخ‌های التهابی با پاتوژن‌های باکتریایی و به دنبال آن، آغاز پاسخ‌های ایمنی آداپتیو را ترسیم می‌کند. سلول‌های دندریتیک ساکن در بافت، حضور آنتی‌ژن را از طریق گیرنده‌های شبه تول خود (TLR) حس کرده و با آزادسازی واسطه‌های محلول مثل سایتوکاین[5] و کموکاین[6] به آنها پاسخ می‌دهند و همچنین آنها به عنوان عوامل کموتاکتیک برای سلول‌های سیستم ایمنی محسوب می‌شوند. نوتروفیل‌ها[7] به عنوان سلول‌های ثانویه مهم در پاسخ‌های ایمنی، جریان خون را ترک کرده

1- Opsonization
2- Interferon
3- Perforin
4- Granzyme
5- Cytokine
6- Chemokine
7- Neutrophils

و به سمت بافت صدمه دیده و یا عفونت ناشی از پاسخ بدن به واسطه‌های محلول متعدد موجود در بافت صدمه، مهاجرت می‌کنند. نوتروفیل‌ها که تقریباً نیمی از لکوسیت‌های در گردش خون را تشکیل می‌دهند، فاگوسیت‌کننده هستند و باکتری‌های پاتوژن را بلع و تخریب می‌کنند. نوتروفیل‌ها همچنین با طیف وسیعی از پاتوژن‌های مشتق شده از ماکروفاژها از طریق گیرنده‌های شبه تول واکنش متقابل دارند، و فعال شدن این گیرنده‌ها موجب می‌شود که نوتروفیل‌ها، سایتوکاین و کموکاین تولید کنند. نوتروفیل‌ها همچنین می‌توانند لکوسیت‌های بیشتری (نوتروفیل، ماکروفاژ و در نهایت لنفوسیت (سلول‌های B و T)) را به محل عفونت جذب کنند. نوتروفیل‌های فعال شده موجب آزادسازی آنزیم‌های تخریب‌کننده باکتری‌ها (بطور مثال لیزوزیم و پروتئاز) و همچنین پپتیدهای کوچک با خاصیت ضدمیکروبی (دفنسین) می‌شوند. نوتروفیل‌های فعال شده همچنین آنزیم‌هایی که آنیون سوپراکسید و مواد واکنش‌دهنده اکسیژنی دیگر را تولید می‌کنند را فعال می‌کنند (بخش ۱۲) و بدین ترتیب میکروب‌ها را در بازه زمانی کوتاه می‌کشند. سلول‌های دیگری که به پاسخ‌های التهابی کمک می‌کنند ماست‌سل‌های[1] بافتی هستند. زمانی که این سلول‌ها به وسیلهٔ محرک‌های فیزیکی و شیمیایی فعال می‌شوند هیستامین را آزاد می‌کنند که نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهد و بنابراین دسترسی به پروتئین‌های پلاسمایی (بطور مثال کمپلمان) را آسان می‌سازد که این پروتئین‌ها می‌توانند در مقابل عوامل مهاجم به دفاع بپردازند.

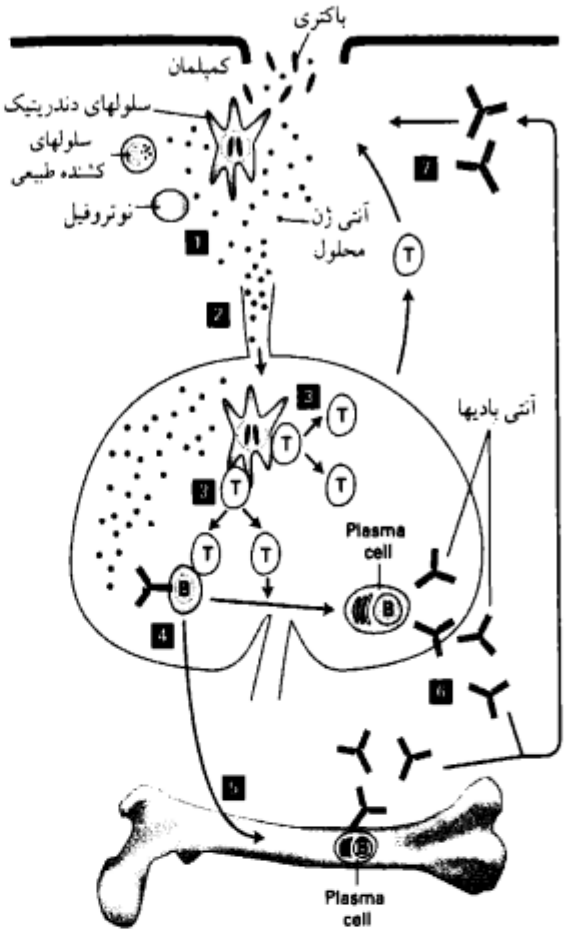
یکی از پاسخ‌های اولیه خیلی مهم به عفونت یا تهاجم، فعال‌سازی پروتئازهای متعدد پلاسمایی شامل پروتئین‌های آبشار کمپلمان می‌باشد که در بالا بحث شد (شکل ۴-۲۴). پپتیدهای تولید شده در مسیر فعال‌سازی این پروتئین‌ها، فعالیت کموتاکتیک دارند و نوتروفیل‌ها را به محل صدمه دیده جذب می‌کنند و سایتوکاین‌های التهابی مثل اینترکولین ۱ و ۶ (IL-1 و IL-6) تولید می‌کنند. فراخوانی نوتروفیل‌ها به افزایش نفوذپذیری عروقی نیز وابسته است که بویژه توسط واسطه‌گرهای لیپیدی (بطور مثال پروستاگلاندین‌ها[2] و لکوترین‌ها[3]) مشتق از فسفولیپیدها و اسیدهای چرب ایجاد می‌شود. همهٔ حوادث ذکر شده سریعاً اتفاق می‌افتد بدین ترتیب که در طی دقایق اولیه آسیب شروع می‌شوند. شکست در حذف عامل بوجودآورندهٔ چنین پاسخ‌های فوری منجر به التهاب می‌شود که سیستم ایمنی آداپتیو نقش مهمی را در آن ایفا می‌کند.

زمانی که تعداد پاتوژن‌های موجود در محل عفونت زیاد باشد امکان دارد از ظرفیت توانایی پاسخ‌دهی سیستم ایمنی ذاتی فراتر باشد. علاوه بر این بعضی پاتوژن‌ها در مسیر تکاملی خود ابزارهایی کسب می‌کنند که سیستم ایمنی ذاتی را ناتوان کرده و یا موفق به فرار می‌شوند. در چنین موقعیت‌هایی، پاسخ‌های سیستم ایمنی آداپتیو برای کنترل عفونت ضروری است. سیستم ایمنی آداپتیو وابسته به سلول‌های تخصص یافته‌ای است که سعی می‌کنند بین سیستم ایمنی ذاتی و آداپتیو ارتباط برقرار کنند و شامل سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن مانند ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک می‌باشند که قادر هستند پاتوژن‌های دست نخورده را بلع کرده و آنها را بکشند. سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به وسیله سلول‌های دندریتیک می‌توانند آنتی‌ژن‌های مشتق شده از پاتوژن‌هایی که به تازگی کسب شده‌اند را به اندام‌های لنفاوی ثانویه تحویل دهند و پاسخ ایمنی آداپتیو را آغاز کنند.

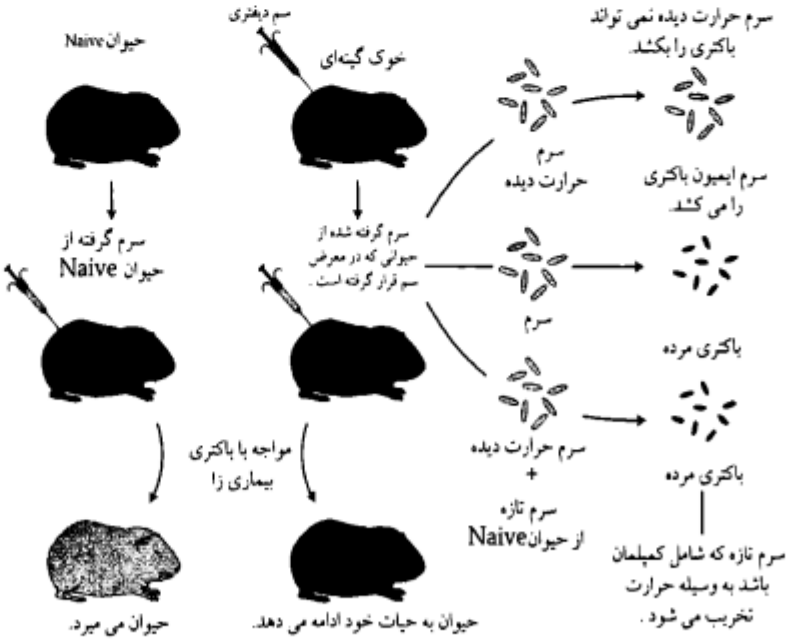
سیستم ایمنی آداپتیو، سد دفاعی سوم بدن، به صورت اختصاصی عمل می‌کند

لنفوسیت‌هایی که گیرنده‌های ویژه آنتی‌ژن را دارا می‌باشند سلول‌های اصلی مسئول ایمنی آداپتیو هستند. شاهد اولیهٔ پاسخ ایمنی آداپتیو به صورت طبیعی با کشف آنتی‌بادی که مولکول‌های مجری اصلی ایمنی آداپتیو می‌باشند توسط ونبرینگ[4] و شیباسابورو کیتاساتو[5] در سال ۱۹۰۵ مطرح شد. آنها مشاهده کردند که وقتی سرم (مایع داخل رگی که بعد از اتمام فرآیند لخته شدن خون از بقیه سلول‌ها، جدا می‌شود) خوکچهٔ هندی ایمونیزه شده با یک دوز غیرکشنده سم دیفتری را به حیوانی که قبلاً هرگز در معرض آن قرار نگرفته، انتقال دهند، حیوان گیرنده در مقابل دوز کشنده سم همان باکتری محافظت پیدا می‌کند. اما انتقال سرم از حیوانی که هرگز در معرض توکسین دیفتری قرار نگرفته باشد حفاظتی را در پی نخواهد داشت و تنها زمانی که حیوان موردنظر با سرم حیوان دهنده‌ای که قبلاً با میکروب به عنوان منبع سم برخورد کرده، ایمونیزه شود حفاظت اتفاق می‌افتد. تجربهٔ فوق اختصاصیت سیستم ایمنی آداپتیو را اثبات می‌کند، به عبارتی سیستم ایمنی آداپتیو می‌تواند بین دو مادهٔ بسیار مشابه از یک دسته، تمایز قائل شود. چنین اختصاصیتی معیاری برای سیستم ایمنی آداپتیو محسوب می‌شود. اجزای این سیستم می‌توانند پروتئین‌هایی را که تفاوت آنها

1- Mast cell
2- Prostaglandin
3- Leukotriene
4- Emil Von Bering
5- Shibasaburo Kitasato



▶ شکل ۶-۲۴ عمل متقابل سیستم ایمنی آداپتیو و ایمنی ذاتی در برابر پاتوژن‌های باکتریایی. به محض اینکه باکتری سدهای دفاعی مکانیکی و شیمیایی را شکست با اجزای آبشار کمپلمان و سلول‌های ایجادکننده حفاظت فوری مانند نوتروفیل روبرو می‌شود (❶) واسطه گرهای التهابی متنوع القاء شده توسط صدمات بافتی به پاسخ‌های التهابی موضعی کمک می‌کنند. تخریب موضعی باکتری موجب رهاسازی آنتی‌ژن‌های باکتریایی می‌شود که از طریق لنف آوران به گره لنفی وارد می‌شوند (❷). سلول‌های دندریتیک آنتی‌ژن‌ها را در محل عفونت گرفته و در پاسخ به محصولات میکروبی به صورت مهاجر درآمده و به طرف گره لنفی حرکت می‌کنند تا سلول‌های T را در آنجا فعال کنند (❸). در گره لنفی سلول‌های T تحریک شده توسط آنتی‌ژن، تکثیر پیدا کرده و عملکردهایی اجرایی مانند کمک به سلول‌های B را کسب می‌کنند. (❹) بعضی از سلول‌های B ممکن است به طرف مغز استخوان حرکت کنند و در آنجا تمایزشان را کامل کرده و به پلاسماسل تبدیل شوند. (❺) در مراحل آخر پاسخ‌های ایمنی، سلول‌های T فعال شده کمک زیادی به سلول‌های B بیان‌کننده آنتی‌ژن می‌کنند تا آنتی‌بادی‌های اختصاصی آنتی‌ژن به مقدار فراوان توسط پلاسماسل‌ها تولید شود (❻). آنتی‌بادی‌ها در نتیجه در معرض قرارگیری اولیه با باکتری‌ها تولید می‌شوند و همراه با کمپلمان سعی در حذف عفونت دارند (❼) که در این صورت بدن یا در برابر عامل پاتوژن مقاوم می‌شود و یا حفاظت سریعی را در مواجههٔ مجدد با همان آنتی‌ژن از خود نشان می‌دهد.



▶ شکل ۷-۲۴ تجربه وجود آنتی‌بادی‌ها در سرم حیوانات عفونی توسط ونبرینگ و کیتاساتو اثبات شد. در معرض قرارگیری حیوانات با دوز کشنده سم دیفتری (یا باکتری تولیدکنندهٔ سم دیفتری) موجب تولید ماده‌ای در سرم حیوانات می‌شود که آنها را در مقابل دوز کشندهٔ همان سم (یا باکتری تولیدکنندهٔ همان سم) محافظت می‌کند. تأثیر حفاظتی این مادهٔ سرمی را می‌توان از یک حیوان که در معرض پاتوژن قرار گرفته است به حیوان دیگری انتقال داد که قبلاً در معرض چنین پاتوژنی قرار نگرفته است و زمانی که گیرنده سرم در معرض دوز کشندهٔ همان باکتری قرار می‌گیرد، به حیات خود ادامه می‌دهد. چنین تأثیری برای پاتوژن برانگیزنده پاسخ، اختصاصی می‌باشد. بنابراین سرم یک مادهٔ قابل انتقال (آنتی‌بادی) دارد که در مقابل تأثیرات مضر پاتوژن‌های بیماری‌زا موجب حفاظت می‌شود. سرم گرفته شده از این حیوانات را سرم ایمیون می‌نامند که فعالیت باکتری‌کشی خود را در محیط خارج از بدن (*In Vitro*) نیز حفظ می‌کند. حرارت دادن سرم ایمیون فعالیت باکتری‌کشی آن را از بین می‌برد و با اضافه کردن سرم حرارت ندیده تازه از یک حیوان که در معرض پاتوژن قرار نگرفته است فعالیت باکتری‌کشی سرم ایمیون حرارت دیده از سر گرفته می‌شود. بنابراین سرم شامل مادهٔ دیگری است که فعالیت آنتی‌بادی را کامل می‌کند.

تنها در یک اسید آمینه است از یکدیگر تشخیص دهند. با توجه به‌این تجربه‌ها ونبرینگ، وجود ذراتی بنام ("Antikörper") یا آنتی‌بادی را به عنوان عوامل حفاظتی بدن مطرح کرد. سرم‌های محتوی آنتی‌بادی (سرم ایمیون) نه تنها حفاظت را در داخل بدن ایجاد می‌کند بلکه توانایی کشتن میکروب‌های داخل لوله (آزمایشگاه) را نیز دارد. حرارت دادن سرم‌های ایمیون تا ۵۶°C خاصیت کشندگی آن را از بین می‌برد اما با اضافه کردن سرم تازه حرارت ندیده از حیوانی که تا به حال در معرض میکروب قرار نگرفته است، می‌توان این فعالیت را مجدداً بازگرداند. چنین یافته‌هایی وجود یک فاکتور ثانویه‌ای را پیشنهاد می‌کند که امروزه **کمپلمان** نامیده شده و در کشتن باکتری‌ها با آنتی‌بادی همکاری می‌کند. ما امروزه آنتی‌بادی‌های ونبرینگ را به عنوان پروتئین‌های سرمی بنام **ایمونوگلوبولین**[1] می‌شناسیم و در این میان کمپلمان نیز یک سری پروتئین‌های پروتئازی محسوب می‌شود (شکل ۴-۲۴). ایمونوگلوبولین‌ها نه تنها سموم باکتری‌ها را خنثی می‌کند بلکه همچنین با اتصال مستقیم به عوامل مضری مانند ویروس‌ها، توانایی اتصال به سلول‌های میزبان را از آنها سلب می‌کنند. آنتی‌بادی‌هایی که در مقابل سم مار تولید می‌شوند را می‌توان به افرادی تجویز کرد که تحت گزش مار قرار گرفته‌اند تا جلوی مسمومیت ناشی از سم را بگیرد. آنتی‌بادی‌های ضد سم مار به سم مار اتصال یافته و از اتصال سم به هدفشان در میزبان، جلوگیری کرده و آن را خنثی می‌کنند. بنابراین آنتی‌بادی‌ها می‌توانند تأثیر پیشگیری‌کنندهٔ فوری نیز داشته باشد.

نکات کلیدی بخش ۱-۲۴

مروری بر سیستم دفاعی میزبان

■ دفاع‌های مکانیکی و شیمیایی موجود زنده را در برابر پاتوژنها محافظت می‌کند. این نوع حفاظت، فوری و پیوسته بوده اما ویژگی کمتری دارد. ایمنی با تأخیر و آداپتیو محافظت در برابر پاتوژنهایی را که از سدهای مکانیکی / شیمیایی عبور کرده‌اند فراهم می‌کند. (شکل ۱-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ سیستم‌های گردش خون و لنف بازیگران سلولی و مولکولی در ایمنی فوری و آداپتیو را در سرتاسر بدن توزیع می‌کنند (شکل ۲-۲۴ ر ملاحظه کنید).

■ ایمنی فوری بوسیله سیستم کمپلمان (شکل ۴-۲۴ را ملاحظه کنید) و انواع متعددی از لوکوسیت‌ها که قسمت عمده آن‌ها نوتروفیل‌ها بوده و بقیه سلول‌های فاگوسیت کننده مانند ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک هستند واسطه‌گری می‌شود. سلول‌ها و مولکولهای ایمنی فوری به سرعت آماده می‌شوند (دقیقه‌ها تا ساعت‌ها). الگوی مولکولی تشخیص حضور پاتوژنها می‌تواند توسط گیرنده‌های شبه تول شناسایی شود ولی ویژگی شناسایی خیلی بالاست.

■ ایمنی آداپتیو توسط سلول‌های T و B واسطه‌گری می‌شود. این سلول‌ها برای فعال شدن کامل و رشد به چندین روز نیاز دارند ولی آنها می‌توانند چندین نوع آنتی ژن را از هم تمییز دهند.

■ ایمنی آداپتیو و فوری به صورت همیار عمل می‌کنند. التهاب به عنوان یک پاسخ اولیه در پاسخ به آسیب بافتی به چندین فرایند احتیاج دارد که عناصر سیستم ایمنی فوری و آداپتیو را با هم ترکیب می‌کنند (شکل ۶-۲۴ را ملاحظه کنید).

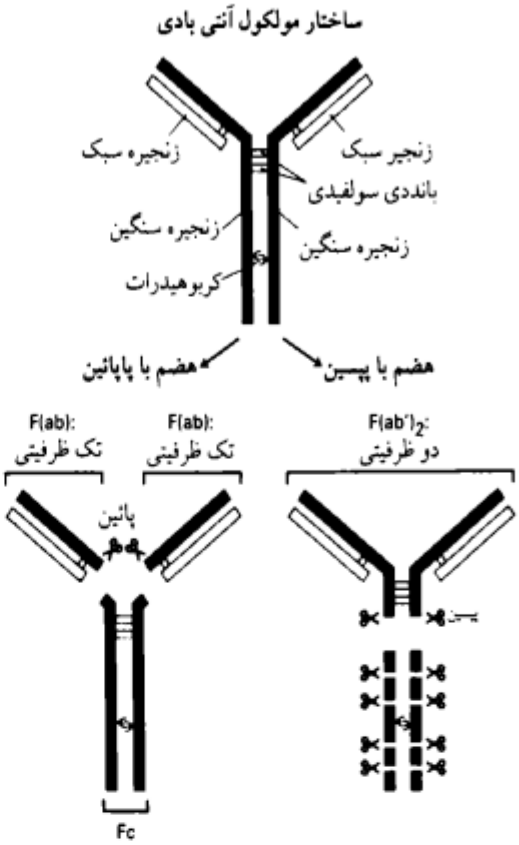
۲-۲۴ ایمونوگلوبولین‌ها: ساختار و عملکرد

ایمونوگلوبولین‌ها که توسط سلول‌های B تولید می‌شوند، شناخته‌شده‌ترین مولکول‌های مرتبط با ایمنی آداپتیو هستند. در این بخش ما تمامی سازماندهی ساختاری ایمونوگلوبولین‌ها، تنوع ساختاریشان و چگونگی اتصال آنها به آنتی‌ژن را شرح می‌دهیم.

ایمونوگلوبولین‌ها ساختارهای حفاظت شدهٔ حاوی زنجیره‌های سنگین و سبک دارند.

ایمونوگلوبولین‌ها مانند کمپلمان[2]، از جمله پروتئین‌های فراوان سرمی هستند که می‌توان آنها را براساس خصوصیات عملکردی و ساختاریشان طبقه‌بندی کرد. با استفاده از تجزیه آنتی‌سرم [سرمی که حاوی آنتی‌بادی است] که براساس فعالیت‌های عملکردی مانند کشتن میکروب‌ها و اتصال به آنتی‌ژن پایه‌گذاری می‌شود، ایمونوگلوبولین‌ها را به عنوان دسته‌ای از پروتئین‌های سرمی طبقه‌بندی می‌کنیم که مسئول فعالیت آنتی‌بادی هستند. ایمونوگلوبولین‌ها ترکیبی از دو زنجیره سنگین (H) یکسان هستند که توسط پیوندهای کووالانی به دو زنجیره سبک (L) یکسان دیگر متصل شده‌اند (شکل ۸-۲۴). ایمونوگلوبولین‌ها معمولاً ساختاری با دو کمپلکس قرینه دارند که به صورت H_2L_2 نمایش داده می‌شود اما در خانوادهٔ شترها (شتر، شتر بی‌کوهان آمریکایی،...) در این مورد استثنایی دیده می‌شود. این حیوانات می‌توانند ایمونوگلوبولین‌هایی تولید کنند که تنها شامل دو زنجیره سنگین (H_2) بوده و فاقد زنجیره‌های سبک می‌باشند.

1- Immunoglobulin 2- Complement



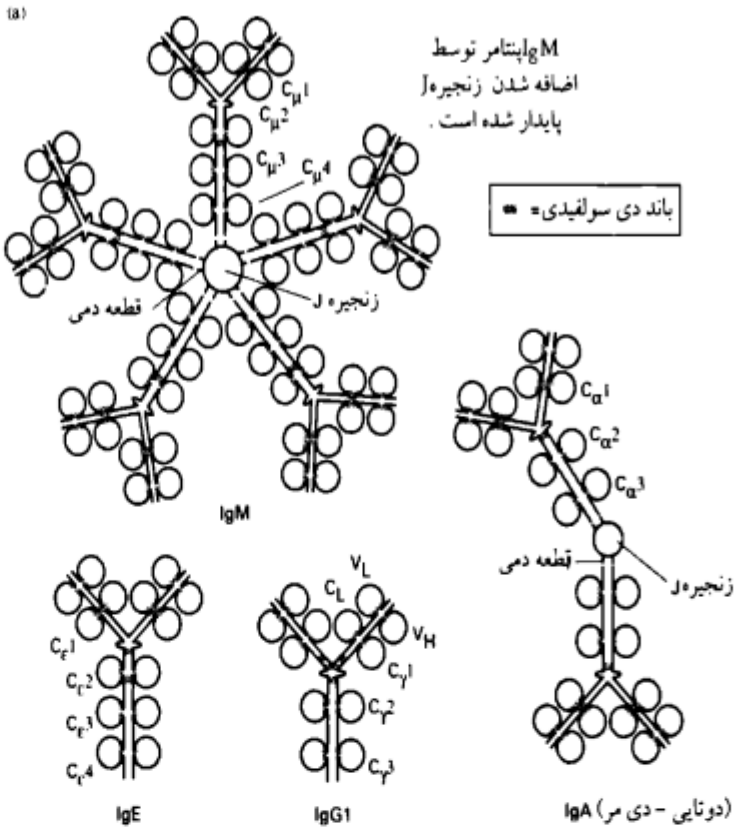
▲ **شکل ۸-۲۴ اساس ساختاری مولکول ایمونوگلوبولین.** آنتی‌بادی‌ها از جمله پروتئین‌های سرمی هستند که به عنوان ایمونوگلوبولین‌ها شناخته می‌شوند و دارای دو ساختار متقارن پیچیده می‌باشند که از مجموع دو زنجیره سبک یکسان و دو زنجیره سنگین یکسان تشکیل شده‌اند. تجزیه آنتی‌بادی‌ها با استفاده از پروتئازها منجر به تولید قطعاتی می‌شود که توانایی اتصال به آنتی‌ژن را حفظ می‌کنند. هضم توسط پروتئاز پاپائین منجر به تولید قطعات تک‌ظرفیتی F(ab) و توسط پروتئاز پپسین منجر به تولید قطعات دوظرفیتی $F(ab')_2$ می‌شود. قطعه Fc توانایی اتصال به آنتی‌ژن را ندارد اما این قطعهٔ مولکولی دست نخورده، ویژگی‌های عملکردی دیگری را بر عهده دارد.

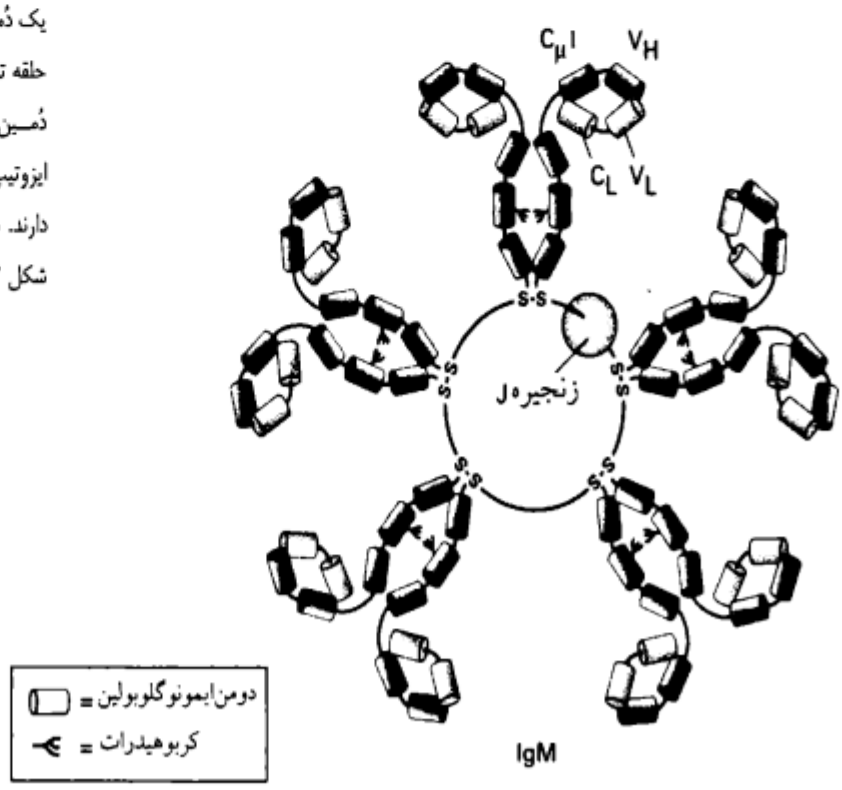
یک روش بیوشیمیایی برای پاسخگویی به این سؤال که چگونه آنتی‌بادی‌ها بین آنتی‌ژن‌های مشابه، تمایز قائل می‌شوند، مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از آنزیم‌های پروتئولیزکننده‌ای استفاده شد که پروتئین‌های نسبتاً بزرگ ایمونوگلوبولین را به قطعاتی تجزیه می‌کرد که با استفاده از آنها می‌توان منطقه‌ای از ایمونوگلوبولین را که با آنتی‌ژن اتصال می‌یابد مورد شناسایی قرار داد (شکل ۸-۲۴). نتیجهٔ هضم با پروتئاز پاپائین قطعات تک‌ظرفیتی است که F(ab) نامیده می‌شود و می‌توانند با یک مولکول آنتی‌ژن منفرد اتصال یابند. در حالیکه نتیجهٔ تجزیه با پروتئاز پپسین قطعات دوظرفیتی می‌باشد که به صورت $F(ab')_2$ نشان داده می‌شود (F = fragment ; ab = antibody). این آنزیم‌ها بصورت معمول در تبدیل مولکول‌های ایمونوگلوبولین دست نخورده به معرف‌های تک‌ظرفیتی و دوظرفیتی استفاده می‌شوند. اگرچه قطعات F(ab) در ایجاد اتصال متقاطع ناتوان هستند اما قطعات $F(ab')_2$ این توانایی را دارند و چنین خصوصیتی به طور مکرر برای اتصال متقاطع و به دنبال آن فعال شدن گیرنده‌های سطحی، به کار گرفته می‌شد. قطعه‌ای که توسط هضم پاپائین آزاد شده و توانایی اتصال به آنتی‌ژن را هم ندارد چون به آسانی قابل کریستالیزه شدن است، Fc نامیده می‌شود (F = fragment ; C = Crystallizable). چنین اقدامات بیوشیمیایی به کارگیری پروتئازها به وسیلهٔ روش نقشه‌برداری پپتیدی و استراتژی‌های تعیین توالی برای مشخص کردن ساختار اولیه ایمونوگلوبولین‌ها ادامه پیدا کرد.

چندین ایزوتایپ ایمونوگلوبولینی وجود دارد که هر کدام فعالیت‌های متفاوتی دارند.

ایمونوگلوبولین‌ها براساس خصوصیات متمایز از هم بیوشیمیایی‌شان به دسته‌های مختلف یا ایزوتیپ‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. دو ایزوتایپ زنجیره سبک بنام‌های κ و λ وجود دارد. زنجیرهٔ سنگین تنوع بیشتری را نشان می‌دهد. در پستانداران ایزوتیپ‌های اصلی زنجیره سنگین عبارتند از: μ، δ، γ، α و ε. هرکدام از زنجیره‌های سنگین می‌توانند با هر کدام از زنجیره‌های سبک κ یا λ همراه شوند. زیرگروه‌های بیشتری برای زنجیرهٔ γ و α نسبت به گونه مهره‌دار وجود دارد و ماهی دارای ایزوتایپی است که در پستانداران یافت نمی‌شود. نامگذاری یک ایمونوگلوبولین کامل براساس زنجیرهٔ سنگین موجود در ساختمانش می‌باشد: زنجیره μ، IgM؛ زنجیره α، IgA؛ زنجیرهٔ γ، IgG؛ زنجیره δ، IgD؛ زنجیره ε، IgE را تولید می‌کند. ساختار کلی ایزوتایپ‌های اصلی ایمونوگلوبولین در شکل ۹-۲۴ نشان داده شده است. هرکدام از ایزوتایپ‌های مختلف ایمونوگلوبولینی به وسیلهٔ ویژگی‌های ساختاری منحصر به فردشان عملکردهای ویژه‌ای را انجام می‌دهند.

مولکول IgM توسط باندهای دی‌سولفیدی و یک زنجیرهٔ اضافی بنام J ساخته شده و به صورت پنتامر ترشح می‌شود. IgM در فرم پنتامری خود، ده جایگاه مشابه اتصالی به آنتی‌ژن دارد که اجازه می‌دهد در واکنش متقابل با سطوحی که آنتی‌ژن مورد نظر را به





◀ شکل ۹-۲۴ ایزوتیپ‌های ایمونوگلوبولین. دسته‌های مختلف ایمونوگلوبولین، ایزوتیپ نامیده می‌شوند که ممکن است به صورت بیوشیمیایی و توسط تکنیک‌های ایمونولوژیکی تشخیص داده شوند. در موش و انسان دو ایزوتایپ برای زنجیرهٔ سبک (λ و κ) و پنج ایزوتایپ برای زنجیره سنگین (α، ε، γ، δ، μ) وجود دارد. (a) براساس نوع زنجیرهٔ سنگین، هر ایزوتایپ یک دسته از ایمونوگلوبولین را تعیین می‌کند. IgG، IgE و IgD (در شکل نشان داده نشده) رویهم رفته مونومرهایی با ساختار کلی مشابه هستند. IgM و IgA به دلیل آنکه می‌توانند در سرم به ترتیب به صورت پنتامر و دیمر یافت شوند از دیگر دسته‌ها متفاوتند، بدین ترتیب که با یک زیرواحد اضافی بنام زنجیرهٔ J، توسط پیوند کووالان دی‌سولفیدی همراه می‌شوند. (b) تصویر پنتامر IgM که به صورت حجمی ترسیم شده است و هر استوانه نشان‌دهندهٔ یک دُمین ایمونوگلوبولینی جداگانه است. هر حلقه ترسیم شده در شکل (a) نیز یک دُمین ایمونوگلوبولینی را نشان می‌دهد. ایزوتیپ‌های مختلف، عملکردهای مختلفی دارند. برای فهمیدن علایم اختصاری به شکل ۱۲-۲۴ مراجعه کنید.

نمایش می‌گذارند، اویدیته[1] بالایی از خود نشان می‌دهد. به محض اینکه IgM بر روی سطح حامل آنتی‌ژن رسوب می‌کند مولکول پنتامری IgM ساختاری را به وجود می‌آورد که توانایی بسیار بالایی در فعال نمودن آبشار کمپلمان دارد و درنتیجه یک وسیلهٔ مؤثر برای تخریب غشایی ایجاد می‌کند که روی آن جذب شده است و پروتئین‌های کمپلمان هم متعاقباً بعد از IgM روی سطح مورد نظر رسوب می‌کنند.

مولکول IgA نیز با زنجیرهٔ J واکنش داده و به فرم دیمر درمی‌آید. IgA دیمر می‌تواند به گیرنده پلی‌مریک IgA در سمت جانبی قاعده سلول‌های اپی‌تلیال متصل شود جائی که وظیفه‌اش انجام آندوسیتوز با واسطه گیرنده می‌باشد. گیرنده IgA بعد از آندوسیتوز، توسط پروتئولیز قطعه قطعه می‌شود و IgAای دیمر با قسمت باقی مانده گیرنده (قسمت ترشحی) که هنوز به آن متصل است از سمت فوقانی سلول‌های اپی‌تلیال آزاد می‌شود. این فرآیند که **ترانسیتوزیس**[2] نامیده می‌شود یک شیوهٔ مؤثر برای جا به جائی ایمونوگلوبولین‌ها از سمت جانبی قاعده سلول‌های اپی‌تلیوم به سمت فوقانی می‌باشد (شکل ۱۰a-۲۴). اشک و دیگر ترشحات بدن نیز غنی از IgA هستند که عمل حفاظت بدن در مقابل پاتوژن‌های محیطی را بر عهده دارند.

ایزوتیپ IgG مهم‌ترین ایزوتیپ برای خنثی‌سازی ذرات ویروسی محسوب می‌شود. این ایزوتیپ همچنین به سلول‌هایی که مجهز به گیرنده‌های خاص برای بخش Fc از مولکول‌های IgG هستند، کمک می‌کند تا آنتی‌ژن‌های ویژه‌ای را کسب کنند.

سیستم ایمنی نوزاد نابالغ می‌باشد و بنابراین در جوندگان آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده از طریق شیر مادر به جنین انتقال می‌یابند. گیرنده Fc نوزادی که مسئول به دام انداختن IgG مادری است در جوندگان بر روی اپی‌تلیال سلول‌های روده قرار دارد و توسط ترانسیتوزیس ایمونوگلوبولین‌هایی که در سمت لومینال دستگاه روده‌ای نوزاد به دام افتاده‌اند در عرض اپی تلیوم روده جا به جا شده و بدین ترتیب آنتی‌بادی‌های مادری موجود در شیر برای ایجاد ایمنی غیرفعال در نوزاد مهیا می‌شود (شکل ۱۰b-۲۴). در انسان‌ها گیرنده‌های Fc بر روی سلول‌های جنینی یافت می‌شود که در تماس با جریان خون مادر هستند. ترانسیتوزیس آنتی‌بادی‌های IgG موجود در خون مادر از طریق جفت، آنتی‌بادی‌های مادری را به جنین منتقل می‌سازد و این آنتی‌بادی‌ها نوزاد را تا زمانی محافظت خواهند کرد که سیستم ایمنی نوزاد به اندازهٔ کافی بالغ شده و بتواند خودش آنتی‌بادی تولید کند.

هر سلول B تولیدکننده یک ایمونوگلوبولین منحصر به فرد است که به صورت کلونی انتشار می‌یابد

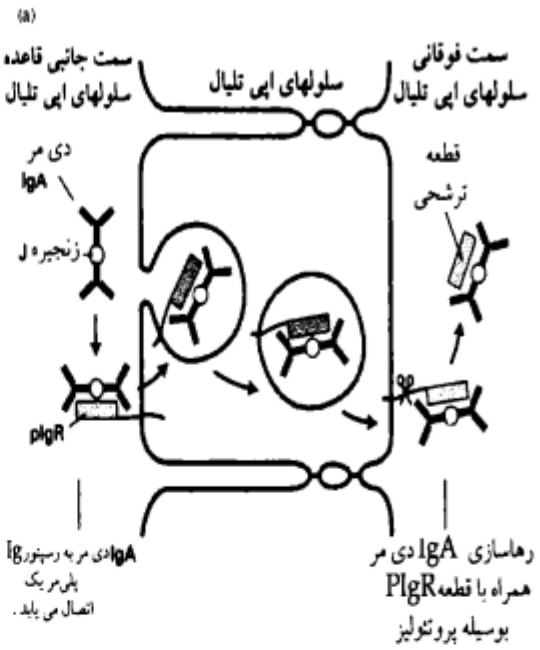
مطابق نظریه انتخاب کلونی، هر لنفوسیت دارای یک گیرنده اتصال به آنتی‌ژن با ویژگی منحصر به فرد می‌باشد. زمانی که یک لنفوسیت با آنتی‌ژن اختصاصی خود مواجه می‌شود به صورت کلونی گسترش یافته (یا تکثیر می‌یابد) و این امر منجر به تقویت پاسخ و اوج‌گیری پاکسازی هر چه بیشتر آنتی‌ژن می‌شود (شکل ۱۱-۲۴).

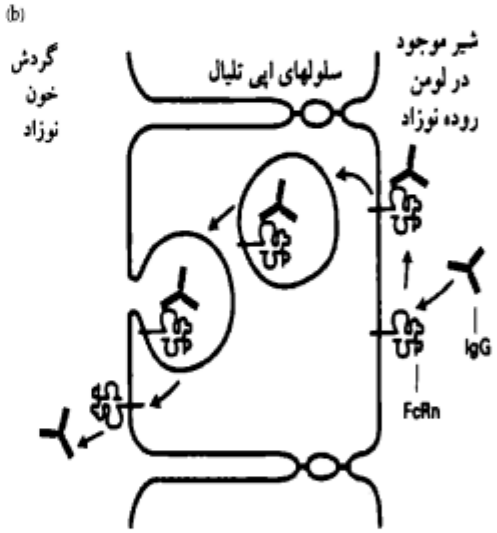
مطالعه تومورهای سلول B که به صورت کلونی‌های بدخیمی لنفوسیت‌های ویژه، گسترش می‌یابد موجب شد که اولین آنالیزهای مولکولی فرآیندهای اصلی ایجاد تنوع در آنتی‌بادی‌ها امکان‌پذیر شود. مشاهده کلیدی این بود که تومورهای مشتق شده از لنفوسیت‌ها توانایی تولید مقدار زیادی ایمونوگلوبولین به سرم ترشحی را دارند. مقداری از زنجیره‌های سبک این ایمونوگلوبولین‌ها به داخل ادرار افراد مبتلا به تومور ترشح می‌شود. چنین زنجیره‌های سبک که بعد از کشف، پروتئین‌های بنس جونز[3] نامیده شدند به آسانی تصفیه شده و اولین هدف برای یک آنالیز شیمیایی پروتئینی را فراهم ساختند.

دو یافته کلیدی حاصل از آنالیزهای شیمیایی پروتئینی عبارتند از: (۱) دو تومور که زنجیره‌های سبک با خصوصیات شیمیایی متفاوت تولید می‌کنند در تمامی توالیها منحصر به فرد هستند؛ (۲) این اختلاف در توالیهای اسیدهای آمینه که منجر به تمایز یک زنجیره سبک از دیگری می‌شود به صورت تصادفی انتشار نیافته بلکه به صورت دسته جمعی در دُمینی اتفاق می‌افتد که به عنوان ناحیه متغیر زنجیره سبک یا V_L شناخته می‌شود. این دُمین شامل ۱۱۰ یا در همین حدودها، اسید آمینه N- انتهایی است. توالیهای باقی مانده برای زنجیره‌های سبک مختلف (که از ایزوتیپ‌های یکسانی κ یا λ مشتق شده‌اند) یکسان است و در نتیجه به عنوان نواحی ثابت یا C_L شناخته می‌شوند. متعاقباً از سرم افراد مبتلا به تومور، ایمونوگلوبولین‌های مربوط به بیمار استخراج شد و توالی زنجیره‌های سنگین تعیین شد و با توجه به آن مشخص شد که ریشه‌های متغیری که موجب تشخیص یک زنجیره سنگین از دیگری می‌شود همانند زنجیرهٔ سبک در یک دُمین کاملاً مشخص متمرکز شده که به طور مشابه به عنوان ناحیه متغیر زنجیره سنگین یا V_H شناخته می‌شود.

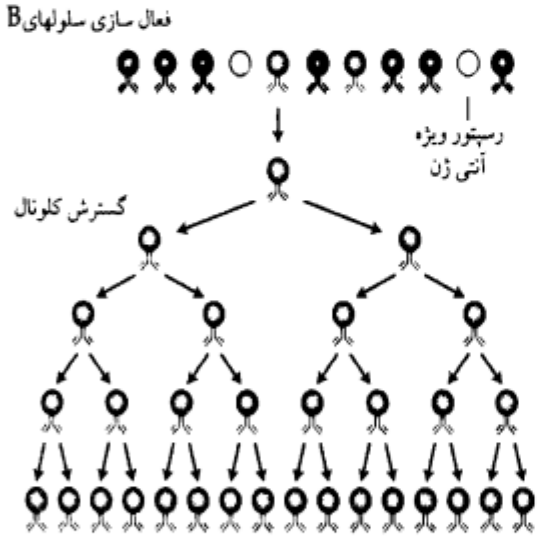
نظم موجود در توالیهای به دست آمده از چند گروه مختلف زنجیره‌های سبک همسان وجود یک الگوی غیرتصادفی را برای

1- Avidity
2- Transcytosis
3- Bence - Jones





▶ **شکل ۱۰-۲۴ ترانسیتوزیس IgA و IgG.** (a) IgA که در ترشحات مخاطی مختلف یافت می‌شود به انتقال در عرض اپی‌تلیوم نیاز دارد. بدین منظور IgA به گیرنده‌های پلی مورفیک IgA [pIgR] اتصال یافته و اندوسیتوز می‌شود. بعد از انجام عمل انتقال در عرض لایه اپی‌تلیال، گیرنده قطعه قطعه شده و IgA از سمت رأس سلول همراه با بخشی از گیرنده به نام قطعه ترشحی آزاد می‌شود. (b) جوندگان شیرخوار ایمونوگلوبولین‌های مورد نیازشان را از شیر مادر به دست می‌آورند. نوزاد در سمت رأسی اپی‌تلیوم روده‌اش دارای گیرنده Fc نوزادی (FcRn) است که این گیرنده ساختاری مشابه مولکول‌های MHC کلاس یک دارد (شکل ۲۱-۲۴). بعد از اتصال گیرنده به قسمت Fc، ایمونوگلوبولین G توسط ترانسیتوزیس IgG به دام افتاده و به سمت جانبی قاعده سلول‌های اپی‌تلیوم اتصال می‌یابد. در انسان‌ها سلول‌های سن‌سی‌تیال[1] تروفوبلاست موجود در جفت، FcRn را بیان می‌کنند که واسطه‌ای برای کسب IgG از جریان خون مادر و انتقال آن به جنین است (انتقال از طریق جفت).



▲ **شکل ۱۱-۲۴ (شکل رنگی) انتخاب کلونی.** طبق نظریه انتخاب کلونی، گروه بزرگی از لنفوسیت‌ها وجود دارد که هرکدام مجهز به گیرنده آنتی‌ژن منحصر به فردی می‌باشد (با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است). آنتی‌ژنی که مکمل گیرندهٔ واقع بر روی یک لنفوسیت خاص باشد، به آن لنفوسیت اجازه می‌دهد تا به صورت کلونی گسترش یابد و در نتیجه از تعداد ناچیزی سلول که مخصوص یک آنتی‌ژن هستند تعداد زیادی سلول با ویژگی آنتی‌ژنی مورد نظر (و میزان زیادی محصولات ترشحی) تولید شود.

1- Syncytial

نواحی تغییرپذیر نشان داد و روشن شد که سه ناحیه بسیار متغیر (HV3، HV2 و HV1) وجود دارد که در بین نواحی دیگر به نام نواحی چهارچوب قرار گرفته‌اند (شکل ۱۲a-۲۴) (نظمی مشابه در توالیهای زنجیره سنگین نیز مشاهده شد که آنها را هم به صورت نواحی بسیار متغیر مشخص نمودند). در ساختار سه بعدی صحیح ایمونوگلوبولین‌ها، این نواحی بسیار متغیر در مجاورت هم (مثل ۱۲b-۲۴) و در ناحیه تماس با آنتی‌ژن قرار می‌گیرند. بنابراین جایگاه اتصال به آنتی‌ژن در یک مولکول Ig توسط بخشی که شامل نواحی بسیار متغیر است ساخته می‌شود. به همین دلیل، نواحی بسیار متغیر به عنوان نواحی شاخص مکمل (CDRs) نیز شناخته می‌شوند. شکل کد کردن همه اطلاعات لازم برای تولید گنجینه آنتی‌بادی با چنین تنوع زیادی در سلول‌های لایه زایا، منجر به پیشنهاد مکانیسم‌های ژنتیکی منحصر به فردی شده که پاسخگوی چنین تنوعی بودند.

دُمین‌های ایمونوگلوبولینی تاخوردگی ویژه‌ای دارند که از دو صفحهٔ بتا که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی به هم متصل می‌شوند، تشکیل شده است.

هر دو دُمین‌های ثابت و متغیر ایمونوگلوبولین‌ها به صورت ساختار سه بعدی فشرده تا می‌خورند و فقط از صفحات β تشکیل شده‌اند (شکل ۱۲b-۲۴). یک دُمین ایمونوگلوبولینی بطور معمول شامل دو صفحهٔ بتا می‌باشد (یکی از صفحات ۳ رشته و دیگری ۴ رشته دارد) که توسط باندهای دی‌سولفیدی به هم متصل می‌شوند. ریشه‌های اسیدهای آمینه‌ایی که به طرف داخل برمی‌گردند اکثراً آب‌گریز هستند و به پایداری ساختمان ساندویچ مانند دُمین‌ها کمک می‌کنند. اما ریشه‌هایی که در معرض مواد محلول قرار می‌گیرند، دارای بار و قطبیت بیشتری هستند. ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی بین اسید آمینه سیستئین و وجود مقدار کمی از ریشه‌های اسید آمینه‌ای قویاً حفاظت شده که از لحاظ تکاملی قدمت ساختاری موتیف را نیز توصیف می‌کند، رویهم رفته ساختاری را بوجود می‌آورد که بنام **ابرخانواده ایمونوگلوبولینی** نامیده می‌شود. چنین ابرخانواده ایمونوگلوبولینی در بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی نیز دیده شده است که بطور مستقیم در شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن درگیر نبوده‌اند بطور مثال ابرخانواده ایمونوگلوبولینی مولکول‌های چسبندگی سلولی یا IgCAMs (فصل ۱۹).

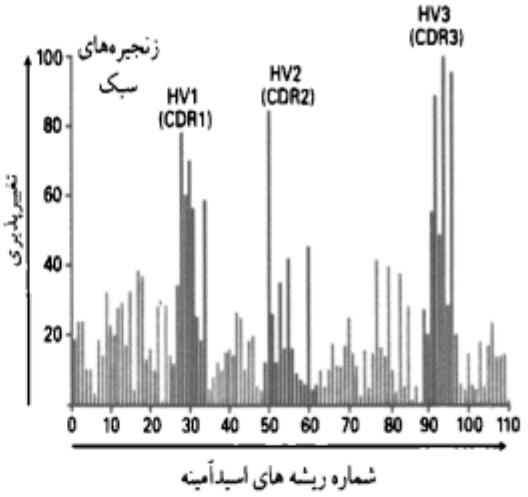
ساختار سه بعدی مولکول‌های آنتی‌بادی، اختصاصیت بسیار زیادشان را توجیه می‌کند

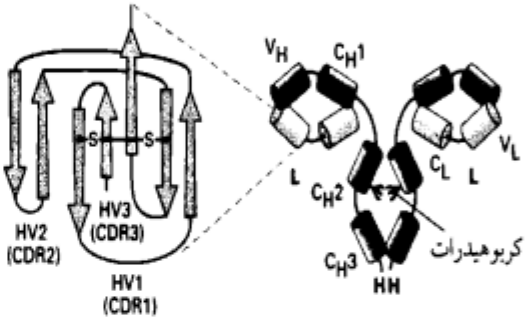
ساختار سه بعدی ایمونوگلوبولین‌ها، به طور کامل مشخص شده است و جزئیات چگونگی اتصال آنتی‌بادی با آنتی‌ژن نیز توسط تفکیک اتمی [1] شناخته شده است. منطقهٔ تماسی بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن پروتئینی، در حدود $20\times30\,A^{\circ}$ می‌باشد و اکثراً واکنش‌هایی را شامل می‌شود که به هم‌پوشانی کاملی نیاز دارند. پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی سهم مهمی را در اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بر عهده دارند (برای مطالعه بیشتر نقش هم‌پوشانی مولکولی در عملکرد و اتصال پروتئین‌ها به یکدیگر به بخش ۲، مراجعه کنید). آنتی‌بادی‌ها نه تنها در مقابل پروتئین‌ها، بلکه همچنین در مقابل تغییرات اعمال شده روی پروتئین‌ها هم (برای مثال زنجیره‌های الیگوساکاریدی یا گروه‌های فسفات) و حتی بر علیه مولکول‌های آلی کوچکی که در حالت طبیعی بر علیه آنها آنتی‌بادی تولید نمی‌شود نیز تولید می‌گردند. بنا به دلایل شرح داده شده در قسمت ۴-۲۴، برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های غیرپروتئینی کوچک لازم است که آنتی‌ژن با حامل‌های پروتئینی ترکیب شود. اما آنتی‌بادی اختصاصی بعد از تولید می‌تواند چنین آنتی‌ژن‌های کوچکی را شناسایی کند. هرچه آنتی‌ژن کوچک‌تر باشد در محل اتصالی به آنتی‌ژن موجود در آنتی‌بادی به صورت عمقی‌تر قرار می‌گیرد. مناطق بسیار متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین بیشترین تماس را با آنتی‌ژنی که به آنتی‌بادی متصل شده است، برقرار می‌کنند و سومین منطقه بسیار متغیر بطور اختصاصی سهم مهمی را در این میان به عهده دارد.

منطقه‌ای از آنتی‌ژن‌را که در تماس نزدیک با آنتی‌بادی قرار می‌گیرد، **اپی‌توپ** گویند. یک آنتی‌ژن پروتئینی معمولاً اپی‌توپ‌های متعددی دارد که اغلب به صورت حلقه یا سطوحی روی پروتئین‌ها در معرض نمایش گذارده می‌شوند و هر ترکیب آنتی‌بادی هومولوگ که از یک جمعیت کلونی سلول‌های B تولید می‌شود می‌تواند یک مولکول منحصر به فرد به نام **اپی‌توپ** را روی آنتی‌ژن مجاورش شناسایی کند.

به منظور اینکه ساختمان یک آنتی‌بادی متصل شده به اپی‌توپ مجاورش بر روی آنتی‌ژن را مورد بررسی قرار دهیم باید منبعی از ایمونوگلوبولین‌های متشابه [2] و آنتی‌ژن‌های خالص داشته باشیم. ایمونوگلوبولین‌های متشابه را می‌توان از تومورهای سلول‌های B (گسترش مونوکلونال سلول‌های B بدخیمی ترشح‌کنندهٔ ایمونوگلوبولین‌ها) کسب کرد. اما در این صورت هنوز هم آنتی‌ژنی که برای آنتی‌بادی ترشح شده اختصاصی باشد، شناخته شده نیست.

1- Atomic resolution 2- Homogeneous





◀ شکل ۱۲-۲۴ (شکل رنگی) مناطق بسیار متغیر و ابرخانوادهٔ ایمونوگلوبولینی.[1] (a) اختلاف در تغییرپذیری اسید آمینه در همه موقعیت ریشه‌های اسید آمینه در زنجیره سبک ایمونوگلوبولین‌های مختلف. درصد توالی منطقه متغیر برای اسیدهای آمینه مختلف، در هر موقعیت موجود در توالی نشان داده شده است. موقعیت‌هایی که زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه [ریشه‌های اسید آمینه] بسیار متغیر، ارائه شده در این مجموعهٔ اطلاعاتی شاخص تغییرپذیری بالایی را به خود اختصاص داده است. اسیدهای آمینه‌ای که بین توالی‌های مقایسه شده قرار گرفته و متغیر نیستند عدد صفر در نظر گرفته شده است. چنین هیستوگرافی سه منطقه‌ای را که تغییرپذیری افزایش یافته‌ای دارند، آشکار می‌سازد. مناطق با تغییرپذیری بالای ۱، ۲ و ۳ که به آنها مناطق شاخص مکمل یا CDR اطلاق می‌شود. (b) تصویر حجمی قطعه $F(ab')_2$ (راست) و دیاگرام نواری یک دُمین متغیر زنجیره سبک ایمونوگلوبولین همراه با مناطق بسیار متغیر که با رنگ قرمز نشان داده شده است (چپ). مناطق بسیار متغیر در حلقه‌هایی دیده می‌شود که رشته‌های β را به هم اتصال می‌دهند و چنین حلقه‌هایی مسئول اتصال به آنتی‌ژن می‌باشند. رشته‌های β علاوه بر اینکه دو صفحه بتا را ایجاد می‌کنند، مناطق داربستی ایمونوگلوبولین‌ها را نیز تشکیل می‌دهند. توجه کنید که هر دُمین ثابت و متغیر دارای یک ساختار سه بعدی اختصاصی است که ابرخانواده ایمونوگلوبولینی نامیده می‌شود. L = زنجیره سبک؛ H = زنجیره سنگین؛ V_H = دومن متغیر زنجیره سنگین؛ V_L = دومن متغیر زنجیره سبک؛ C_{H1}، CH_2، CH_3 = دُمین‌های ثابت زنجیرهٔ سنگین؛ C_L = دومن ثابت زنجیرهٔ سبک.

پیشرفت اصلی برای تولید آنتی‌بادی‌های متشابه که ترکیبی مناسب برای آنالیزهای ساختمانی باشند، تکامل تکنیک هایی بود که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را توسط هیبریدوما[2] تولید می‌کردند و به یک محیط انتخابی ویژه نیاز داشتند (فصل ۹ را ملاحظه کنید).

مناطق ثابت ایمونوگلوبولین‌ها ویژگی‌های عملکردی آنها را تعیین می‌کند

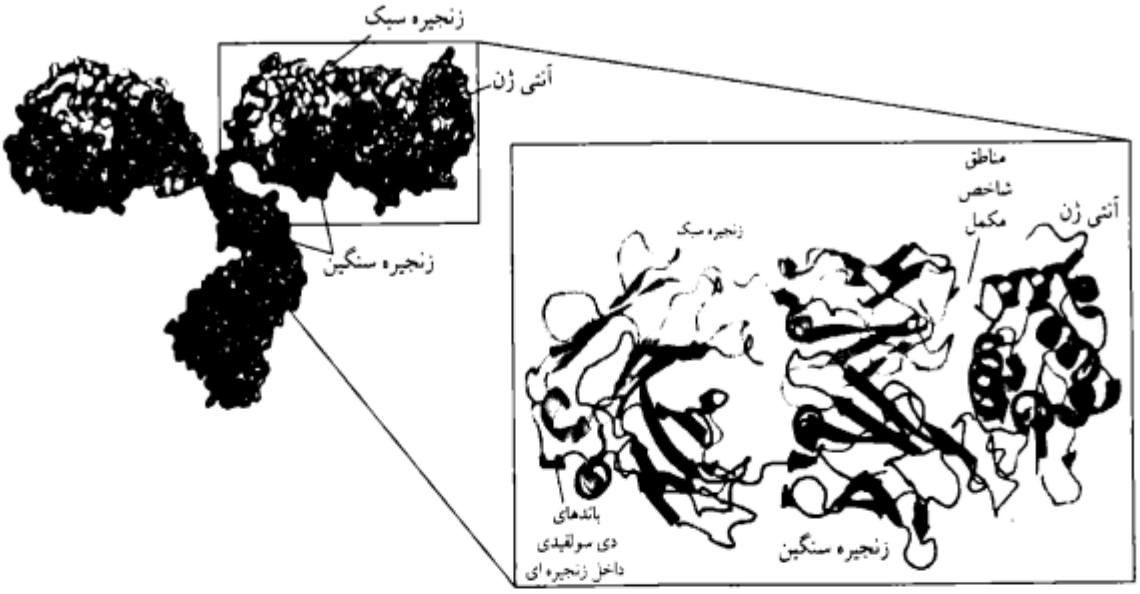
آنتی‌بادی‌ها از طریق مناطق متغیرشان، آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند اما مناطق ثابت آنها، بطور عمده ویژگی‌های عملکردی آنتی‌بادی را تعیین می‌کند. یکی از ویژگی‌های مهم آنتی‌بادی عمل خنثی‌سازی است. آنتی‌بادی‌ها به اپی‌توپ‌های سطحی سلول‌های باکتری یا ذرات ویروسی اتصال می‌یابند و از عمل متقابل بین پاتوژن و گیرنده مربوطه روی سلول میزبان جلوگیری می‌کنند و بدین ترتیب عفونت را از بین می‌برند.

آنتی‌بادی‌های اتصال یافته به سطوح میکروبی یا ویروسی می‌توانند بطور مستقیم توسط سلول‌های بیان‌کننده گیرنده اختصاصی Fc ایمونوگلوبولین‌ها شناسایی شوند. گیرنده‌های Fc که برای کلاس‌ها و زیرکلاس‌های ایمونوگلوبولین‌ها اختصاصی هستند، تنوع ساختاری و عملکردی زیادی از خود نشان می‌دهند. سلول‌های فاگوسیت کننده اختصاصی مانند سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها می‌توانند توسط گیرنده‌های Fc خودشان با ذراتی که با آنتی‌بادی پوشیده شده‌اند، درگیر شده و آنها را بلعیده و تخریب کنند. به چنین فرآیندی **اپسونیزاسیون**[3] می‌گویند. رویدادهای وابسته به گیرنده Fc ها به بعضی سلول‌های سیستم ایمنی (به عنوان مثال، مونوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی) اجازه می‌دهد تا به طور مستقیم سلول هدفی را که آنتی‌ژن ویروسی با دیگر آنتی‌ژن‌های آن توسط آنتی‌بادی پوشیده شده، شناسایی کند. این رویداد ممکن است سلول‌های ایمنی را القاء کند تا مولکول‌های کوچک سمی مانند رادیکال‌های اکسیژن یا محتوی گرانولی سمی مثل پرفورین‌ها و گرانزیم‌ها را رها کنند. این پروتئین‌ها به سطح سلول‌های هدف مورد نظر اتصال یافته و به غشای سلول آسیب وارد

1- Immunoglobulin Fold

2- Hybridoma

3- Opsonization



▲ **شکل ۱۳-۲۴ ساختار ایمونوگلوبولین.** این مدل ساختار سه بعدی ایمونوگلوبولین کمپلکس شده با لیزوزیم سفیده تخم مرغ (آنتی‌ژن پروتئینی) را با کریستالوگرافی اشعه X نشان می‌دهد.

کرده و بدین ترتیب سلول را می‌کشد (شکل ۵-۲۴). چنین فرآیندی را **سیتوتوکسیسیتهٔ سلولی وابسته به آنتی‌بادی** (ADCC) گویند که توضیح می‌دهد چگونه سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی با محصولات پاسخ‌های ایمنی آداپتیو [Ab] واکنش می‌دهند و یا از آنها بهره می‌برند. بسته به ایزوتیپ ایمونوگلوبولین، کمپلکس‌های آنتی‌ژن - آنتی‌بادی می‌توانند مسیر کلاسیک کمپلمان را فعال کنند (شکل ۴-۲۴). IgM و IgG_3 می‌توانند کمپلمان را به نحو احسن، فعال کنند و همه زیرکلاس‌های IgG می‌توانند کمپلمان را فعال کنند، در حالی که IgA و IgE قادر به انجام چنین کاری نیستند.

نکات کلیدی بخش ۲-۲۴

ایمنوگلوبولین‌ها: ساختار و عملکرد

■ اکثر ایمنوگلوبولین‌ها (آنتی‌بادیها) از دو زنجیره سنگین (H) یکسان و دو زنجیره سبک (L) تشکیل شده‌اند که هر زنجیره حاوی یک بخش متغیر (V) و بخش ثابت (C) می‌باشد. شکافت پروتئولیتیکی آنتی بادی باعث تولید قطعات مونووالان F(ab) و بی والان F(ab')2 می‌شود که حاوی دُمین‌های ناحیه متغیر بوده و توانایی اتصال به آنتی ژن را خواهند داشت (شکل ۸-۲۴ را ملاحظه کنید). بخش Fc حاوی دُمین‌های ناحیه ثابت بوده و اعمال اثرگری را تعیین می‌کنند.

■ ایمونوگلوبین‌ها بر اساس نواحی ثابت زنجیره‌های سنگین به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۹-۲۴ را ملاحظه کنید) در پستانداران پنج نوع مختلف وجود دارد: IgM، IgD، IgG، IgA و IgE ؛ که به ترتیب زنجیره‌های سنگین آنها μ، δ، γ، α و ε می‌باشد. دو نوع عمده از زنجیره‌های سبک k و λ وجود دارند که بر اساس نواحی ثابت آنها تعیین ویژگی شده‌اند.

■ هر لنفوسیت B یک ایمونوگلوبین با توالی بی‌همتا را کد می‌کنند و بنابراین برای یک آنتی ژن ویژه اختصاصی است. به هنگام شناسایی آنتی ژن، فقط یک لنفوسیت B که گیرنده ویژه برای آن دارد فعال خواهد شد و کلونی تشکیل خواهد داد (انتخاب کلون) (شکل ۱۱-۲۴ را ملاحظه کنید)

■ هر آنتی ژن ویژه آنتی بادی توسط دُمین‌های متغیری که حاوی مناطق متغیر بالا با نام فوق متغیر یا مناطق تعیین کننده مکمل است شناسایی می‌شود (شکل ۱۲a-۲۴ را ملاحظه کنید). این مناطق فوق متغیر در بالای دُمین متغیر قرار گرفته‌اند جایی که آنها می‌توانند برهمکنش‌های ویژه‌ای با آنتی‌ژن برای یک آنتی بادی ویژه آن داشته باشند.

■ دُمین‌های تکراری که مولکولهای ایمونوگلوبین را تشکیل می‌دهند ساختارهای سه بعدی یا پیچشهای ایمونوگلوبینی نامیده می‌شوند، آنها حاوی دو صفحه β هستند که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی بهم متصل شده‌اند (شکل ۱۲b-۲۴ را ملاحظه کنید). پیچش ایمونوگلوبینی در طول تکامل گسترده بوده و در بسیاری از پروتئین‌ها به غیر از آنتی‌بادیها و

بخصوص بوده و در بسیاری از پروتئین‌ها به غیر از آنتی‌بادیها و بخصوص در مولکولهای چسبانندهٔ سلولی وجود دارند.

■ مناطق ثابت آنتی بادیها دارای ویژگی‌هایی مانند اعمال اثرگری مثل توانایی اتصال به کمپلمان، توانایی عبور از عرض اپیتلیال یا توانایی برهمکنش با گیرنده‌های ویژه برای بخش Fc ایمونوگلوبین هستند.

۲۴-۳ ایجاد تنوع آنتی‌بادی و تکامل سلول‌های B

پاتوژن‌ها زمان تولیدمثل کوتاه، آرایش ژنتیکی کاملاً متنوع و مسیر تکاملی سریع دارند و بدین ترتیب حتی می‌توانند تنوع ژنتیکی بیشتری ایجاد کنند. بنابراین سیستم دفاعی کارا باید قادر به پاسخ‌گویی یکسانی در برابر چنین تنوعی باشد و آنتی‌بادی‌ها این وظیفه را بر عهده دارند. سلول‌های B که مسئول تولید آنتی‌بادی هستند با به کارگیری مکانیسم‌های منحصر به فرد که اطلاعات ژنتیکی مورد نیاز برای بیشتر زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین که به صورت توالی‌های جدا از هم یا قطعات ژنی ایمونوگلوبولین هستند، به همدیگر متصل می‌کنند تا واحد رونویسی عملکردی را ایجاد کنند. عمل نوترکیبی که قطعات ژنی ایمونوگلوبولینی را کنار هم قرار می‌دهد، موجب گسترش تنوع در توالی‌هایی می‌شود که دقیقاً در محل اتصال قطعات ژنی قرار دارند. مکانیسم تنوع آنتی‌بادی اساساً از نوترکیبی میوزی که تنها در لایه زایا اتفاق می‌افتد و یا از پردازش متناوب اگزون‌ها، متفاوت است (فصل ۸) و چون این مکانیسم‌های نوترکیبی در سلول‌های سوماتیک اتفاق می‌افتد به نام **بازآرایی ژنی سوماتیک**[1] یا **نوترکیبی سوماتیک**[2] خوانده می‌شود.

ژن زنجیرهٔ سبک عملکردی به همایش، قطعات ژنی V و J نیازمند است.

ژن‌های ایمونوگلوبولین که موجب تولید ایمونوگلوبولین‌های بی‌عیب و نقصی می‌شوند از قبل در ژنوم کنار همدیگر قرار نداشتند و برای بیان [رونویسی و ترجمه] آماده نبودند. در حقیقت، قطعات ژنی لازم در مسیر تکاملی سلول‌های B گردهمآیی می‌شوند (شکل ۲۴-۱۴). اگرچه بازآرایی ژنی زنجیرهٔ سنگین قبل از زنجیره سبک صورت می‌گیرد، ولی ما در ابتدا بازآرایی ژنی زنجیرهٔ سبک را به علت داشتن پیچیدگی کمتر، مورد بحث قرار می‌دهیم.

زنجیرهٔ سبک ایمونوگلوبولینی توسط گروهی از قطعات ژنی V و یک قطعهٔ ژنی منفرد که در فاصله نه چندان دور در فرودست ژن V قرار گرفته، کد می‌شود. هرکدام از قطعات ژنی V توالی پروموتر خاص خود را دارند و قسمت عمدهٔ ناحیه متغیر زنجیرهٔ سبک را کد می‌کنند، اگرچه قطعه کوچکی از توالی نوکلئوتیدی که ناحیهٔ متغیر زنجیرهٔ سبک را کد می‌کند از قطعات ژنی V متعدد جدا می‌شود. به دنبال آن، قطعهٔ جداشدهٔ مورد نظر به یکی از قطعات J متعدد که بین قطعات V و قطعهٔ منفرد C در لوکوس بازآرایی نشده زنجیره κ وجود دارد، مجهز می‌شود (شکل ۲۴-۱۴a). در مسیر تکاملی سلول‌های B، یک قطعهٔ ژنی V خاص در طی یک فرآیند تصادفی متعهد می‌شود که در کنار یکی از قطعات ژنی J که باز هم انتخابی تصادفی می‌باشد، قرار بگیرد و موجب تشکیل یک اگزون کدکنندهٔ ناحیهٔ متغیر زنجیرهٔ سبک شود (V_L). نوترکیبی نه تنها موجب تولید ژن زنجیرهٔ سبک عملکردی و دست نخورده می‌شود، بلکه همچنین موجب جایگیری توالی پروموتر ژن بازآرایی شده در فاصلهٔ کنترل‌کنندگی عوامل افزاینده می‌شود که برای عمل رونویسی لازم است. قطعه ژن زنجیره سبک بازآرایی شده، رونویسی می‌شود.

توالی‌های علامت‌دهنده نوترکیبی: بررسی جزئیات توالی لوکوس زنجیرهٔ سنگین و سبک نشان داد که در سمت ′۳ هر قطعهٔ ژنی V توالی حفاظت شده‌ای وجود دارد. این عوامل حفاظت شده را توالی‌های علامت‌دهنده نوترکیبی[3] (RSS) می‌نامند، که از توالی‌های نانومر و هپتامر تشکیل شده که توسط فاصله‌گذار ۲۳bp از یکدیگر جدا شده‌اند. در سمت ′۵ هر قطعه ژنی J نیز یک RSS مشابه حفاظت شده وجود دارد که دارای یک فاصله‌گذار ۱۲bp می‌باشد شکل (۲۴-۱۵a). فاصله‌گذارهای ۱۲bp و ۲۳bp که به ترتیب، تقریباً مطابق با یک و یا دو پیچ از هلیکس DNA می‌باشند، توالی‌های هپتامر و نانومر را از یکدیگر جدا می‌کنند. نوترکیبی سوماتیک توسط آنزیم رکامبیناز RAG1[4] و RAG2[5] که تنها در لنفوسیت‌ها بیان می‌شوند، صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که، در کنار هم قرارگیری به منظور اتصال به یکدیگر، توسط کمپلکس RAG1/RAG2 مستحکم می‌شود (شکل ۲۴-۱۵b). سپس رکامبینازها، برشی را در یکی از رشته‌ها، دقیقاً در مرز بین توالی

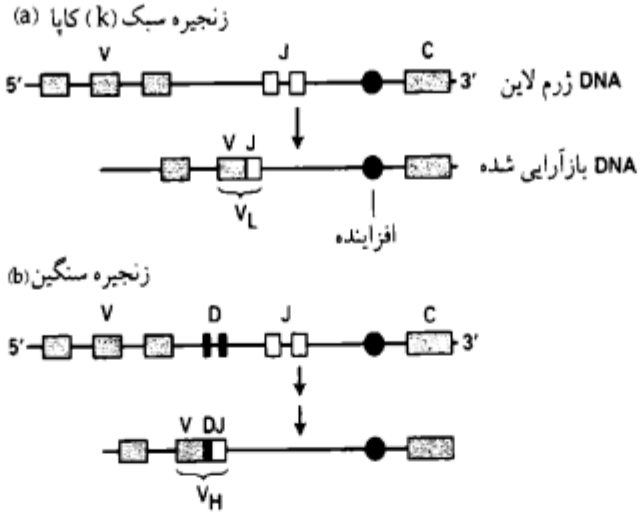
1- Somatic gene rearrangement

2- Somatic gene rearrangement

3- Recombination Signal Sequence

4- Recombination - activating gene 1

5- Recombination - activaty gene 2



▲ **شکل ۱۴-۲۴ نمای کلی بازآرایی ژنی سوماتیک DNA ایمونوگلوبولین‌ها.** سلول‌های بنیادی (Stem cells) که منجر به تولید سلول‌های B می‌شوند دارای قطعات ژنی متعددی می‌باشند که نواحی مختلف زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین‌ها را کد می‌کنند. طی تکامل سلول‌های B، نوترکیبی سوماتیک قطعات ژنی منجر به تولید ژن زنجیرهٔ سبک (a) و ژن زنجیره سنگین (b) می‌شود. هر قطعه ژنی V، پروموتور خاص خودش را حمل می‌کند و نوترکیبی موجب می‌شود عوامل افزاینده به اندازه کافی به توالی VJ نوترکیبی، نزدیک شده و بنابراین رونویسی فعال شود. ناحیه متغیر زنجیره سبک (V_L) توسط دو قطعه ژنی به هم متصل شده، کد می‌شود و قطعهٔ متغیر زنجیرهٔ سنگین (V_H) توسط سه قطعه ژنی به هم متصل شده، کد می‌شود. توجه کنید که مناطق کروموزومی کدکنندهٔ ایمونوگلوبولین‌ها، دارای قطعات V، D و J بسیار متعددی از آنچه که شکل نشان می‌دهد، می‌باشند. همچنین لوکوس زنجیرهٔ سبک κ شامل یک قطعه ثابت منفرد (C) می‌باشد که در شکل نشان داده شده است. اما لوکوس زنجیره سنگین، چندین قطعه C جداگانه دارد که هرکدام مرتبط با ایزوتیپ‌های ایمونوگلوبولین خاصی می‌باشد و در این شکل نشان داده نشده است.

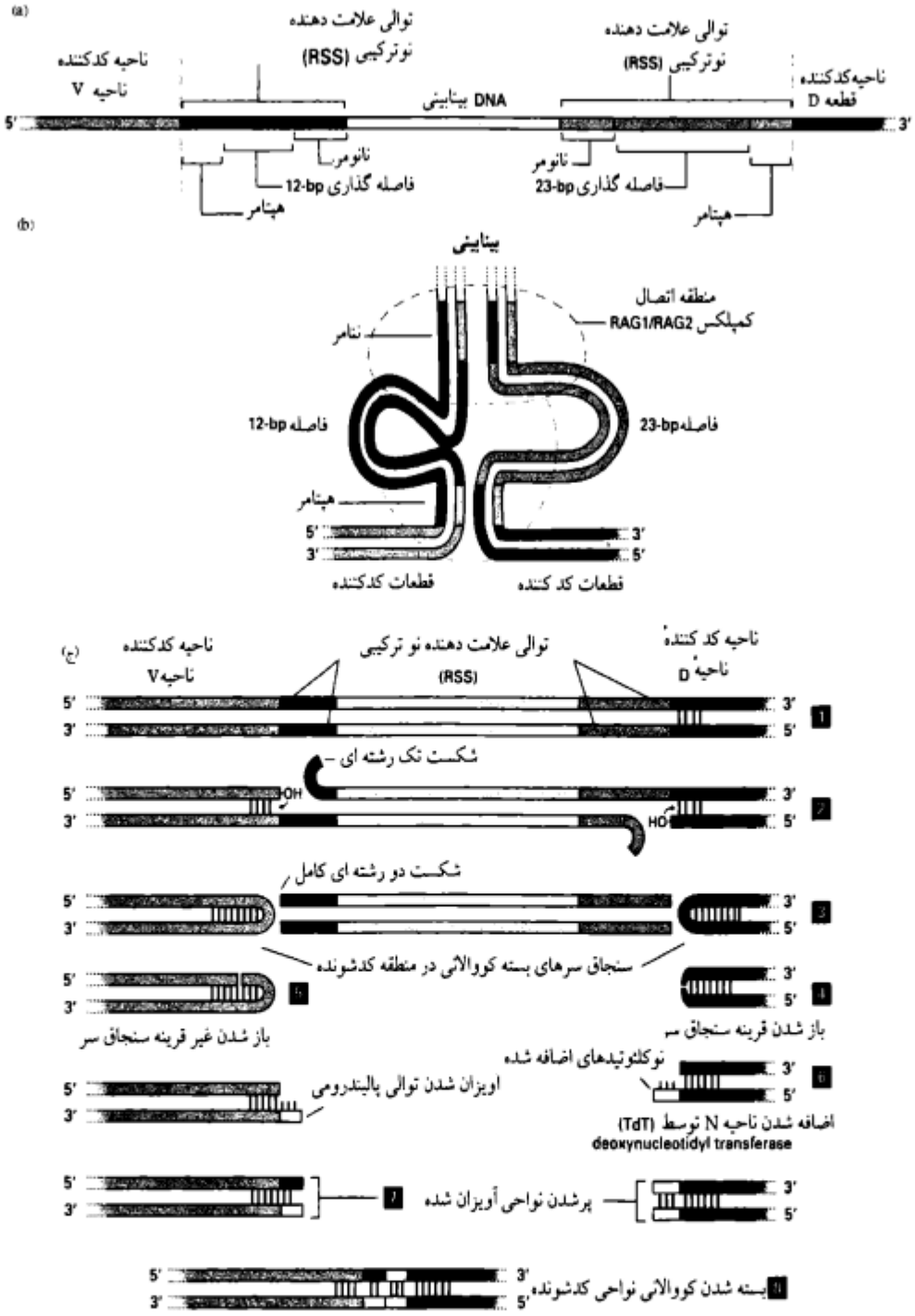
کدکننده ژن با RSS مجاورش ایجاد می‌کنند. تنها قطعات ژنی که دارای RSS های هپتامر - نانومر با فاصله گذاری‌هایی با طول متفاوت هستند، می‌توانند در این نوترکیبی شرکت کنند (به اصطلاح قانون فاصله گذار ۱۲/۲۳bp). در ادامه هر گروه OH جدیداً ایجاد شده، حمله نوکلئوفیلی را به رشته مکمل خود ترتیب می‌دهد و بدین ترتیب یک ساختمان سنجاق سری بسته شده کووالانی در انتهای هر کدام از ژن‌های کدشونده و نیز شکست‌های دورشته‌ای در انتهای RSS ها ایجاد می‌کند. کمپلکس‌های پروتئینی که شامل پروتئین‌های Ku70 و Ku80 هستند این کمپلکس‌ها را کنار یکدیگر قرار می‌دهند تا انتهاهایی که باید با یکدیگر اتصال یابند در مجاورت نزدیک به هم باشند. سپس انتهاهای RSS به صورت کووالانی، بدون حذف یا اضافه شدن نوکلئوتید، به یکدیگر اتصال یافته و حلقه‌ای ایجاد می‌کند که DNA بینابینی را هم در بر می‌گیرد و بدین صورت همگی با هم از لوکوس ژنی حذف می‌شوند. انتهاهای سنجاق سری قطعات کدشونده، تحت تأثیر نوترکیبی از همدیگر باز شده و بالاخره همان طوری که در شکل ۱۵c-۲۴ نشان داده شده، به هم اتصال یافته و فرایند نوترکیبی کامل می‌شود.

مکانیسم ژنتیکی جدیدی بنام **اتصالی حذفی**[1] شرح داده می‌شود که در آن قطعات ژنی V و دیگر قطعات ژنی درگیر در لوکوس زنجیره سبک، جهت رونویسی یکسانی دارند، البته بعضی قطعات ژنی V، جهت رونویسی معکوسی دارند و این قطعات توسط مکانیسم اتصالی وارونگی[2] به قطعات J اتصال می‌یابند و در این مکانیسم، قطعات V وارونه شده و RSS ها و DNAی بینابینی از لوکوس زنجیرهٔ سبک حذف نشده است.

نقص در سنتز پروتئین RAG، امکان بازآرایی ژن سوماتیک را از بین می‌برد و همان طوری که در زیر شرح داده شده، فرآیند بازآرایی برای تکامل سلول‌های B، امری ضروری می‌باشد. درنتیجه نقص RAG منجر به فقدان کامل سلول‌های B می‌شود و افرادی با چنین نقص عملکردی در ژن RAG، از بیماری‌های نقص ایمنی شدیدی رنج می‌برند.

تنوع در اتصال: علاوه بر تنوعی که توسط انتخاب تصادفی قطعات V و J در توالی‌ها ایجاد می‌شود، فرایندهای واسطه‌ای در مسیر نوترکیبی نیز عوامل دیگری برای گسترش تنوع توالی ایمونوگلوبولین‌ها محسوب می‌شوند. این تنوع اضافی در محل اتصال

1- Deletional joining 2- Inversional joining



▲ **شکل ۱۵-۲۴ مکانیسم بازآرایی قطعات ژنی ایمونوگلوبولین از طریق اتصال حذفی.** این مثال اتصال قطعه ژنی V و D را به یکدیگر نشان می‌دهد. قطعه ژنی D در لوکوس زنجیره سنگین وجود دارد اما در زنجیره سبک چنین قطعه‌ای را نداریم (شکل ۱۴b-۲۴). (a) موقعیت اجزای DNA که در نوترکیبی سوماتیک قطعات ژنی ایمونوگلوبولین دخیل می‌باشند. در سمت ′۳ همه قطعات ژنی V یک توالی علامت‌دهنده نوترکیبی (RSS) حفاظت شده وجود دارد که از یک توالی هپتامر، یک توالی فاصله‌گذار ۱۲bp و یک توالی نانومر تشکیل شده است. هر یک از قطعات D نیز که توانایی ترکیب با قطعه V را دارند، RSS مشابهی را در سمت ′۵ خودشان اما با فاصله‌گذار ۲۳bp نشان می‌دهند. توالی‌های نانومری و هپتامری سمت ′۵ قطعه D، زمانی که روی همان رشته خوانده شود، مکمل با توالی‌هایی هستند که در سمت ′۳ هر قطعه ژنی V وجود دارد. (b) مدل فرضی چگونگی اتصال دو منطقهٔ کدکننده که ممکن است بصورت فضایی آرایش یافته باشد، توسط کمپلکس رکامبیناز RAG_1 و RAG_2 اثبات شد. (c) فرآیندهای مربوط به مکانیسم اتصالی حذفی مناطق کدکننده V و D . DNA لایه زایا (❶) تاخوردگی پیدا کرده و بدین ترتیب قطعاتی که باید به هم متصل شوند، نزدیک یکدیگر قرار می‌گیرند و کمپلکس RAG_1/RAG_2، یک برش تک‌رشته‌ای در مرز بین توالی کدشونده و RSS ها ایجاد می‌کند (❷). گروه OH ′3 آزاد به رشتهٔ مکمل برش خورده حمله کرده و در هر انتهای قطعه کدکننده، ساختمان سنجاق سری بسته کووالانی و در هر ناحیهٔ مرزی RSS ها، یک شکست دورشته‌ای کامل ایجاد می‌کند (❸).

ساختمان سنجاق سری در مورد قطعه D به صورت قرینه (❹) و در مورد قطعه V به صورت غیرقرینه (❺) که در شکل نشان داده شده، باز می‌شود. آنزیم TDT[1] (انتقال‌دهندهٔ دزوکسی نوکلئوتیدهای انتهایی)، نوکلئوتیدها را با مکانیسم غیروابسته به الگو به ساختمان سنجاق سری باز شده به صورت قرینه، اضافه می‌کند (❺، راست)، و در نتیجه یک بخش آویزان از نوکلئوتیدهای غیرجفت‌شونده با توالی تصادفی ایجاد می‌کند؛ قسمت بازشده به صورت قرینه‌ای هم به طور خود به خودی یک بخش آویزان پالیندرومی ایجاد می‌کند (❻، چپ). بخش‌های آویزان غیرجفت‌شونده در انتهای هر دو قطعه کدکننده V و D توسط DNA پلی‌مراز، جفت می‌شوند (❼) و یا ممکن است با یک اگزونوکلئاز برش داده شوند. DNA لیگاز IV، دو قطعه ایجاد شده از نواحی کدکننده V و D را به هم متصل می‌کند (❽). بازآرایی قطعات V و J زنجیره سبک توسط مکانیسم مشابهی انجام می‌گیرد بجز اینکه اضافه شدن ناحیهٔ N در آن اتفاق نمی‌افتد (برای مطالعه بیشتر به متن مراجعه کنید).

قطعاتی که پهلوی هم قرار می‌گیرند، اتفاق می‌افتد. باز شدن سنجاق سر در انتهای قطعات کدکننده، یک مرحله کلیدی در این فرآیند محسوب می‌شود و ممکن است به صورت قرینه و یا غیرقرینه باشد (مرحله ❹ و ❺ شکل ۱۵-۲۴). پروتئین آرتمیس[2] که برای عملکردش به زیرواحد کاتالیتیک پروتئین کیناز وابسته به DNA نیازمند است، عمل باز کردن سنجاق سر را بر عهده دارد.

اگر عمل بازکردن سنجاق سر، غیرقرینه باشد، موجب ایجاد یک توالی پالیندرومی تک رشته‌ای کوتاه می‌شود و پر شدن این قسمت آویزان بوسیلهٔ DNA پلی‌مراز موجب اضافه شدن چندین نوکلئوتید بنام P-nucleotides می‌شود که بدون تردید قسمتی از توالی نسخهٔ اصلی ناحیهٔ کدکنندهٔ قطعات ژنی نمی‌باشد. متناوباً این قسمت آویزان ممکن است توسط حمله آنزیم اگزونوکلئازی حذف شود که می‌تواند منجر به حذف نوکلئوتید از مناطق کدکننده نسخه اصلی هم بشود. چنین اتصالاتی برای مناطق کدکننده V و D بطور یکسان می‌باشد. باز شدن قرینهٔ سنجاق سر همهٔ اطلاعات کدکنندهٔ نسخه اصلی را حفظ می‌کند. در غیر این صورت، انتهای مولکول DNA گرایش به آزاد شدن دارد و موجب ایجاد قطعات تک‌رشته‌ای کوتاه می‌شود که ممکن است مورد حمله اگزونوکلئازها واقع شده و نوکلئوتیدها حذف شوند.

به محض اینکه ساختارهای سنجاق سری باز می‌شوند، انتهای کدکنندهٔ آنها مورد پردازش قرار می‌گیرد و سپس این انتهاها توسط DNA لیگاز چهار (IV) و XRCC4 به هم اتصال یافته و یک ژن زنجیرهٔ سبک عملکردی ایجاد می‌کنند. فرآیند بازآرایی ذاتی، مکانیسم تنوع در اتصال می‌باشد که منجر به حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدها در محل‌های اتصالی کدکننده می‌شود. هر زمانی که قطعهٔ V و قطعهٔ J نوترکیبی پیدا می‌کنند توالی و چارچوب خواندن محصول VJ، قابل پیشگویی نیست. تنها $\frac{1}{3}$ واکنش‌های نوترکیبی منجر به ایجاد چارچوب خواندنی می‌شود که سازگار با سنتز زنجیرهٔ سبک است.

تنوع زنجیرهٔ سبک، حاصل ترکیب تصادفی قطعات V و J و همچنین مکانیسم تنوع در اتصال می‌باشد. بررسی ساختمان سه بعدی زنجیرهٔ سبک نشان می‌دهد که ناحیهٔ شدیداً متنوع توسط مکانیسم تنوع در اتصال بوجود می‌آید و یک حلقه‌ای بنام منطقهٔ بسیار متغیر (HV3) را تشکیل می‌دهد که در محل اتصالی آنتی‌ژن در ایمونوگلوبولین قرار گرفته و با آنتی‌ژن تماس پیدا می‌کند (شکل ۱۲b-۲۴).

بازآرایی لوکوس زنجیرهٔ سنگین شامل قطعات ژنی V، D و J می‌شود

سازماندهی لوکوس زنجیرهٔ سنگین پیچیده‌تر از لوکوس κ زنجیرهٔ سبک می‌باشد. لوکوس زنجیرهٔ سنگین نه تنها شامل ترتیب پشت سر هم متعددی از قطعات ژنی V (هرکدام پروموتور خاص خودش را دارد) و قطعات متعدد J می‌باشد بلکه همچنین قطعات D تنوع متعددی دارد (شکل ۱۴b-۲۴). نوترکیبی سوماتیک قطعات V، D و J یک توالی نوآرایش یافته‌ای را ایجاد می‌کند که ناحیهٔ متغیر زنجیرهٔ سنگین (V_H) را کد می‌کند.

در انتهای ′۳ هر قطعه ژنی در DNA زنجیرهٔ سنگین، توالی‌های نانومر و هپتامر حفاظت شده‌ای وجود دارد که توسط فاصله‌گذار از یکدیگر جدا شده‌اند و مشابه توالی علامت‌دهندهٔ نوترکیبی (RSS1) در DNAی زنجیرهٔ سبک می‌باشند. چنین توالی‌هایی به شکل مکمل و متقابل در انتهای ′۳ و ′۵ هر قطعه D وجود دارد (شکل ۱۵a-۲۴). قطعات J نیز مشابهاً در سمت ′۵ خودشان توسط RSS لازمه مجهز شده‌اند. طول فاصله‌گذارها در این RSS ها به نحوی می‌باشد که فقط امکان اتصال قطعات D با قطعات J و قطعات V نیز با قطعات DJ از قبل آرایش یافته، وجود دارد. البته امکان اتصال قطعه V با J و قطعه D با D به علت قانون نانومر - هپتامر ۱۲/۲۳ وجود ندارد. بازآرایی زنجیره سنگین از طریق

1- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

2- Artemis

مکانیسم‌های مشابهی ادامه پیدا می‌کند که در بالا برای بازآرایی زنجیرهٔ سبک شرح داده شده است.

در مسیر تکاملی سلول‌های B، نخست بازآرایی D-J و به دنبال آن بازآرایی V-DJ در لوکوس زنجیره سنگین صورت می‌گیرد (شکل ۱۶-۲۴). در مسیر بازآرایی D-J و V-DJ ممکن است آنزیم TdT به شیوه‌ای مستقل از الگو، نوکلئوتیدها را به انتهای OH ′۳ آزاد DNA، اضافه کند. حداکثر ۱۲ یا در همین حدود نوکلئوتید که ناحیه N نامیده می‌شود، امکان اضافه شدن دارند و هر زمانی که بازآرایی D-J و V-DJ اتفاق بیفتد این مکانیسم موجب ایجاد تنوع توالی بیشتری در محل اتصال قطعات می‌شود (مرحله ❻ شکل ۱۵-۲۴). تنها $\frac{1}{3}$ از نوترکیب‌ها موجب چارچوب خواندن صحیح برای توالی VDJ بازآرایی شده می‌شود. اگر بازآرایی توالی را ایجاد کند که کدکنندهٔ پروتئین عملکردی باشد، به آن بازآرایی محصول‌ده گویند. اگرچه لوکوس زنجیره سنگین روی هر دو کروموزوم همولوگ وجود دارد اما همان گونه که در پایین شرح داده می‌شود، تنها یک بازآرایی محصول‌ده کافی است.

افزاینده‌هایی که در فرودست گروه قطعاتی J و فرادست قطعهٔ ناحیهٔ ثابت زنجیره μ قرار گرفته‌اند، رونویسی پروموتور سمت ′۵ توالی VDJ بازآرایی شده را فعال می‌کنند (شکل ۱۶-۲۴). پردازش متناوب رونوشت اولیهٔ ژن زنجیره سنگین بازآرایی شده، mRNAی عملکردی را ایجاد می‌کند که کدکنندهٔ زنجیره سنگین μ می‌باشد. در مورد هر دو ژن‌های زنجیرهٔ سنگین و زنجیرهٔ سبک، نوترکیبی سوماتیک پروموترهای فرادست قطعات ژنی V را در دسترس عملکرد افزاینده‌هایی قرار می‌دهد که برای عمل رونویسی ضروری می‌باشند. بنابراین تنها توالی‌های بازآرایی شده VJ و VDJ می‌توانند رونویسی کنند و قطعات V که به صورت لایه زایا وجود داشته باشند، اجازهٔ رونویسی ندارند.

جهش‌های سوماتیک منجر به تولید و انتخاب آنتی‌بادی‌های با میل پیوندی بالا می‌شود

علاوه بر تنوعی که توسط مکانیسم نوترکیبی سوماتیک و بی‌دقتی در اتصال ایجاد می‌شود، سلول‌های B فعال شده با آنتی‌ژن می‌توانند تحت تأثیر مکانیسم دیگری به نام **جهش‌های سوماتیک**[1] قرار بگیرند. به محض دریافت پیام‌های خاص که اکثراً توسط سلول‌های T ارسال می‌شود، آنزیمی بنام AID[2] (دِآمیناز القاءکنندهٔ فعالیت) تولید می‌شود که باز سیتوزین را دِآمینه کرده و آن را به باز یوراسیل تبدیل می‌کند و در هنگام همانندسازی ممکن است باز آدنین به جای گوانین در رشته مکمل قرار بگیرد و موجب ایجاد جهش جانشینی[3] گوانین به جای آدنین شود (شکل ۳۵-۴). متناوباً، ممکن است یوراسیل توسط آنزیم DNA گلیکوزیلاز حذف شده و منجر به ایجاد جایگاه خالی به نام a basic شود و این فضای خالی ممکن است به صورت Transition و Transversion[4] همانندسازی شود مگر اینکه مقابل این فضا، باز گوانوزین قرار گیرد که توانایی جفت شدن با سیتوزین را دارد. مجموعهٔ جهش‌ها در هر بار تقسیم موفقی که در سلول‌های B اتفاق می‌افتد منجر به جهش‌های فراوانی در قطعات VDJ و VJ بازآرایی شده می‌شود. قسمت اعظم این جهش‌ها زیان‌آور می‌باشند، چون باعث کاهش میل پیوندی آنتی‌بادی کدشده به آنتی‌ژن مورد نظر می‌شوند. اما بعضی جهش‌ها میل پیوندی آنتی‌بادی را افزایش می‌دهند. درنتیجه زمانی که مقدار آنتی‌ژن کم باشد، و سلول‌های B جهت انتخاب کلنی با یکدیگر رقابت کنند، سلول‌های B تولیدکنندهٔ آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا، شانس انتخاب بیشتری دارند (شکل ۱۱-۲۴). این مکانیسم منجر به تولید جمعیتی از سلول‌های B می‌شود که آنتی‌بادی‌هایی با میل پیوندی بالا برای آنتی‌ژن دارند.

در مسیر پاسخ ایمنی یا ایمونیزاسیون مکرر، آنتی‌بادی‌ها در نتیجه جهش‌های سوماتیک و بلوغ میل پیوندی[5] افزایش میانگین میل پیوندی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن پیدا می‌کنند و چنین آنتی‌بادی‌هایی، میل پیوندی بالایی برای آنتی‌ژن (در سطح نانومولار) را نشان می‌دهند. به دلایل نامشخص، فعالیت آنزیم دآمیناز به قطعات VDJ و VJ بازآرایی شده معطوف شده و شاید چنین تمایلی لازمهٔ رونویسی فعال باشد. کل مکانیسم جهش سوماتیک بسیار وابسته به آنتی‌ژن می‌باشد و به برهم‌کنش کامل سلول‌های B و T نیاز دارد.

1- Somatic hypermutation

2- Activation Induced Deaminase

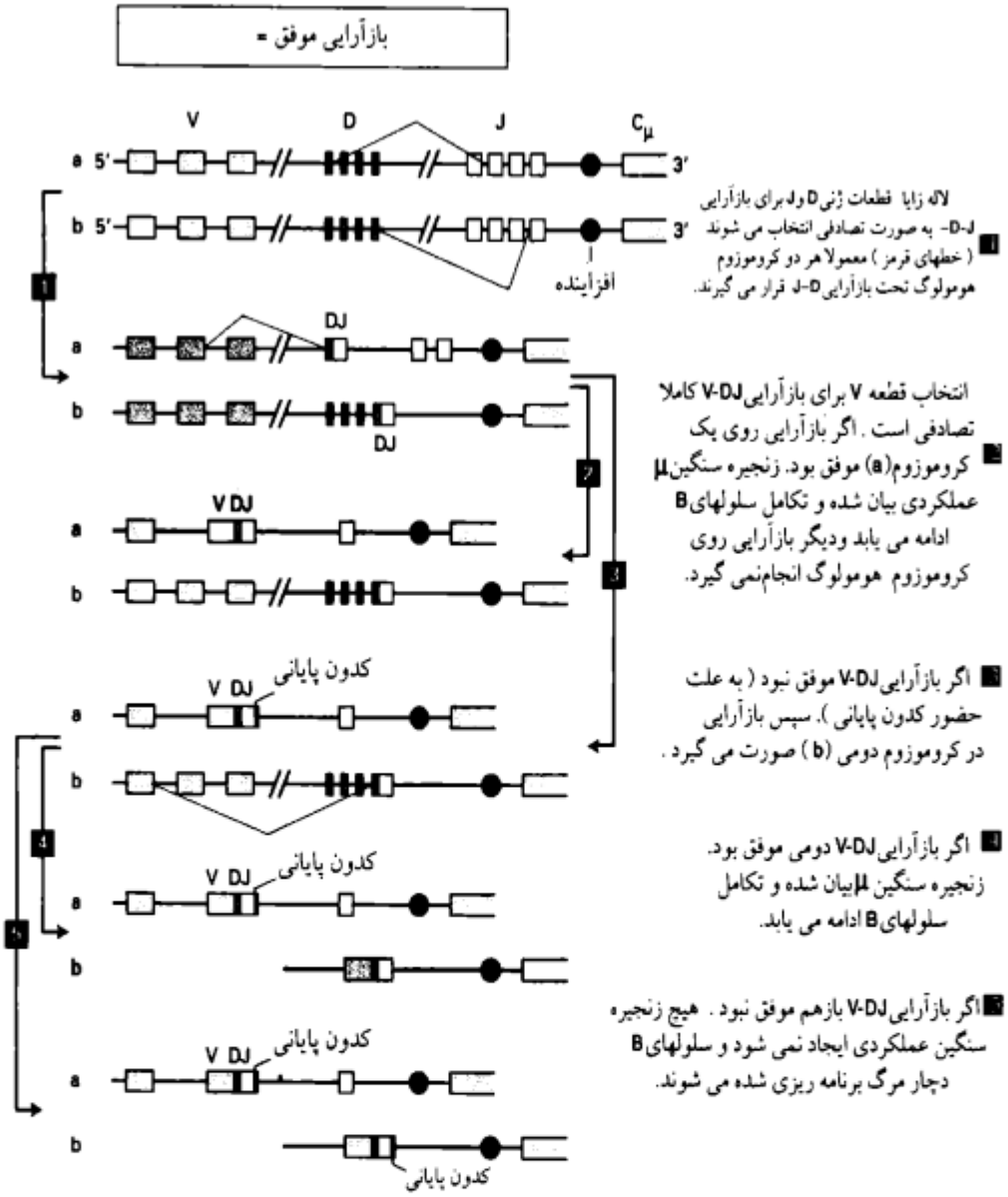
3- Transition

جهشی است که در اثر جانشین شدن یک جفت باز پورین - پیریمیدین توسط یک جفت باز پورین - پیریمیدین دیگر اتفاق می‌افتد.

4- Transversion

جهشی است که در اثر جانشین شدن یک جفت باز پورین - پیریمیدین توسط یک جفت پیریمیدین - پورین دیگر اتفاق می‌افتد.

5- Affinity maturation



▲ **شکل ۱۶-۲۴ (شکل رنگی) نوترکیبی سوماتیک لوکوس زنجیرهٔ سنگین.** لوکوس زنجیرهٔ سنگین ایمونوگلوبولین شامل قطعات ژنی V، D و J متعددی می‌باشد که باید بازآرایی شوند و توالی کدکنندهٔ ناحیهٔ V را ایجاد کنند. دو نسخه از لوکوس زنجیرهٔ سنگین روی کروموزوم‌های هومولوگ وجود دارد که به صورت a و b نشان داده شده است. نخست بازآرایی D با (❶) J روی یک یا هر دو کروموزوم‌هایی که حامل لوکوس زنجیرهٔ سنگین می‌باشند، اتفاق می‌افتد. سپس قطعهٔ V با قطعه DJ جدیداً بازآرایی شده روی کروموزوم، بازآرایی می‌کند. اگر این بازآرایی محصول‌ده بود (❷) دیگر بازآرایی صورت نمی‌گیرد و تکامل سلول‌های B ادامه پیدا می‌کند اما اگر بازآرایی اولیه V با DJ، محصول‌ده نباشد (به طورمثال: یک کد پایانی نا به جا ایجاد شود) کروموزوم بعدی ممکن است بازآرایی کند (❸). اگر بازآرایی کروموزوم دومی محصول‌ده بود (❹)، تکامل سلول‌های B ادامه می‌یابد. البته اگر بازآرایی V با DJ باز هم محصول‌ده نباشد، (❺) سلول‌های B در حال تکامل می‌میرند.

تکامل سلول‌های B نیازمند ورود اطلاعات از طریق پذیرنده‌های سلول‌های Pre-B می‌باشد

همان طوری که ما قبلاً دیدیم، سلول‌های B که مسئول تولید ایمونوگلوبولین هستند، باید قطعات ژنی مورد نیاز برای تولید ژن‌های زنجیره سبک و سنگین عملکردی را بازآرایی کنند. بازآرایی ژنی در یک فرایند کاملاً منظم در طی تکامل سلول‌های B و با بازآرایی ژن‌های زنجیرهٔ سنگین شروع می‌شود. در ابتدا ژن زنجیره سنگین بازآرایی شده و یک گیرنده متصل به غشاء ایجاد می‌کند که نیاز نهایی سلول برای پیشروی بیشتر فرایند تکامل سلول‌های B (و سنتز آنتی‌بادی) را برآورده می‌کند.

بازآرایی موفق قطعات V، D و J در لوکوس زنجیرهٔ سنگین، اجازهٔ سنتز زنجیره μ را می‌دهد، سلول‌های B در این مرحله از تکامل، سلول‌های Pre-B نامیده می‌شوند ولی از آنجائی که گردهم‌آیی ژن زنجیره سبک عملکردی هنوز کامل نشده است این پذیرنده قادر به شناسایی آنتی‌ژن نمی‌باشد. ژن زنجیرهٔ سنگین جدیداً بازآرایی شده، پلی پپتید M را کد می‌کند که قسمتی از پذیرنده علامت‌دهنده می‌باشد که بیان آن برای تکامل سلول‌های B در یک فرایند منظم ضروری می‌باشد. زنجیرهٔ μ ساخته شده در این مرحله از تکامل، نوع اتصال یافته به غشاء می‌باشد که به دنبال مواجهه با آنتی‌ژن، تبدیل به ایمونوگلوبولین‌های ترشحی محلول می‌شوند که از همان رونوشت به کار برده شده برای تولید ایمونوگلوبولین‌های متصل شده به غشاء، استفاده شده است.

در سلول‌های Pre-B، زنجیرهٔ μ جدیداً سنتز شده به زنجیره دیگری بنام جانشین زنجیرهٔ سبک که مرکب از دو زیرواحد λ و V preB می‌باشد، متصل می‌شود (شکل ۱۷-۲۴). زنجیرهٔ μ دنباله سیتوپلاسمی ندارد و بنابراین قادر به فراخوانی اجزای سیتوپلاسمی به منظور انتقال پیام نمی‌باشد. در عوض، سلول‌های B دو پروتئین غشایی کمکی به نام Igα و Igβ را تولید می‌کنند که هرکدام از آنها در دنبالهٔ سیتوپلاسمی خود، موتیف فعال‌سازی با ساختار تیروزین یا ITAM دارند. به مجموعه مولکول‌های ذکر شده همراه با Igα و Igβ، پذیرندهٔ سلول‌های pre-B (Pre-BCR) گفته می‌شود. زمانی که پیام‌های مناسبی به چنین سلول‌هایی برسد، موجب فراخوانی و فعال‌سازی تیروزین کینازی از خانوادهٔ Scr می‌شود که ریشه‌های تیروزین موجود در ITAM را فسفریله می‌کند. این شکل فسفریله ITAM ها، موجب فراخوانی مولکول‌های دیگر ضروری به منظور انتقال پیام می‌شود و چون هنوز زنجیرهٔ سبک عملکردی قسمتی از پذیرنده نشده است، چنین پذیرنده‌ای قادر به شناسایی آنتی‌ژن نمی‌باشد.

پذیرنده‌های سلول‌های Pre-B، عملکردهای مهم متعددی را انجام می‌دهند. اولاً، بیان آنزیم ریکامبیناز RAG را مهار کرده، بنابراین بازآرایی لوکوس دیگر زنجیرهٔ سنگین (آللی) اتفاق نمی‌افتد، این پدیده را **حذف آللی**[1] می‌نامند که موجب بازآرایی و بیان یکی از دو آلل در دسترس زنجیره سنگین می‌شود. ثانیاً، به علت وجود Igα و Igβ، چنین پذیرنده‌هایی به عنوان واحد انتقال‌دهنده پیام عملکردی عمل می‌کنند. ثالثاً، تکثیر سلولی را آغاز کرده و موجب گسترش تعداد سلول‌های B می‌شود که نوترکیبی VDJ و DJ موفقی را انجام می‌دهند.

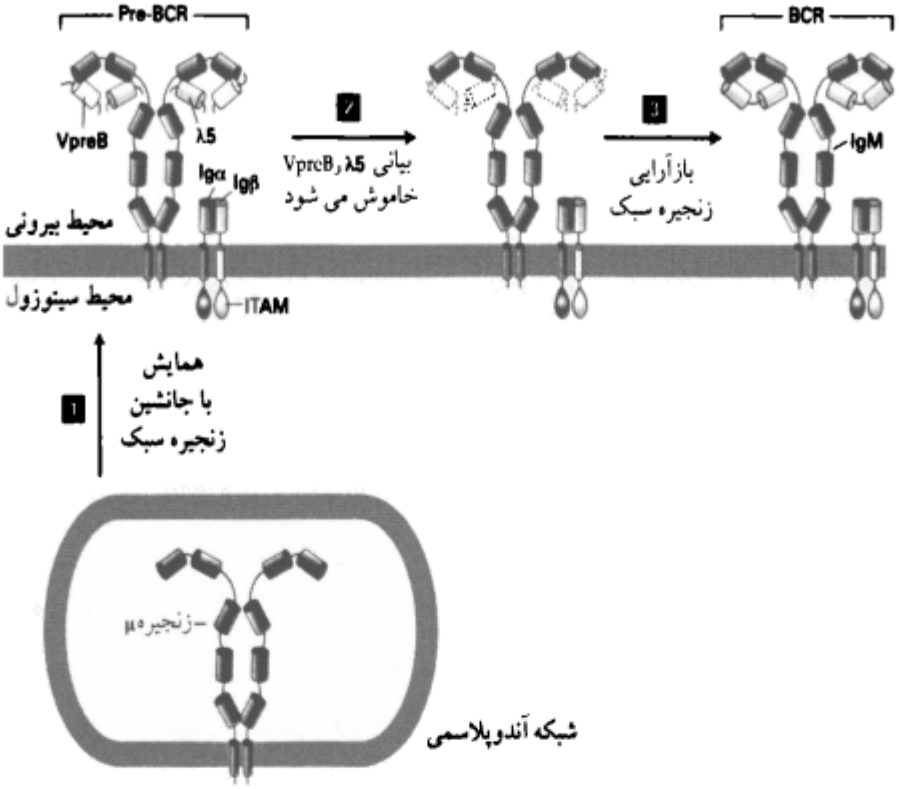
در ادامه مسیر تکاملی، بیان زیرواحدهای جانشین زنجیرهٔ سبک، λs و V preB، خاموش می‌شود و کاهش پیشرونده بیان λs و V preB در هر بار تقسیم موفق سلول‌های B، موجب آغاز بیان دوبارهٔ آنزیم RAG می‌شود که این بار بازآرایی لوکوس زنجیرهٔ سبک κ یا λ را مورد هدف قرار می‌دهد. بازآرایی موفق VJ نیز موجب مهار بازآرایی لوکوس آللی دیگر زنجیرهٔ سبک می‌شود (حذف آللی). به دنبال بازآرایی موفق VJ زنجیرهٔ سبک، سلول‌های B می‌توانند هم زنجیره سنگین و هم زنجیرهٔ سبک κ یا λ را تولید کنند که به آن پذیرنده سلول‌های B (BCR) گفته می‌شود و می‌توانند آنتی‌ژن را شناسایی کنند (شکل ۱۷-۲۴). به محض اینکه BCR کامل در سطح سلول‌های B بیان شد، همهٔ مراحل بعدی اعم از فعال شدن سلول‌های B و تمایز بعدی آنها در نتیجه شناسایی آنتی‌ژن‌های اختصاصی توسط پذیرندهٔ سلول‌های B (BCR) صورت می‌گیرد. BCR ها نه تنها نقش مهمی در تکثیر سلول‌های B بعد از مواجهه با آنتی‌ژن، ایفا می‌کنند بلکه همچنین آنتی‌ژن توسط آنها بلع و وارد سلول‌های B می‌شود و آنتی‌ژن مورد نظر هضم شده و به صورت پیام‌هایی درمی‌آید که همکاری سلول‌های T را جلب می‌کند. روند پردازش آنتی‌ژن توسط سلول‌های B در بخش‌های بعدی شرح داده خواهد شد.

در حین پاسخ‌های ایمنی آداپتیو، ایمونوگلوبولین غشایی سلول‌های B به ایمونوگلوبولین ترشحی تغییر شکل می‌دهد

همان گونه که شرح دادیم، گیرنده‌های سلول‌های B که به صورت IgM متصل به غشاء می‌باشند، توانایی شناسایی آنتی ژنهای اختصاصی را دارند و موجب راه‌اندازی فرایند انتخاب کلونی و تکثیر سلول‌های B می‌شوند و درنتیجهٔ چنین روندی، تعداد سلول‌های B اختصاصی آنتی‌ژن افزایش می‌یابد (شکل ۱۱-۲۴). البته عملکرد کلیدی ایمونوگلوبولین‌ها مثل خنثی‌سازی آنتی‌ژن و یا کشتن باکتری‌ها به شکل ترشحی ایمونوگلوبولین وابسته می‌باشد به دلیل اینکه امکان دارد به گردهم‌آیی ایمونوگلوبولین در محیط‌های خارج سلولی و حتی دور از محل تولید آنها، نیاز باشد.

در زمان رونویسی اولیهٔ زنجیرهٔ سنگین، بین سنتز ایمونوگلوبولین متصل به غشاء و شکل ترشحی آن، انتخاب صورت می‌گیرد. همان گونه که در شکل ۱۸-۲۴ نشان داده شده، لوکوس زنجیرهٔ سنگین μ شامل دو اگزون (TM2 و TM1) می‌باشد که با

1- Allelic exclusion

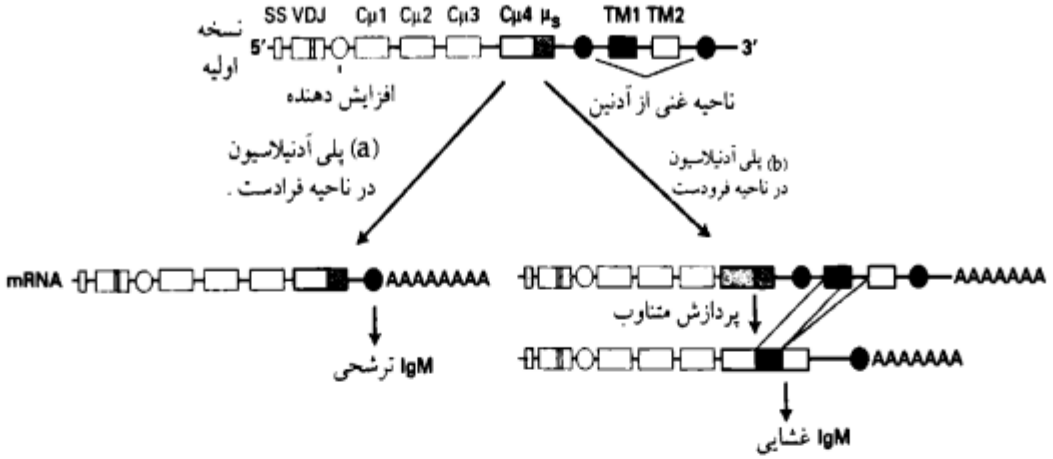


▲ **شکل ۱۷-۲۴ ساختار پذیرنده سلول‌های Pre-B و نقش آنها در تکامل سلول‌های B.** بازآرایی موفق قطعات ژنی V، D و J زنجیره سنگین، موجب سنتز زنجیرهٔ سنگین μ متصل شده به غشاء در شبکهٔ آندوپلاسمی سلول‌های Pre-B می‌گردد. در این مرحله هنوز بازآرایی ژنی زنجیرهٔ سبک اتفاق نیفتاده است و زنجیره سنگین μ با جانشین زنجیرهٔ سبک، λ_s و V preB، پذیرنده‌های سلول‌های Pre - B (Pre - BCR) را می‌سازد (❶). این پذیرنده موجب تکثیر آن دسته از سلول‌های B می‌شود که دارای چنین پذیرنده‌ای هستند و همچنین بازآرایی لوکوس زنجیرهٔ سنگین را روی کروموزوم دیگر مهار می‌کند. در ادامه روند تکثیر، بیان λ_s و V preB خاموش می‌شود (❷) و موجب کاهش دسترسی جانشین زنجیره سبک می‌گردد و در نتیجه بیان Pre-BCR کاهش می‌یابد و متعاقباً بازآرایی لوکوس زنجیرهٔ سبک شروع می‌شود (❸). اگر این بازآرایی موفق باشد سلول‌های B می‌توانند زنجیرهٔ سبک عملکردی بسازند و بدین ترتیب پذیرنده‌های کامل سلول‌های B شکل می‌گیرد که ترکیبی از IgM متصل شده و $Ig\alpha$ و $Ig\beta$ می‌باشند و این چنین سلول‌های B، آمادهٔ تحریک توسط آنتی‌ژن‌های اختصاصی می‌باشند.

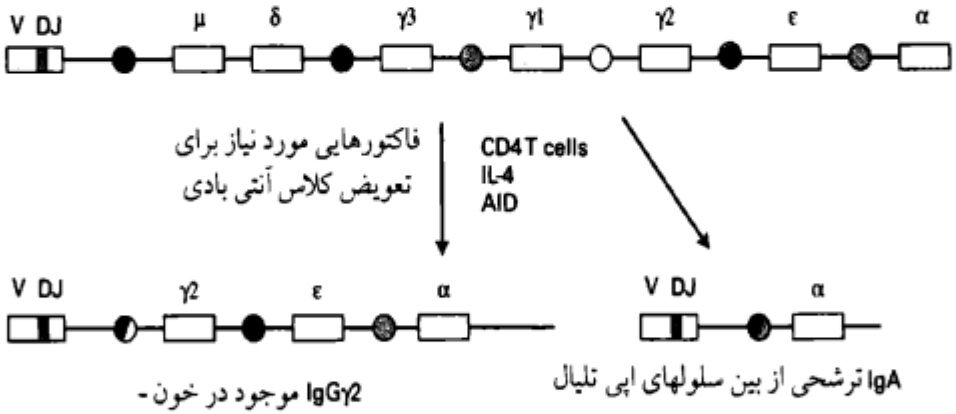
همکاری یکدیگر دُمین C انتهایی که مسئول نگهداری IgM در غشاء می‌باشد را کد می‌کنند. بدین صورت که، یک ناحیهٔ غنی از آدنین در فرادست و ناحیهٔ غنی از آدنین دیگری در فرودست این اگزون‌ها یافت شده است که اگر در حین رونویسی ناحیهٔ غنی از آدنین موجود در سمت فرودست انتخاب شود و فرایندهای بعدی ادامه یابد، منجر به تولید mRNA کدکننده شکل متصل به غشاء می‌باشد و اگر ناحیهٔ فرادست انتخاب شود، منجر به تولید شکل ترشحی زنجیرهٔ μ می‌شود. چنین بازآرایی‌های مشابهی برای دیگر قطعات ژنی ثابت سایر ایمونوگلوبولین‌ها یافت شده است که هر یک از آنها می‌توانند بطور اختصاصی هم قطعهٔ زنجیرهٔ سنگین متصل به غشاء و هم زنجیرهٔ سنگین ترشحی را تولید کنند.

در مسیر تمایز سلول‌های B، سلول‌های B توانایی تغییر سنتز از شکل ایمونوگلوبولین ترشحی را کسب می‌کنند و زمانی که سلول‌های B، تمایز نهایی می‌یابند، به پلاسماسل‌ها[1] تبدیل می‌شوند که تقریباً بطور انحصاری پروتئین‌های ترشحی را تولید می‌کنند (شکل ۶-۲۴). پلاسماسل‌ها چندین هزار مولکول آنتی‌بادی را در ثانیه تولید و ترشح می‌کنند که درنتیجه به تولید آنتی‌بادی‌های ترشحی سرعت بخشیده و مبنای پاسخ‌های ایمنی آداپتیو در حذف پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهند. مقدار حفاظتی آنتی‌بادی‌ها متناسب با غلظتی است که در جریان خون یافت می‌شود. در حقیقت، سطح آنتی‌بادی‌های گردشی غالباً به عنوان عامل کلیدی در تعیین واکسیناسیون موفق در مقابل یک پاتوژن و شیره مورد استفاده قرار

1- Plasma cells



▲ **شکل ۱۸-۲۴ سنتز ایمونوگلوبولین‌های غشایی و ترشحی.** سازماندهی نسخهٔ اولیه زنجیرهٔ سنگین μ در قسمت بالا نشان داده شده است: $C_\mu 4$ اگزون کدکننده چهارمین دُمین منطقهٔ ثابت μ می‌باشد؛ μ_s توالی کدکنندهٔ منحصر به فرد IgM غشایی می‌باشد و TM_1 و TM_2 اگزون‌هایی هستند که دومن درون غشایی زنجیرهٔ μ را کد می‌کنند. ساخته شدن IgM غشایی یا ترشحی وابسته به انتخاب یکی از نواحی‌های غنی از آدنین در طول فرآیند رونویسی اولیه می‌باشد. (a) اگر ناحیهٔ غنی از آدنین فرادست انتخاب شود mRNA حاصل، شامل توالی اگزون $C_\mu 4$ می‌باشد که تولیدکنندهٔ فرم ترشحی است. (b) اگر ناحیهٔ غنی از آدنین فرودست انتخاب شود، μ_s که مشتقی از اگزون $C_\mu 4$ می‌باشد به همراه اگزون‌های کدکننده قسمت درون غشایی زنجیرهٔ سنگین، طی روند پردازش متناوب حذف می‌شود و mRNA حاصل، تولیدکنندهٔ فرم غشایی است.



▲ **شکل ۱۹-۲۴ تعویض کلاس لوکوس زنجیرهٔ سنگین ایمونوگلوبولین.** فرآیند تعویض کلاس به نواحی سوئیچ (Switch sites) نیاز دارد که توالی‌های تکراری هستند و در فرادست ژن‌های ناحیهٔ ثابت زنجیرهٔ سنگین قرار دارند. این فرآیند به آنزیم AID، همکاری سلول‌های T و سایتوکاین‌های تولید شده (برای مثال IL-4) توسط سلول‌های T نیاز دارد. در این فرآیند قطعات DNA پایین نواحی سوئیچ فرادست اگزون‌های μ و ناحیهٔ ثابت ایمونوگلوبولینی که می‌خواهیم به آن سوئیچ دهیم، حذف می‌شود. تعویض کلاس منجر به تولید مولکول‌های آنتی‌بادی با اختصاصیت یکسان با ایمونوگلوبولین غشایی سلول‌های B می‌شود که در پاسخ‌های اولیه تولید شده بودند، اما نواحی ثابت زنجیرهٔ سنگین متفاوتی دارند که عملکردهای اجرایی مختلفی را شامل می‌شوند.

می‌گیرد. توانایی تثبیت سطح آنتی‌بادی کافی توسط پلاسماسل‌ها مربوط به توانایی آنها در سنتز آنتی‌بادی به مقدار زیاد می‌باشد که به گسترش وسیع شبکه آندوپلاسمی نیاز دارد و مشخصهٔ پلاسماسل‌ها می‌باشد.

سلول‌های B می‌توانند ایزوتیپ ایمونوگلوبولین ساخته شده را تغییر دهند

در لوکوس زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین‌ها، اگزونی که زنجیرهٔ μ را کد می‌کند، بلافاصله در فرودست اگزون بازآرایی شدهٔ VDJ قرارگرفته است (شکل ۱۹-۲۴، بالا). و به دنبال آن اگزون متعلق به

زنجیرهٔ δ قرار می‌گیرد. رونویسی لوکوس زنجیرهٔ سنگین ایمونوگلوبولینی جدیداً بازآرایی شده منجر به رونوشت اولیه‌ای می‌شود که شامل نواحی ثابت زنجیره μ و δ می‌باشد. پردازش متناوب این رونوشت بزرگ تعیین می‌کند که زنجیره μ و یا زنجیره δ تولید شود. بقیهٔ ایزوتیپ‌های زنجیرهٔ سنگین توسط اگزون‌هایی کد می‌شوند که در فرودست ترکیب μ/δ قرار گرفته‌اند. مجموعهٔ اگزونی مربوط به هر یک از ایزوتیپ‌های زنجیره سنگین (به استثناء زنجیره δ) در فرادست خود، توالی‌های تکراری یا switch sites دارند که احتمالاً به علت ویژگی تکراری‌پذیری، مستعد نوترکیبی می‌باشند. در ابتدا چون تمامی سلول‌های B لزوماً در سطح خودشان IgM دارند، عمل نوترکیبی منجر به تعویض کلاس از IgM به یکی دیگر از ایزوتیپ‌های زنجیره سنگین می‌شود که در سمت فرودست و به صورت ردیف ژنی مناطق ثابت قرار گرفته‌اند (شکل ۱۹-۲۴) و در این روند، DNA بینابینی حذف می‌شود.

سلول‌های B در مسیر تمایز خود، به طور متوالی می‌توانند از فرآیند تعویض کلاس استفاده کنند اما بطور عمده، زنجیرهٔ سبک و قطعات VDJ بازآرایی شده در مسیر تکاملی سلول‌های B، تحت تأثیر چنین فرآیندی قرار نمی‌گیرند. این فرآیند منجر به تولید آنتی‌بادی‌هایی با مناطق ثابت مختلف و اختصاصیت آنتی‌ژنی یکسان می‌شوند. هرکدام از ایزوتیپ‌های ایمونوگلوبولینی توسط مناطق ثابت منحصر به فرد خود مورد شناسایی قرار می‌گیرند. همان گونه که قبلاً بحث شد، مناطق ثابت، عملکردهای اجرایی ایزوتیپ‌های مختلف را تعیین می‌کنند. فرآیند تعویض کلاس کاملاً وابسته به فعالیت آنزیم AID و حضور آنتی‌ژن و سلول‌های T می‌باشد. جهش‌های سوماتیک و تعویض کلاس ایمونوگلوبولین به طور همزمان اتفاق می‌افتد و منجر به تنظیم مناسب پاسخ‌های ایمنی آداپتیو در جهت بهبود میل پیوندی آنتی‌بادی تولید شده و عملکردهای اجرایی مربوطه می‌شود.

نکات کلیدی بخش ۳-۲۴

ایجاد تنوع آنتی بادی و تکامل سلول B

■ ژنهای کدکننده آنتی بادیهای عملکردی توسط بازآراییهای بخش‌های متعدد DNA در نواحی زنجیره سنگین و زنجیره سبک تولید می‌شوند. این بازآراییها مستلزم بخشهای V و J برای زنجیره‌های سبک ایمونوگلوبین و بخشهای V، D و J برای زنجیره‌های سنگین ایمونوگلوبین‌های می‌باشد (شکل ۱۴-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ بازآراییهای بخشهای V و J و همچنین V، D و J توسط توالیهای پیام نوترکیبی حفاظت شده (RSSs) متشکل از هپتامرها و نانومرهای جداشده توسط فواصل ۱۲ یا ۲۳ جفت بازی کنترل می‌شوند (شکل ۱۵-۲۴ را ملاحظه کنید). فقط آن بخش‌هایی که دارای فواصل با طولهای متفاوت است می‌توانند به طور موفقیت‌آمیزی باز آرایی شوند.

■ ماشین مولکولی که فرایند بازآرایی را انجام می‌دهد شامل ریکامبینازهای (RAG1,RAG2) تولیدشده توسط فقط لنفوسیت‌ها و شماری از سایر پروتئین‌هایی است که در اتصال انتهاهای غیرهمولوگ مولکول DNA در سایر انواع سلول‌ها شرکت می‌کنند.

■ تنوع آنتی‌بادی توسط انتخاب تصادفی بخشهای Ig ژن نوترکیب شده و توسط توانایی زنجیره‌های سنگین و سبک تولیدشده از بازآرایی ژنهای Ig برای تجمع با انواع مختلف زنجیره‌های سنگین و سبک صورت می‌گیرد.

■ اتصالات متعدد تنوع دیگری از آنتی بادی را در اتصالات بخشهای ژن به هنگام نوترکیبی سوماتیکی تولید می‌کند.

■ تنوع بیشتر آنتی‌بادی هنگامی رخ می‌دهد که سلول‌های B آنتی ژن را به عنوان یک نتیجه هیپرموتاسیون سوماتیک برشمرده که می‌تواند منجر به انتخاب و تکثیر سلول‌های B تولید کنندهٔ آنتی بادیهای باتمایل بالا، فرایندی به نام بلوغ تمایل، شود.

■ به هنگام تکوین سلول B ژنهای زنجیره سنگین در ابتدا بازآرایی کرده و منجر به بیان گیرندهٔ سلول پیش B می‌شود. بازآرایی متوالی ژنهای زنجیرهٔ سبک باعث همایش گیرنده IgM متصل شده به غشای سلول B می‌شود (شکل ۱۷-۲۴ راملاحظه کنید).

■ فقط یک کپی از آلل‌های لوکوس زنجیره سنگین و زنجیره سبک بازآرایی می‌شوند تا از تولید یک Ig با ویژگی آنتی ژنی منفرد توسط سلول‌های B اطمینان حاصل گردد.

■ پلی آدنیلاسیون مکانهای مختلف Poly(A) در رونوشت اولیه Ig ، نوع آنتی بادی متصل به غشاء یا ترشحی را تعیین می‌کند (شکل ۱۸-۲۴ را ملاحظه کنید)

■ به هنگام پاسخ ایمنی، تعویض کلاس به سلول‌های B اجازه می‌دهد اعمال اثرگری ایمونوگلوبین‌های تولیدی را به هم نزدیک کرده ولی ویژگی آنها برای آنتی ژن را دوباره باز می‌گردند (شکل ۱۹-۲۴).

۲۴-۴ MHC و عرضه آنتی‌ژن

آنتی‌بادی‌ها می‌توانند آنتی‌ژن را بدون دخالت هر مولکول جزء سومی بشناسند. یعنی حضور آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای میانکنش‌شان کافی است. اگر چه آنتی‌بادی‌ها در حذف پاتوژن‌های ویروسی و باکتریایی نقش دارند، ولی اغلب ضرورت دارد که سلول‌های عفونی شده (آلوده) که به عنوان منبعی از ذرات و ویروسی جدید محسوب می‌شوند، تخریب گردند. چنین وظیفه‌ای توسط سلول‌های T با فعالیت سیتوتوکسیک انجام می‌گیرد. سلول‌های T برای شناسایی آنتی‌ژن از گیرنده‌های آنتی‌ژنی استفاده می‌کنند که ژن‌های این گیرنده‌ها توسط مکانیسم‌هایی تولید می‌شوند که مشابه مکانیسم تولید ژن‌های ایمونوگلوبولین‌ها توسط سلول‌های B می‌باشد. به هر حال شناسایی آنتی‌ژن توسط سلول‌های T بسیار مشکل‌تر از سلول‌های B صورت می‌گیرند. گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن T قطعات کوچکی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی را می‌شناسند که توسط گلیکوپروتئین‌های غشایی کد شده توسط **کمپلکس سازگاری نسجی اصلی (MHC)**[1] به سلول‌های T عرضه می‌شوند. سلول‌های مختلف عرضه کننده آنتی‌ژن در مسیر فعالیت طبیعی خود، پروتئین‌های مشتق شده از پاتوژن‌ها و همچنین پروتئین‌های خودی را هضم کرده و سپس قطعات پروتئین ایجاد شده (پپتیدها) را که به صورت فیزیکی همراه با مولکول MHC می‌باشند در سطح خود عرضه می‌کنند. سلول‌های T می‌توانند این کمپلکس‌ها را بررسی کرده و در صورت شناسایی پپتید مشتق از پاتوژن عملکرد مناسبی را به کار گیرند که ممکن است شامل کشتن سلول حامل کمپلکس پپتید - MHC باشد.

پروتئین‌های MHC که معمولاً **مولکول‌های MHC** نیز نامیده می‌شوند واکنش متقابل ما بین سلول‌های T و سلول‌های B را تسهیل می‌کنند. سلول‌های B معمولاً آنتی‌بادی‌های ترشحی را تولید نمی‌کنند. مگر این که کمکی از زیر مجموعه دیگر سلول‌های T به نام سلول‌های T کمکی (helper T cells) را دریافت کنند. سلول‌های T همچنین از گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن جهت شناسایی کمپلکس پپتید - MHC استفاده می‌کنند. در این بخش ما MHC و پروتئین‌هایی که توسط MHC کد می‌شود را شرح داده و همچنین بررسی می‌کنیم که چگونه این مولکول‌های MHC در شناسایی آنتی‌ژن نقش دارند.

MHC توانایی دو جزء غیرخویشاوند از یک گونه مشابه را جهت قبول یا رد پیوند تعیین می‌کند.

همان طوری که از نامش استنباط می‌شود کمپلکس سازگاری نسجی اصلی به عنوان لوکوس ژنتیکی که قبول یا رد پیوند را کنترل می‌کند، کشف گردید. مدت‌ها قبل، زمانی که کشت بافت هنوز به مرحله‌ای نرسیده بود که رده‌های سلولی مشتق از تومور بتوانند در آزمایشگاه تکثیر شوند محققان متکی بر پاساژ متوالی بافت توموری در آزمایشگاه بودند. بسیار سریع مشاهده شد توموری که خود به خود در یک سوش خالص موش ایجاد می‌شود، می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی در همان سوش تکثیر یابد. اما در سوش متمایز از نظر ژنتیکی تکثیر نمی‌یابد. تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی به زودی نشان داد که یک لوکوس اصلی منفرد مسئول این رفتار می‌باشد. به طور مشابه پیوند پوست سالم بین دو سوش از موش یکسان امکان‌پذیر بود. در صورتی که وقتی گیرنده زمینه ژنتیکی مجزایی داشت دیگر این امکان وجود نداشت. با این وجود، تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی رد پیوند، لوکوس اصلی منفردی را تعیین هویت کردند که رد یا قبول پیوند را که یک واکنش ایمنی است، کنترل می‌کند. همان طوریکه هم اکنون می‌دانیم تمام مهره‌دارانی که دارای سیستم ایمنی آداپتیو (سلولی) هستند ناحیه ژنتیکی دارند که با کمپلکس سازگاری نسجی اصلی مطابقت دارد و این ناحیه اولین بار در موش کشف شد.

مرحلهٔ مهم در کشف عملکرد MHC، تکثیر و تکامل موش‌های سوش کانژنیک[2] برای MHC بود. موش‌های کانژنیک به استثناء لوکوس یا ناحیه ژنتیکی خاص، از نظر ژنتیکی یکسان می‌باشند. شکل ۲۰-۲۴ به طور خلاصه بیان می‌کند که چگونه سوش‌های موشی کانژنیک برای MHC می‌توانند تولید شوند. موش‌های کانژنیک ابزاری ضروری جهت نسبت دادن عملکردهای ایمونولوژیکی و پیچیده به یک لوکوس ویژه مثل MHC می‌باشند. موش‌های کانژنیک ممکن است برای سایر لوکوس‌ها تولید شوند به شرطی که برای خصوصیات فنوتیپی ویژه‌ای در شکل یک نشانه (marker) آللی (به عنوان مثال رد پیوند در مورد MHC) انتخاب شوند.

در موش، ناحیه ژنتیکی که آنتی‌ژن‌های مسئول یک رد پیوند قوی را کد می‌کند، کمپلکس H-2 نامیده می‌شود (شکل ۲۱a-۲۴). خصوصیات اولیه MHC با ارزیابی پیچیدگی ژنتیکی این ناحیه پیگیری شد. بعد از یک نقشه‌برداری بزرگ با وسایل ژنتیکی استاندارد (نوترکیبی مابین ژن‌های MHC) توالی کامل تمام مولکول‌های MHC تعیین گردید. MHC پستانداران حاوی دوازده

1- Major Histocompatibility Complex

2- Congenic

ژن می‌باشد که بسیاری از پروتئین‌های مرتبط با فرایندهای ایمونولوژیکی را کد می‌کنند.

در انسان، کشف MHC متکی به ویژگی آنتی‌سرم‌های تولید شده در بیمارانی بود که تحت ترانسفوزیون مکرر خون بودند: آنتی‌ژن‌های موجود در سطح سلول‌های دهنده از نظر ژنتیکی یکسان نبودند و پاسخ ایمنی را در گیرنده تحریک می‌کردند. آنتی‌ژن‌های هدف بارزی که توسط این آنتی‌سرم‌ها شناخته شد به وسیله MHC انسانی کد می‌شوند و ناحیه ژنتیکی‌شان به عنوان کمپلکس HLA نامیده می‌شود (شکل ۲۱b-۲۴). اگرچه جزئیات سازماندهی و محتوی ژنتیکی MHC ما بین گونه‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد اما تمامی MHC مهره‌داران یک سری پروتئین‌هایی با تشابه بالا را کد می‌کنند.

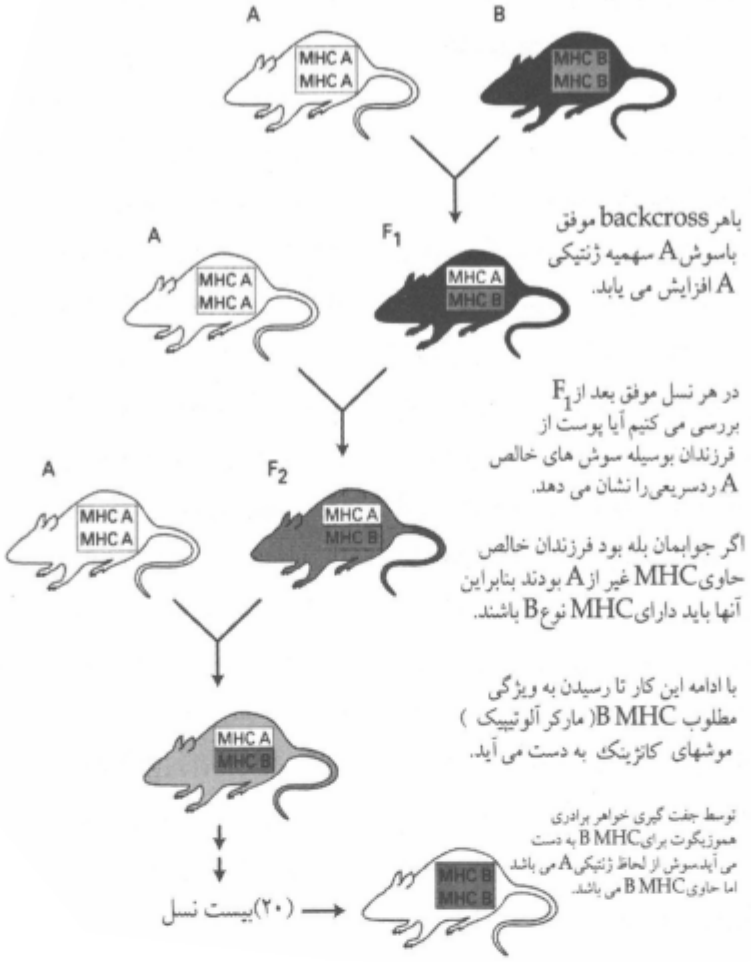
جنین انسان نیز ممکن است همانند یک پیوند در نظر گرفته شود. جنین تنها نیمی از ماده ژنتیکی خود را از مادر به ارث می‌برد و نیمی دیگر را از پدر دریافت می‌کند. آنتی‌ژن‌هایی که توسط نیمه پدری کد می‌شوند ممکن است به اندازه کافی از نیمه مادری متفاوت بوده و باعث تحریک پاسخ ایمنی مادر شوند. در دوران حاملگی، سلول‌های جنینی که به داخل گردش خون مادر وارد می‌شوند، سیستم ایمنی مادر را تحریک می‌کنند و منجر به ایجاد آنتی‌بادی بر علیه چنین آنتی‌ژن‌های والدی می‌شوند و آنتی‌بادی‌ها ساختارهای کد شده توسط MHC انسان را می‌شناسند. اما جنین از رد پیوند به خاطر ساختار تخصص یافته جفت که مانع از شروع پاسخ ایمنی مادر بر علیه بافت جنینی می‌شود جان سالم به در می‌برد.

فعالیت کشندگی سلول‌های T سیتوتوکسیک برای آنتی‌ژن اختصاصی و محدود به MHC می‌باشد

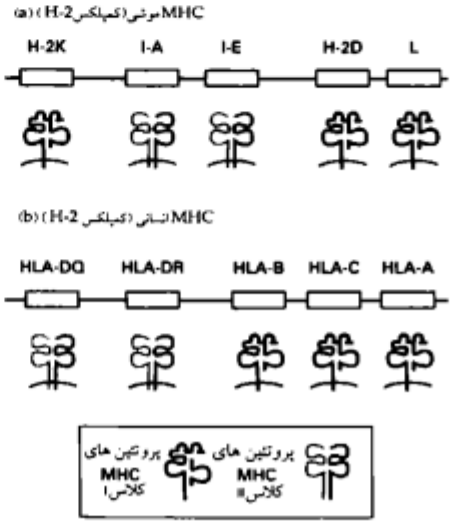
بی‌تردید عملکرد مولکول‌های MHC جلوگیری از تبادل پیوندهای جراحی نمی‌باشد. مولکول‌های MHC در شناسایی سلول‌های آلوده به ویروس توسط سلول‌های T سیتوتوکسیکی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. این سلول‌ها لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL) نیز نامیده می‌شوند. در سلول‌های آلوده به ویروس، مولکول‌های MHC با قطعات پروتئینی حاصل از پاتوژن‌های ویروسی میانکنش (واکنش) داده و همراه یکدیگر در سطح سلول عرضه می‌شوند. و با این عمل سلول‌های T سیتوتوکسیک که وظیفه حذف عفونت را بر عهده دارند می‌توانند آنها را مورد شناسایی قرار دهند.

موش‌هایی که از یک عفونت ویروسی خاص بهبودی حاصل کرده‌اند منبعی آماده از سلول‌های T سیتوتوکسیک را دارند که می‌توانند سلول‌های هدف آلوده با همان ویروس را شناسایی کرده و از بین ببرند. اندازه‌گیری آزاد شدن کرومیوم رادیواکتیو (^{51}Cr) می‌تواند جهت تشخیص حضور سلول‌های T سیتوتوکسیک در سوسپانسیون سلولی منفرد استفاده شود. این سوسپانسیون از طحال یک حیوان که از عفونت پاک شده، تهیه می‌گردد (شکل ۲۲a-۲۴). اگر سلول‌های T از موشی تهیه شود که به طور موفقیت‌آمیز از عفونت با ویروس آنفولانزا بهبود یافته، فعالیت سیتوتوکسیک بر علیه سلول‌های هدف آلوده به ویروس آنفولانزا مشاهده می‌شود. در حالی که این فعالیت در گروه کنترل آلوده نشده دیده نمی‌شود (شکل ۲۲b-۲۴). علاوه بر این، سلول‌های T سیتوتوکسیک اختصاصی ویروس آنفولانزا سلول‌های هدفی را که با ویروس‌های مختلف دیگر مثل ویروس استوماتیت وزیکولار آلوده شده از بین نمی‌برند. سلول‌های T سیتوتوکسیک حتی می‌توانند ما بین دو سوش کاملاً مرتبط، تمایز قایل شوند و چنین کاری را با دقت بسیار زیادی انجام می‌دهند. تفاوت در یک اسید آمینه در آنتی‌ژن ویروسی ممکن است برای گریز و از شناسایی شدن توسط سلول‌های T و کشته نشدن توسط آنها کافی باشد. چنین مشاهدات تجربی نشان می‌دهد که سلول‌های T سیتوتوکسیک کاملاً اختصاصی آنتی‌ژن می‌باشد و به سادگی برخی از خصوصیات مشترک بین تمام سلول‌های آلوده به ویروس را بدون توجه به خاصیت ویروسی، شناسایی نمی‌کنند.

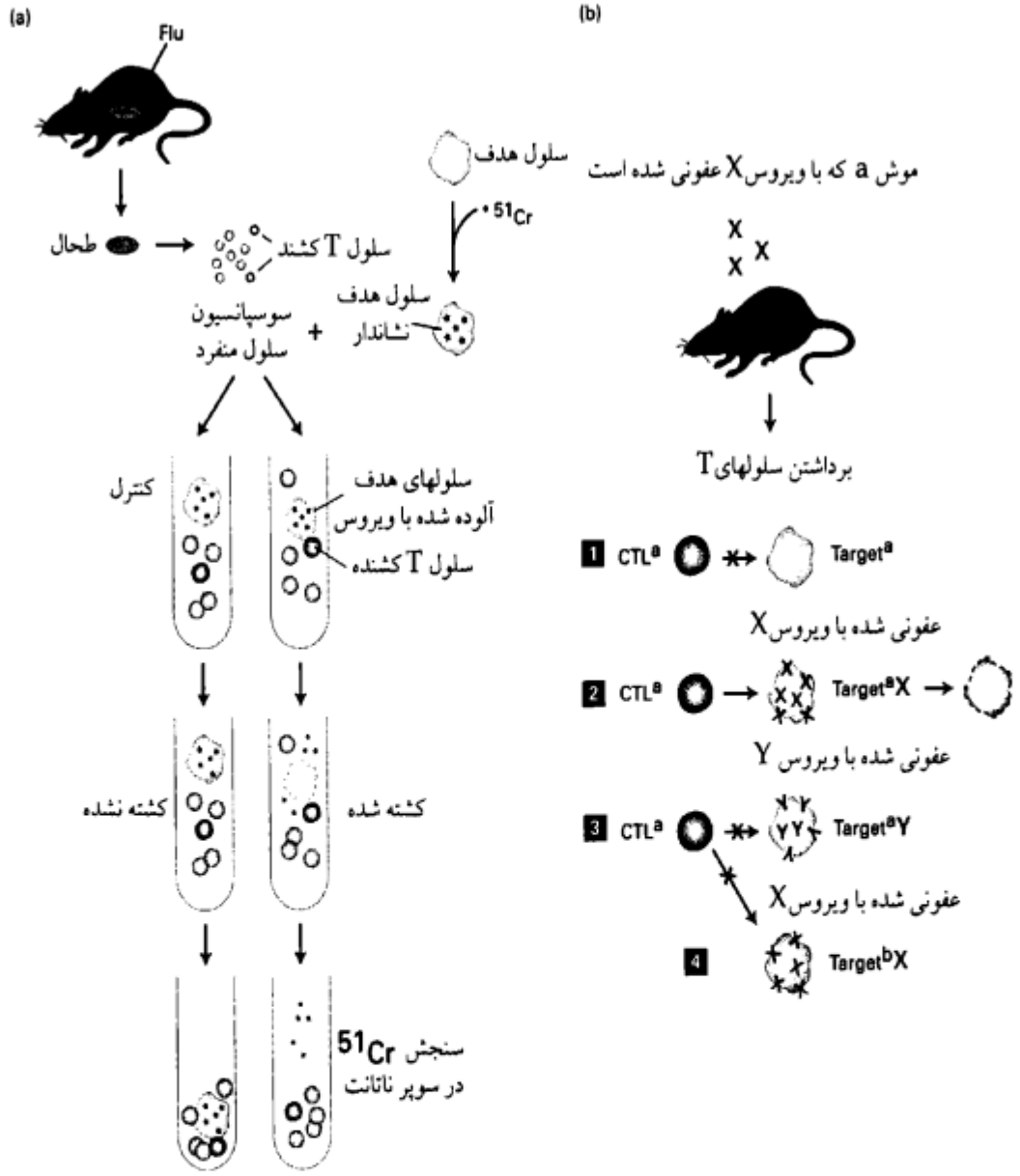
در این مثال، فرض بر این است که سلول‌های T حاصل از یک سوش ایمونیزه شده نسبت به آنفولانزا بر روی سلول‌های هدف آلوده به آنفولانزا که از همان سوش موش (موش a) مشتق شده سنجیده می‌شود. البته اگر سلول‌های هدف از یک سوش کاملاً غیر مرتبط (به عنوان مثال سوش B) با همان سوش آنفولانزا آلوده شوند و به عنوان هدف به کار برود سلول‌های T سیتوتوکسیک از موش A قادر نخواهد بود سلول‌های هدف موش B را نابود کند (شکل ۲۲-۲۴b مرحله ❸ و ❹). بنابراین تنها حضور آنتی‌ژن کافی نیست بلکه شناسایی توسط سلول‌های T سیتوتوکسیک به عوامل مختص سوش هم محدود می‌شود. به کارگیری موش‌های کانژنیک برای MHC ژن‌هایی که این عوامل محدودکننده را کد می‌کردند، به صورت MHC نشان داده شدند. بنابراین سلول‌های T سیتوتوکسیک از یک سوش ایمونیزه شده نسبت به آنفولانزا، سلول‌های هدف آلوده به آنفولانزا را از سوش‌های دیگر می‌کشند به شرطی که دو سوش از نظر MHC برای مولکول‌های MHC مورد نظر سازگار باشند. این پدیده به عنوان



▲ **شکل تجربی ۲۰-۲۴ موش کانژنیک برای کمپلکس سازگاری بافتی اصلی با آمیزش در سوش ناسازگار سنجی تولید می‌شوند.** سوش A و سوش B که پیوند همدیگر را رد می‌کنند از نظر MHC متفاوت می‌باشند و با یکدیگر نا سازگاری نسجی دارند. آمیزش دو سوش A و B (A×B) منجر به تولید F_1 می‌شود. (فرزندان نسل اول) که پیوند را از هر یک از سوش‌های والدی رد نمی‌کند. با آمیزش موش F_1 با یکی از سوش‌های والدی (برای مثال موش A) برای نسل‌های مکرر ماده ژنتیکی سوش A در فرزندان افزایش خواهد یافت و این آمیزش تا جایی انجام می‌پذیرد که فقط موش‌هایی که MHC سوش B را دارد تکامل یابند. حضور MHC B در موش را می‌توان با انجام یک پیوند پوست به موش سوش A، بررسی کرد. فقط زمانی که MHC موش از نوع MHC B باشد موش خالص سوش A پیوند را رد می‌کند. با انجام چنین آمیزش‌هایی و پیگیری MHC برای بیش از بیست نسل می‌توان سوش موش را تولید کرد که ضرورتاً ژنتیکاش A می‌باشد اما B MHC را نیز حفظ می‌کند که به چنین موش‌هایی موش کانژنیک برای MHC گفته می‌شود.



◀ **شکل ۲۱-۲۴ سازماندهی کمپلکس سازگاری نسجی اصلی در موش و انسان.** لوکوس‌های اصلی با دیاگرام شماتیک ترسیم شده‌اند که در زیر آنها پروتئین‌های کد شده توسط این لوکوس‌ها نشان داده شده است. پروتئین‌های MHC کلاس I از یک گلیکوپروتئین داخل غشایی که یک بار عرض غشا را طی کرده و توسط MHC کد می‌شود و نیز یک زیر واحد کوچک به نام β_2 میکروگلوبولین تشکیل یافته است. β_2 میکروگلوبولین پیوند غیرکووالانی با گلیکوپروتئین داخل غشایی دارد و نیز توسط MHC کد نشده و متصل به غشاء نمی‌باشد. پروتئین‌های MHC کلاس II از دو گلیکوپروتئین داخل غشایی که عرض غشا را یک باره طی می‌کنند و غیر مشابه می‌باشند تشکیل شده که هر دو توسط MHC کد می‌شوند.



▲ **شکل تجربی ۲۲-۲۴ سنجش آزاد شدن کرومیوم اثبات مستقیم سیتوتوکسیسیتی و اختصاصیت سلول‌های T سیتوتوکسیک را در یک جمعیت سلولی ناهمگون فراهم می‌آورد.** سوسپانسیون سلول‌های طحالی که حاوی T سیتوتوکسیک (کشنده) هستند از موش‌هایی که در معرض یک ویروس خاص مثل ویروس آنفولانزا قرار گرفته‌اند، و سپس عفونت از بین رفته است، تهیه می‌شوند. سلول‌های هدف بدست آمده از همان موش را با ویروس مشابه آلوده می‌کنند و برای استفاده به عنوان کنترل، آلوده نمی‌کنند. بعد از آلودگی (عفونت)، پروتئین‌های سلولی بطور غیراختصاصی توسط انکوباسیون سوسپانسیون سلولی هدف با کرومیوم(^{51}Cr) نشان دار می‌شوند. بعد از انکوباسیون سلول‌های هدف نشان‌دار شده با ماده رادیواکتیو با سوسپانسیون سلول‌های T، کشته شدن سلول‌های هدف منجر به رهایی پروتئین‌های نشان دار با ^{51}Cr می‌شود. سلول‌های هدف آلوده نشده کشته نمی‌شوند و محتویات رادیواکتیوشان را حفظ می‌کنند. در نتیجه لیز سلول‌ها توسط سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌تواند به آسانی شناسایی شده و توسط سنجش رادیواکتیویته آزاد از داخل سوپرناتانت مشخص می‌شود. (b) لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTLs) حاصل از موش‌های آلوده با ویروس X می‌توانند بر علیه سلول‌های هدف مختلف آزمایش شوند تا این که اختصاصیت کشندگی با واسطه CTL مشخص شود. CTL هایی که قادر به لیز سلول‌های هدف آلوده با ویروس (❷) X هستند نمی‌توانند سلول‌های غیر آلوده (❶) یا سلول‌هایی که با یک ویروس متفاوت مثل Y آلوده شده‌اند (❸) را نابود کنند. وقتی این CTL ها بر روی سلول‌های هدف آلوده به ویروس X آزمایش می‌شوند که این سلول‌ها از سوش گرفته شده که حاوی یک نوع MHC متفاوت (تیپ b) هستند. (b)، دوباره هیچ کشندگی مشاهده نمی‌شود (❹). بنابراین فعالیت سیتوتوکسیک سلول‌های T اختصاصی ویروس و محدود به MHC می‌باشد.

محدودیت MHC[1] شناخته می‌شود.

فعالیت کشندگی سلول‌های T سیتوتوکسیک برای آنتی‌ژن اختصاصی و محدود به MHC می‌باشد

سلول‌های T با خصوصیات عملکردی با دو کلاس مجزا از مولکول‌های MHC آموزش می‌بینند.

MHC دو نوع گلیکوپروتئین ضروری برای عمل شناسایی در فرآیند ایمنی می‌سازد که به طور معمول مولکول‌های MHC کلاس I و II نامیده می‌شوند. مقایسه نقشه‌های ژنتیکی MHC انسان و موش، حضور چندین ژن کلاس I و چندین ژن کلاس II را نشان می‌دهد. با این حال آرایش ژنی آنها تفاوت‌هایی را مابین گونه‌های مختلف نشان می‌دهد (شکل ۲۱-۲۴). علاوه بر مولکول‌های MHC کلاس I و II، اجزای کلیدی پردازش و عرضه آنتی‌ژن را کد می‌کند. بالاخره MHC مهره‌داران همچنین اجزای کلیدی آبشار کمپلمان را کد می‌کند. مولکول‌های MHC کلاس I و II توسط جمعیت متفاوتی از سلول‌های سیستم ایمنی شناسایی شده و بنابراین وظایف مختلفی را به کار می‌برند.

همان گونه که در آزمایشات انجام شده در شکل ۲۴-۲۲ خلاصه شده، واضح است که سلول‌های T سیتوتوکسیک در شناخت اهدافشان، توسط مولکول‌های MHC آموزش می‌بینند. چنین سلول‌های T اغلب از مولکول‌های MHC کلاس I به عنوان عوامل محدودکننده‌شان استفاده کرده و همچنین با حضور مارکر گلیکوپروتئین CD8 روی سطح خود مشخص می‌شوند. اکثریت اما نه همه سلول‌های هسته‌دار به صورت دایمی مولکول‌های MHC کلاس I را بیان کرده و می‌توانند به همانندسازی ویروس کمک کنند. سلول‌های T سیتوتوکسیک سلول‌های آلوده را از طریق بیان مولکول‌های MHC کلاس I که آنتی‌ژن مشتق از ویروس را عرضه می‌کنند شناسایی و از بین می‌برند.

همان گونه که قبلاً ذکر شد، سلول‌های B بدون کمک مجموعه دیگری از سلول‌های T، سلول‌های T یاریگر (یا سلول‌های T کمک‌کننده) دستخوش تمایز نهایی به سلول‌های پلاسمای ترشح‌کننده آنتی‌بادی نمی‌شوند. سلول‌های T در سطح خود مارکر گلیکوپروتئین CD4 را بیان کرده و از مولکول‌های MHC کلاس II به عنوان عوامل محدودکننده استفاده می‌کنند. بیان دائمی مولکول‌های MHC کلاس II، اصطلاحاً به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای[2] که شامل سلول‌های B، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژ هستند محدود می‌شوند. (چندین نوع سلول دیگر، تعدادی در اپی‌تلیوم می‌توانند جهت بیان مولکول‌های MHC کلاس I القا می‌شوند. ما در اینجا بحث نمی‌کنیم). بنابراین دو گروه اصلی لنفوسیت‌های T متمایز از لحاظ عملکرد (سلول‌های T سایتوتوکسیک و سلول‌های T کمکی) می‌توانند بر اساس الگوی مخصوص پروتئین‌های غشایی که در سطح سلول نشان می‌دهند و توسط مولکول‌های MHC که به عنوان محدودیت مورد استفاده قرار می‌گیرند از همدیگر تشخیص داده شوند.

- سلول‌های T سایتوتوکسیک: مارکر CD8؛ محدود به MHC کلاس I.
- سلول‌های T کمکی: مارکر CD4؛ محدود به MHC کلاس II.

CD4 و CD8 هر دو متعلق به پروتئین‌های ابرخانواده ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشند که همه دارای یک یا مقدار بیشتری از دُمین‌های ایمونوگلوبولین می‌باشند. گیرنده‌های سلول‌های B و سلول‌های T، گیرنده پلی‌مریک IgA و بسیاری از مولکول‌های چسبندگی سلولی (فصل ۱۹) نیز متعلق به ابرخانواده ایمونوگلبولینی می‌باشند. اساس مولکولی ارتباط دقیق ما بین CD8 و به کارگیری مولکول‌های MHC کلاس I و یا مابین بیان CD4 و استفاده از مولکول‌های MHC کلاس II به عنوان عناصر محدودکننده، از روی ساختار و شکل مولکول‌های MHC که توصیف شدند آشکار می‌شود.

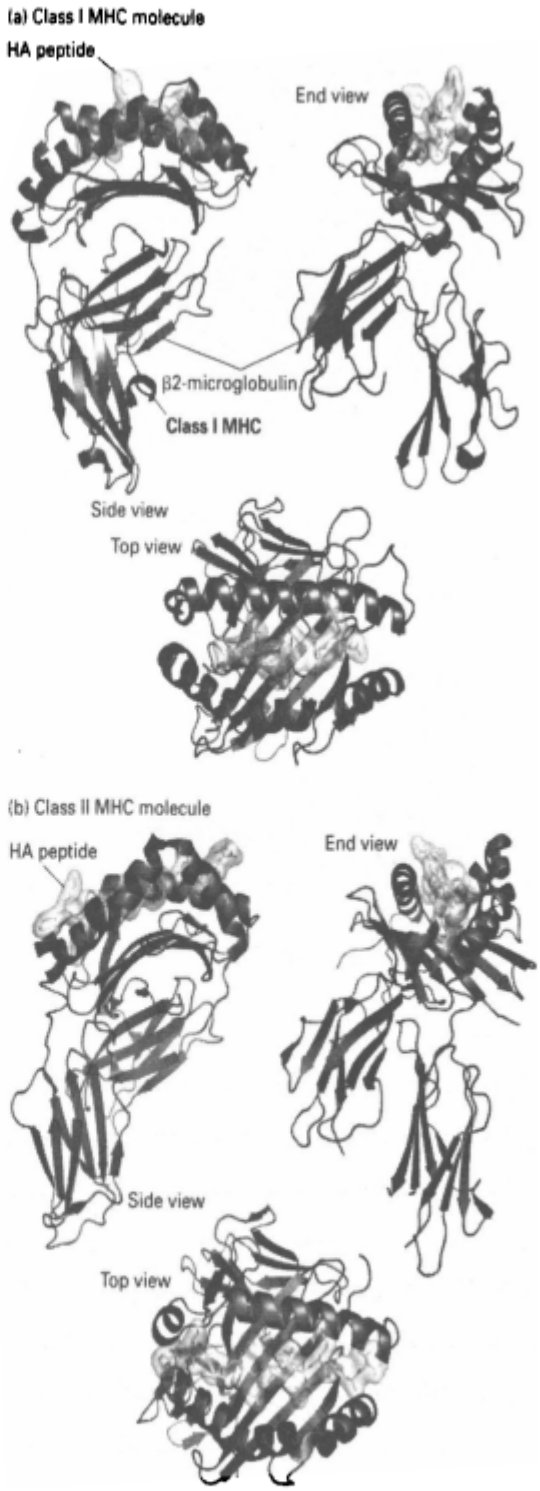
مولکول‌های MHC به آنتی‌ژنهای پپتیدی متصل شده و با سلول‌های T واکنش نشان می‌دهند

مولکول‌های MHC کلاس I و II هر دو پلی‌مورفیسم بالایی دارند. به این معنی که انواع فراوانی از آلل‌ها ما بین افراد گونه‌های مشابه وجود دارد. هر دو مولکول‌های MHC همچنین از نظر ساختاری مثل واکنش با پپتیدها و گیرنده‌های سلول‌های T مشابه هستند (شکل ۲۳-۲۴).

مولکول‌های MHC کلاس I: مولکول‌های MHC کلاس I متعلق به ابرخانواده ایمونوگلوبولینی بوده و شامل دو پلی پپتید می‌باشند. زیر واحد بزرگتر یک گلیکوپروتئین غشایی تیپ I می‌باشد (شکل ۱۳-۱۰) که توسط MHC کد می‌شود. زیر واحد کوچک‌تر، β_2 میکروگلوبولین توسط MHC کد نمی‌شود و با ساختار ایمونوگلوبولینی آزاد شباهت دارد. در ابتدا از لکوسیت‌های انسانی با هضم توسط

1- MHC Restriction

2- Professional antigen - presenting cells



◀شکل ۲۳-۲۴ ساختار سه بعدی مولکول‌های MHC کلاس I و II. این تصویر ساختار یک مولکول MHC کلاس I متصل شده به پپتید که توسط کریستالوگرافی با اشعه X تعیین گردیده را نشان می‌دهد. بخشی از پروتئین مولکول MHC کلاس I که به پپتید متصل می‌شوند متشکل از یک صفحه β می‌باشد که از هشت رشته β که مابین دو رشته α قرار گرفته تشکیل شده است. شکاف اتصالی پپتید کاملاً از زیرواحد بزرگ محدود شونده توسط MHC تشکیل یافته و این زیر واحد به صورت غیرکووالانی با زیر واحد کوچک (β_2 میکروگلوبولین) که در جایی غیر از MHC کد می‌شوند ارتباط دارد. (b) مولکول‌های MHC کلاس II مشابه مولکول‌های کلاس I ولی با چندین تفاوت مهم می‌باشند. هر دو زیر واحد α و β مولکول‌های MHC کلاس II توسط MHC کد می‌شوند و هر دو در تشکیل شکاف اتصالی به پپتید نقش دارند. شکاف اتصالی پپتید مولکول‌های MHC کلاس II، محدوده وسیع‌تری از اندازه‌های پپتیدی را نسبت به مولکول‌های MHC کلاس I در خود جای می‌دهد.

پاپائین خالص شد که قسمت خارج سلولی مولکولهای MHC کلاس I را به شکل دست نخورده آزاد می‌کند و این پروتئین‌ها امروزه توسط روشهای تکنولوژی DNA نوترکیب تولید شده و ابزاری مهم برای تشخیص سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژنی شده‌اند. در متن اشاره شد که مولکول‌های MHC به علت تفاوت‌های ساختاری‌شان، اهداف رد پیوند هستند که این مسئله ناشی از تنوع‌های اثر (پلی‌مورفیسم ژنتیکی) است. اگر سیستم ایمنی گیرنده قادر به شناسایی اشکال منحصر به فرد مولکول‌های MHC دهنده پیوند باشد، پیوند را رد می‌کند. در حقیقت، ژن‌های کد شونده توسط MHC، جزء پلی‌مورفیک‌ترین ژن‌هایی هستند که اخیراً بیش از ۲۰۰۰ محصول آللی مجزا از آنها در انسان شناسایی شده است. مولکول‌های MHC کلاس I در انسان توسط لوکوس HLA-A، HLA-B و HLA-C کد می‌شوند (شکل ۲۱-۲۴). هر آلل ویژه توسط یک پسوند عددی برای هر لوکوس خاص شناخته می‌شود. (برای مثال HLA-A2 و HLA-A28 دو محصول مجزا از HLA-A را نشان می‌دهند). در موش، مولکول‌های MHC کلاس I، توسط لوکوسهای H-2K و H-2D کد می‌شوند. یک علامت در بالا برای شناسایی محصولات آللی استفاده می‌شود (برای مثال $H\text{-}2K^b$ و $H\text{-}2K^k$ دو سویه آللی از محصول لوکوس H-2K را نشان می‌دهد).

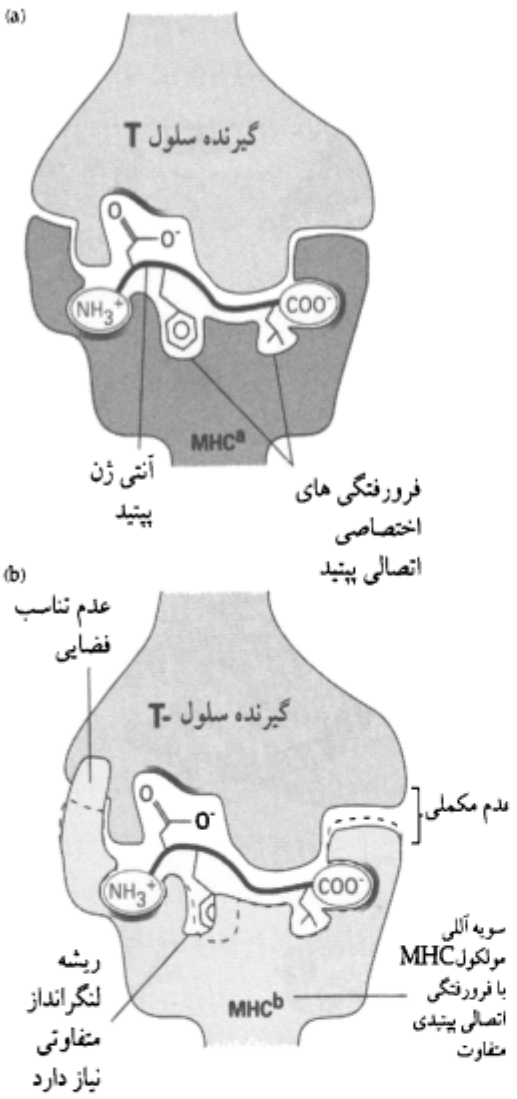
ساختار سه بعدی مولکوهای MHC کلاس I، دو دُمین شبه ایمونوگلبولین نزدیک غشایی را نشان می‌دهد. این دُمین‌ها ساختار صفحه بتای چین‌دار متشکل از هشت رشته را که دارای دو هلیکس α نیز در بالای خود می‌باشند، حمایت و حفظ می‌کنند. صفحه بتا و هلیکس‌ها با کمک همدیگر اشکالی را بوجود می‌آورند که از هر دو انتها بسته بوده و مکانی می‌باشد که پپتید به آن متصل می‌شود. (شکل ۲۳a-۲۴). الگوی اتصال پپتید توسط مولکول MHC کلاس I به پپتیدی با طول نسبتاً ثابت معمولاً ۱۰-۸ اسید آمینه، نیاز دارد به طوری که انتهای پپتید بتواند درون فرورفتگی‌هایی جای بگیرد که

برای گروه‌های کربوکسیل و آمین باردار موجود در انتها متناسب می‌باشند. به این ترتیب پپتید به وسیله مقدار کمی از زنجیره‌های جانبی اسیدآمینه به درون شکاف اتصال پپتید لنگر می‌اندازد و هر یک از این زنجیره‌های جانبی برای یک فرورفتگی در مولکول MHC متناسب می‌باشند و منجر می‌شود هر یک از اسید آمینه‌های ویژه در داخل فرورفتگی به دقت جای بگیرد (شکل ۲۴a-۲۴). روی هم رفته، دو فرورفتگی اختصاصی در MHC باید به صورت صحیحی اشغال شود تا منجر به اتصال پایدار پپتید شود. یکی از این فرورفتگی‌ها اغلب با ریشه C ترمینال پپتید و فرورفتگی اختصاصی دوم با ریشه اسید آمینه مرکزی‌تر پپتید اشغال می‌شود. در این روش، مولکول‌های MHC مذکور می‌توانند تعداد زیادی پپتید با توالی متنوع و گوناگون را در خود جای دهند به شرطی که نیازهای لنگراندازی برآورده شود.

ریشه‌های پلی‌مورفیک که یک آلل MHC را از دیگری تشخیص می‌دهند، غالباً داخل و اطراف شکاف اتصالی پپتید قرار گرفته‌اند. بنابراین ریشه‌ها، آرایش فرورفتگی‌های اتصالی و پپتید و در نتیجه اختصاصیت اتصالی پپتید را تعیین می‌کنند. به این ترتیب ریشه‌های پلی‌مورفیک بر سطح مولکول MHC و در نتیجه نقاط تماس با گیرنده سلول T تأثیر می‌گذارند. یک گیرنده سلول T به گونه‌ای طراحی شده است که با یک آلل خاصی از MHC کلاس I واکنش می‌دهد و لزوماً با مولکول‌های MHC غیر مرتبط به علت آرایش سطحی متفاوت‌شان واکنش نمی‌دهد (شکل ۲۴b-۲۴). مارکر CD8 به عنوان یک کمک گیرنده عمل می‌کند که به قسمت‌های محافظت شده‌ای از مولکول‌های MHC کلاس I متصل می‌شود. بنابراین CD8، محدودیت اختصاصی هر سلول T بالغ $CD8^+$ را تنظیم می‌کند.

مولکول‌های MHC کلاس II: هر دو زیر واحد (α و β) مولکول‌های MHC کلاس II گلیکوپروتئین غشای تیپ I بوده و به ابرخانواده ایمونوگلوبولین تعلق دارند. MHC پستانداران حاوی چندین لوکوس می‌باشد که مولکول‌های MHC کلاس II را کد می‌کنند (شکل ۲۱-۲۴). همانند زیر واحد بزرگ ملکول کلاس I، هر دو زیر واحد α و β مولکول کلاس II، پلی‌مورفیسم ژنتیکی نشان می‌دهند.

اساس طرح سه بعدی مولکول‌های MHC کلاس II همانند مولکول‌های MHC کلاس I می‌باشد. دو دُمین شبه ایمونوگلوبولینی نزدیک غشایی شکاف اتصالی پپتید را که متشکل از یک صفحه بتای هشت رشته‌ای و دو α هلیکس می‌باشد، حمایت می‌کند (شکل ۲۳a-۲۴). در مورد مولکول‌های MHC کلاس II زیر واحدهای α و



▲ **شکل ۲۴-۲۴ اتصال پپتید و محدودیت MHC.** (a) پپتیدهایی که به مولکول‌های MHC کلاس I متصل می‌شوند، ریشه‌هایی به طول متوسط ۱۰-۸ اسید آمینه بوده و نیاز به جایگزینی مناسب هر دو انتهایشان دارند و حاوی دو یا سه ریشه محافظت شده می‌باشند (ریشه‌های لنگری). موقعیتی در مولکول‌های کلاس I که موجب تمایز یک آلل از دیگری می‌شود (ریشه‌های پلی‌مورفیک) در داخل و اطراف شکاف اتصالی پپتیدی قرار دارند. ریشه‌های پلی‌مورفیک مولکول‌های MHC بر روی اختصاصیت اتصال پپتید و میان‌کنش با گیرنده‌های سلول‌های T، به جور شدن مناسب ما بین گیرنده، پپتید و مولکول MHC نیاز دارد. (b) عدم تناسب فضایی و فقدان حالت مکملی ما بین ریشه‌های لنگرانداز و مولکول‌های MHC از اتصال صحیح جلوگیری می‌کند. در نتیجه سلول T به محصولات MHC - پپتیداختصاصی محدود شده‌اند.

β بطور یکسان در ساختار شکاف اتصالی پپتید نقش دارند. این شکاف از هر دو انتها باز بوده و در نتیجه اتصال پپتیدهای طولانی‌تر را که از

آن بیرون زده حمایت می‌کند. الگوی اتصالی پپتید شامل فرورفتگی‌هایی است که زنجیره جانبی پپتید خاصی را در خود جای داده است. همچنین تماس ما بین زنجیره‌های جانبی مولکول MHC با اتم‌های زنجیره اصلی پپتید باند شده را فراهم می‌آورد. پلی‌مورفیسم MHC کلاس II اساساً از ریشه‌های اسید آمینه‌ای داخل و اطراف شکاف اتصالی پپتید تأثیر می‌گیرد به طوری که اختصاصیت اتصالی پپتید معمولاً ما بین محصولات آللی مختلف متفاوت است. گیرنده سلول‌های T که جهت میانکنش با مولکول MHC کلاس II طراحی شده، معمولاً با مولکول آللی دیگری واکنش نمی‌دهد. نه تنها به خاطر تفاوت‌هایی در ویژگی اتصالی پپتید مولکول‌های آللی، بلکه همچنین به خاطر پلی‌مورفیسم‌هایی که بر تماس ریشه‌های اسید آمینه‌ای با گیرنده سلول T تأثیر می‌گذارند. همان طوریکه در زیر بحث شده، مولکول‌های MHC تکامل می‌یابند تا غالباً پپتیدهای تولید شده در اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها را عرضه نمایند. میانکنش ما بین پپتید و مولکول‌های MHC کلاس II در این ارگان‌ها اتفاق می‌افتد و مولکول‌های MHC کلاس II بعد از سنتز در شبکهٔ آندوپلاسمی به طور اختصاصی به طرف چنین جایگاه‌هایی جهت‌گیری می‌کنند.

این جهت‌گیری توسط چاپرونی به نام زنجیره ثابت که یک نوع گلیکوپروتئین غشای II است انجام می‌گیرد (شکل ۱۰-۴). زنجیرهٔ ثابت (Ii) نقش کلیدی در مراحل اولیه بیوسنتز MHC کلاس II ایفا می‌کند به این صورت که در محل تجمع هترودایمر $\alpha\beta$، مولکول‌های MHC کلاس II یک ساختار تری‌مری تشکیل می‌دهد. در نتیجه، محصول تجمع یافته نهایی شامل نه پلی پپتید است: $(\alpha\beta Ii)_3$ میانکنش ما بین Ii و هترودایمر $\alpha\beta$ شامل بخشی از Ii به نام قطعهٔ CLIP می‌باشد که شکاف اتصالی پپتید مولکول کلاس II را اشغال می‌کند. به محض این که کمپلکس $(\alpha\beta Ii)_3$ تجمع یافت، کمپلکس وارد مسیر ترشحی شده و به طرف اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها در شبکه ترانس گلژی تغییر مسیر می‌دهد (شکل ۱-۱۴). پیام‌هایی که مسئول این تغییر مسیر هستند توسط دم سیتوپلاسمی Ii صادر شده و ظاهراً با جهت‌گیری اندوزومی یا پیام‌های جبرانی که معمولاً در پروتئین‌های غشایی لیزوزومی یافت می‌شوند، سازگار نیستند. بعضی از کمپلکس‌های $(\alpha\beta Ii)_3$ مستقیماً به سطح سلول می‌روند و در نتیجه دوباره به درون سلول باز می‌گردند اما اکثریت آنها به لیزوزوم انتهایی می‌روند.

همان طوری که برای مولکول‌های MHC کلاس I و کمک گیرنده مربوطه آنها CD8 دیدیم، کمک گیرنده CD4 اشکال محافظت شده‌ای از مولکول‌های MHC کلاس II را می‌شناسند. هر سلول T بالغی که دارای کمک گیرنده CD4 باشد از مولکول‌های MHC کلاس II برای شناسایی آنتی‌ژن استفاده می‌کند.

عرضه آنتی‌ژنی فرایندی است که قطعات پروتئینی با محصولات MHC کمپلکس شده و به سطح سلول فرستاده می‌شود

پردازش مواد خارجی که وارد سیستم ایمنی می‌شوند مرحله کلیدی است که نتیجه نهایی یک پاسخ را تعیین می‌کند. پاسخ ایمنی آداپتیو موفق که شامل تولید آنتی‌بادی و تولید سلول‌های T سیتو توکسیک و یاریگر است نمی‌تواند بدون دخالت سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن صورت گیرد. سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن شامل سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها که هر دو از مغز استخوان منشأ گرفته‌اند و سلول‌های B می‌باشد. چنین سلول‌هایی آنتی‌ژن را کسب کرده و بعد از پردازش آن را به شکلی که بتواند توسط سلول‌های T شناسایی شود عرضه می‌کنند. مسیری که در آن آنتی‌ژن به شکل مناسب جهت شناسایی سلول‌های T تبدیل شود «**پردازش و عرضه آنتی‌ژن**»[1] نامیده می‌شود.

مسیر MHC کلاس I غالباً به عرضه پروتئین هایی که توسط خود سلول سنتز می‌شوند می‌پردازد و مسیر MHC کلاس II به عرضه آنتی‌ژن هایی که از بیرون کسب می‌کنند می‌پردازد. به هر حال این تفاوت به هیچ وجه دقیق نیست. در کل، مسیر کلاس I و کلاس II عرضه و پردازش آنتی‌ژن، از تمام اجزایی که برای عرضه پاتوژن نیاز است تا بررسی به عمل آید، نمونه برداری می‌کند.

پردازش و عرضه آنتی‌ژن در هر دو مسیر کلاس I و II ممکن است به شش مرحله مجزا تقسیم شود که در مقایسه دو مسیر مفید می‌باشند. (۱) کسب آنتی‌ژن، (۲) برچسب خوردن آنتی‌ژن جهت تخریب، (۳) پروتئولیز، (۴) تحویل پپتیدها به مولکول‌های MHC، (۵) اتصال پپتید به مولکول MHC، (۶) عرضه مولکول‌های MHC حامل پپتید بر روی سطح سلول. در دو بخش بعدی جزئیات مولکول هر دو سیستم را شرح می‌دهیم.

مسیر MHC کلاس I آنتی‌ژن‌های سیتوزولی را عرضه می‌کند

شکل ۲۵-۲۴ شش مرحله را در مسیر MHC کلاس I با آوردن مثالی از سلول‌های آلوده به ویروس خلاصه می‌کند. بحث زیر

1- Antigen processing and presentation

حوادثی را که در طول هر مرحله اتفاق می‌افتد توضیح می‌دهد.

(❶) کسب آنتی‌ژن: در مورد یک عفونت ویروسی، معمولاً کسب آنتی‌ژن مترادف با حالت عفونی است. ویروس‌ها به کمک سیستم‌های سنتز پروتئین میزبان برای تولید قطعات ساختمان ذرات عفونی ویروسی (virion) متکی هستند که شامل سنتز پروتئین‌های سیتوزولی و غشایی ویروسی می‌باشد. برخلاف همانندسازی DNA، ترمیم پروتئین یک فرایند مستعد خطا است به طوری که ۳۰-۱۰٪ زنجیره‌های پلی پپتیدی تازه ساخته شده به صورت نا بالغ خاتمه می‌یابند یا متحمل خطاهای دیگری می‌شوند. (اتصال اشتباه اسید آمینه، تغییر قابل خواندن، تا خوردگی به تأخیرافتاده نادرست). این اشتباهات سنتز پروتئین هم بر روی پروتئین‌های خود سلول میزبان و هم بر روی آن پروتئین‌هایی که توسط ژنوم ویروسی تعیین می‌شوند تأثیر می‌گذارند. چنین پروتئین‌های حاوی خطا باید سریعاً حذف شوند تا منجر به مسدود شدن سیتوپلاسم نشوند و از واکنش‌های نا خواسته با پروتئین‌های مشابه جلوگیری به عمل آید. این پروتئین‌های سریعاً تجزیه شونده منبع مهمی از پپتیدهای آنتی‌ژنی هستند که برای عرضه توسط MHC کلاس I اختصاص یافته‌اند. به استثنای عرضه متقاطع[۱]، مسیر MHC کلاس I منجر به تشکیل کمپلکس‌های پپتید ـ MHC می‌شود که پپتیدها از پروتئین‌های سنتز شده توسط خود سلول‌های حاصل MHC کلاس I مشتق می‌شوند.

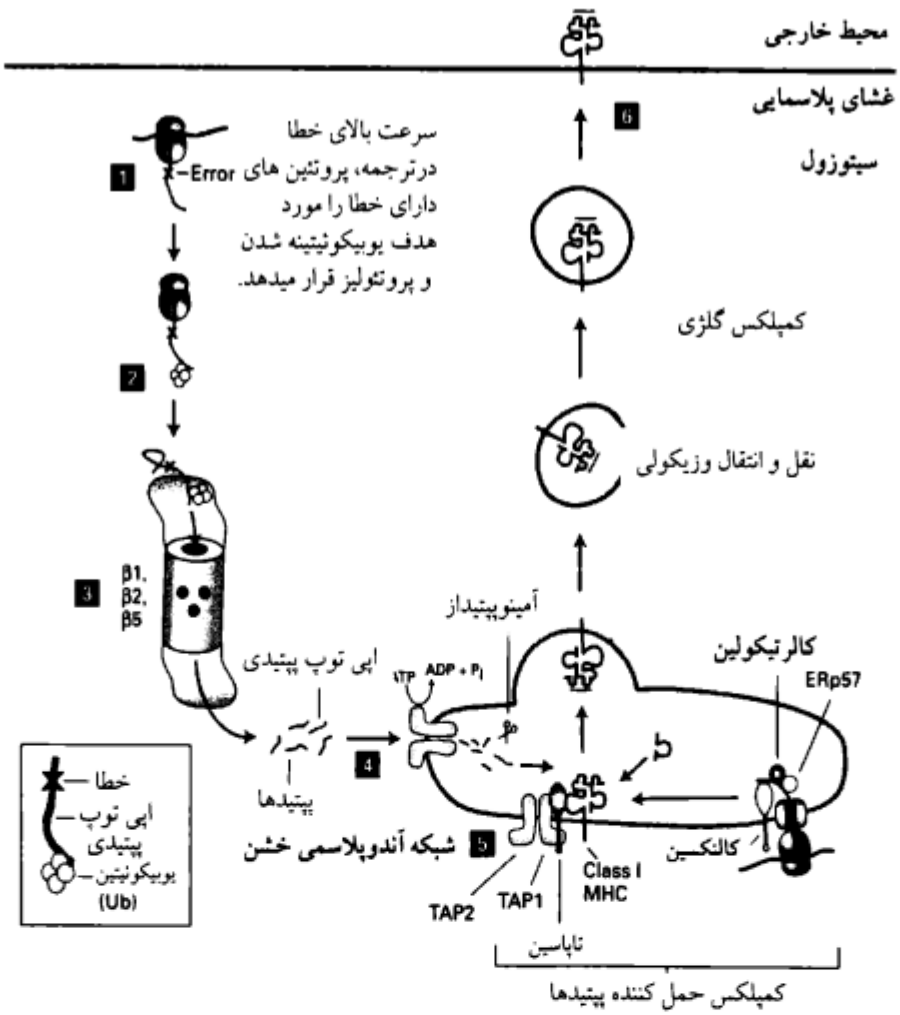
(❷) برچسب خوردن آنتی‌ژن جهت تخریب: در اغلب موارد سیستم کونژوگاسیون یوبی‌کوئیتینی مسئول برچسب زدن به یک پروتئین جهت تخریب است (فصل ۳). اتصال یوبی کوئیتین به طور دقیقی تنظیم می‌شود.

(❸) **پروتئولیز:** پروتئین‌های متصل شده به یوبی کوئیتین توسط پروتئولیز پروتئازومی تخریب می‌شوند. پروتئازوم، پروتئازی با قدرت پردازش بالا است که به سوبسترایش حمله کرده و بدون رهایی میانجی‌ها هضم نهایی محصولات پپتیدی در اندازه ۲۰-۳۰ اسید آمینه را فراهم می‌آورد. در طول یک پاسخ التهابی و در پاسخ به اینترفرون γ، سه فاز زیر واحد β فعال از نظر کاتالیتیک ($\beta5$، $\beta2$ و $\beta1$) می‌توانند توسط زیر واحدهای اختصاص ایمنی شامل $\beta1i$ و $\beta2i$ و $\beta5i$ جایگزین شوند. زیرواحدهای $\beta1i$، $\beta2i$ و $\beta5i$ در MHC کد می‌شوند. نتیجه بدست آمده از این جایگزینی تولید ایمونوپروتئازوم[۲] است، محصولی که با اجزای لازم برای اتصال پپتید به مولکول‌های MHC کلاس I رقابت می‌کند. ایمونو پروتئازوم طول متوسط پپتیدهای تولید شده و نیز محل‌هایی که شکاف اتفاق می‌افتد را تنظیم می‌کند. با توجه به نقش محوری پروتئازوم در تولید پپتیدهایی که توسط مولکول‌های MHC کلاس I عرضه می‌شوند مهارکننده‌های پروتئازوم به نحو مؤثری با پردازش آنتی‌ژن از طریق مسیر MHC کلاس I مداخله می‌کنند.

(❹) **تحویل پپتیدها به مولکول‌های کلاس I:** سنتز پروتئین، اتصال یوبی کوئیتین و پروتئولیز پروتئازوم همه در سیتوپلاسم رخ می‌دهد، در حالی که اتصال پپتید به مولکول های MHC کلاس I در لومن شبکهٔ آندوپلاسمی (ER) صورت می‌گیرد. بنابراین پپتیدها باید از غشای شبکهٔ آندوپلاسمی عبور کنند تا به مولکولهای MHC کلاس I دسترسی پیدا کنند. این فرآیند توسط کمپلکس هترودایمر TAP که عضوی از ابرخانواده ABC پمپ‌های تقویت شده با ATP می‌باشد، میانجیگری می‌شود (شکل ۱۴-۱۱). کمپلکس TAP، پپتیدها را به روی سطح سیتوپلاسمی متصل کرده و توسط چرخه‌ای که شامل اتصال و هیدرولیز ATP می‌باشد پپتیدها را به داخل شبکه آندوپلاسمی (ER) جابجا می‌کند. اختصاصیت کمپلکس TAP به صورتی می‌باشد که می‌تواند تنها زیر مجموعه خاصی از همه پپتیدهای سیتوزولی که غالباً دارای ۱۰-۵ اسید آمینه هستند را جابجا کند. کمپلکس TAP موش اولویت مشخصی برای پپتیدهایی که به لوسین، والین، ایزولوسین، یا ریشه‌های متیونین ختم می‌شوند نشان می‌دهد که با اولویت اتصالی مولکول‌های MHC که توسط کمپلکس TAP به کار می‌روند رقابت می‌کنند. ژن‌هایی که زیر واحدهای TAP1 و TAP2 را کد می‌کنند در MHC واقع شده‌اند.

(❺) **اتصال پپتیدها به مولکول‌های کلاس I:** در داخل ER، مولکول‌های MHC کلاس I که تازه سنتز شده‌اند قسمتی از یک کمپلکس چند گانه پروتئینی هستند که به عنوان کمپلکس حامل پپتید مطرح می‌شود. این کمپلکس حاوی دو چاپرون[۳] (کالنکسین[۴] و کالرتیکولین[۵]) و اکسیدوردوکتاز Erp57 می‌باشد. چاپرون دیگری به نام تاپاسین[۶] هم با کمپلکس TAP و هم با مولکول MHC کلاس I به منظور دریافت پپتید واکنش نشان می‌دهند. تماس فیزیکی TAP و مولکول MHC کلاس I توسط تاپاسین برقرار می‌شود. به محض این که انتقال پپتید اتفاق افتاد یک تغییر ساختار فضایی موجب آزاد شدن مولکول‌های کلاس I حامل

1- Cross-presentation
2- Immuoproteasome
3- Chaperone
4- Calnexin
5- Calerticulin
6- Tapasin

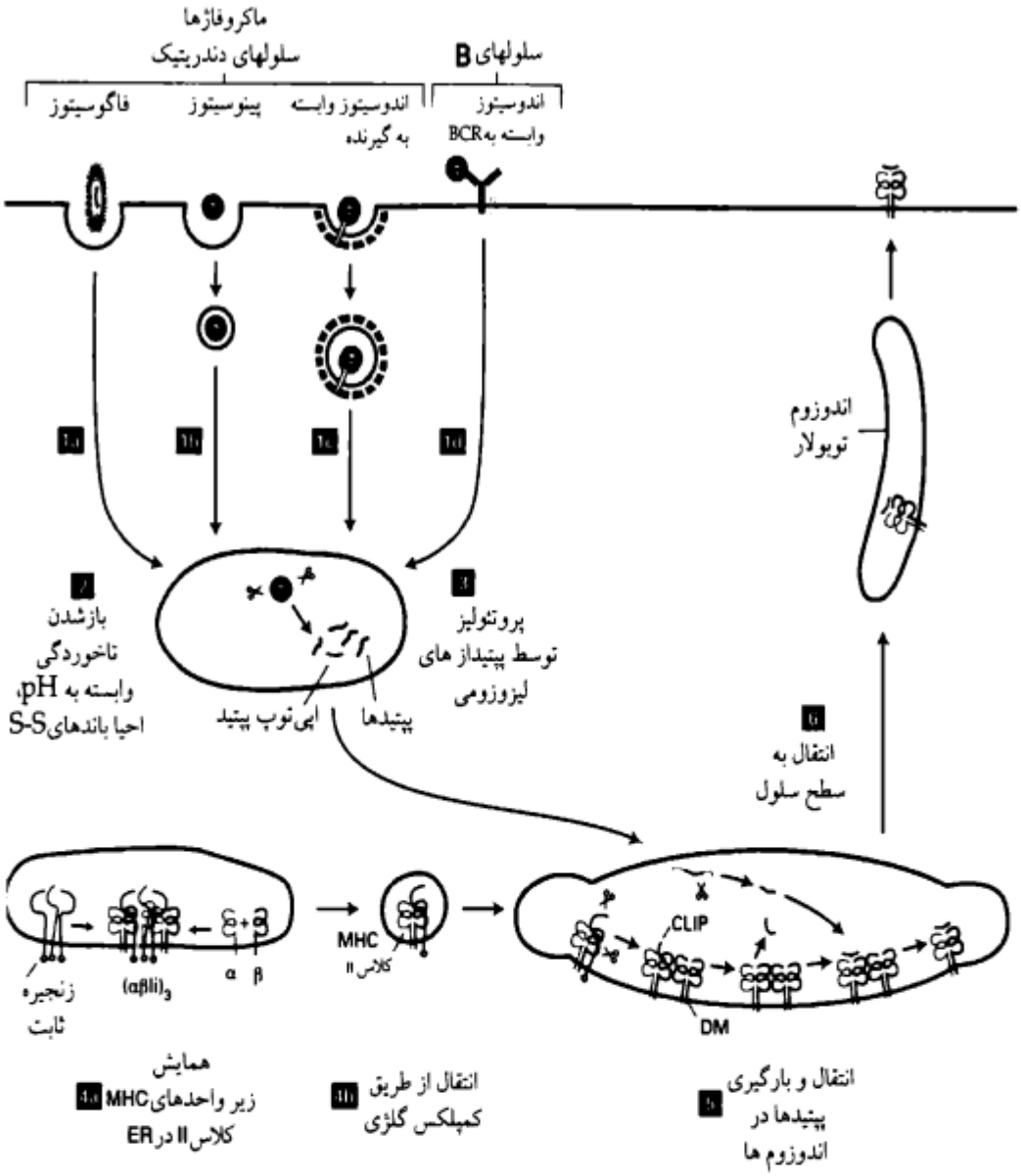


▲ **شکل ۲۵-۲۴ مسیر پردازش و عرضه آنتی‌ژنی توسط MHC کلاس I.** مرحله (❶): کسب آنتی‌ژنی که ممکن است با تولید پروتئین‌هایی دارای خطا همراه شود. (انتهای نابالغ، اتصال اشتباه). مرحله (❷): پروتئینی که به صورت اشتباه تا خوردگی پیدا کرده است به منظور تخریب از طریق کونژوگاسیون با یوبی کوئیتین مورد هدف قرار می‌گیرد. مرحله (❸): پروتئولیز توسط پروتئازوم انجام می‌گیرد. در سلول‌هایی که در معرض اینترفرون γ قرار گرفته‌اند، زیر واحد β فعال از نظر کاتالیتیکی توسط زیر واحد β اختصاص ایمنی القا شده توسط اینترفرون، جایگزین می‌شود. مرحله (❹): پپتیدها به داخل شبکه آندوپلاسمی (ER) از طریق حمل و نقلی TAP دیمر، وارد می‌شوند. مرحله (❺): پپتید به داخل مولکول MHC کلاس I تازه سنتز شده منتقل می‌شود. مرحله (❻): کمپلکس پپتید به MHC کلاس I تکمیل شده از طریق مسیر ترشحی به سطح سلول منتقل می‌شود. برای جزئیات بیشتر به متن مراجعه کنید.

پپتید از کمپلکس مربوطه می‌شود.

(❻) ارائه کمپلکس پپتید MHC کلاس I در سطح سلول: به محض این که انتقال پپتید تکمیل شد، مجموعه پپتید ـ MHC کلاس I از کمپلکس حمل کننده پپتید جدا شده و وارد مسیر ترشحی دائمی می‌شود (شکل ۱-۱۴). مولکول‌های MHC کلاس I بسته به ماهیت آللی و گونه‌ای، در دستگاه گلژی با تغییرات وسیعی از جمله یک یا سه مرحله N- الیگوساکاریدی شدن، قرار می‌گیرند. انتقال از گلژی به سطح سلول سریع می‌باشد و مسیر بیوسنتزی کمپلکس پپتید MHC کلاس I را کامل می‌کند.

تمام این سلسله حوادث در مسیر کلاس I به طور دائمی در تمام سلول‌های هسته دار اتفاق می‌افتد که مولکول‌های MHC کلاس I و دیگر پروتئین‌های مورد نیاز را بیان می‌کنند و یا می‌توانند در اثر القا، چنین مولکول‌هایی را بسازند. در غیاب عفونت ویروسی، سنتز پروتئین و پروتئولیز به طور دایمی تولید مجموعه‌ای متشکل از پپتیدهای مشتق از پروتئین‌های میزبان را نشان می‌دهند. ممکن است چندین هزار ترکیب پپتید ـ MHC مجزا در سطح یک سلول معمولی که از نظر MHC کلاس I مثبت است نمایش داده شود. سلول‌های T بالغ شده در تیموس، گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن‌شان را روی چنین مجموعه‌ای از کمپلکس پپتید ـ MHC تنظیم کرده و آموزش می‌بینند که محصولات MHC خودی را به



▲ **شکل ۲۶-۲۴ پردازش و ارائه آنتی‌ژن توسط مسیر MHC کلاس II.** مرحله (❶): آنتی‌ژن‌های ذره‌ای توسط فاگوسیتوز و آنتی‌ژن‌های غیر ذره‌ای توسط پینوسیتوز یا اندوسیتوز کسب می‌شوند. مرحله (❷): در معرض قرارگیری آنتی‌ژن با pH کم و محیط احیاکننده اندوزوم‌ها و لیزوزوم‌ها، آنتی‌ژن را برای پروتئولیز آماده می‌کند. مرحله (❸): آنتی‌ژنی توسط پروتئازهای متنوعی در لیزوزوم‌ها و اندوزوم‌ها شکسته می‌شود. مرحله (❹): زیر واحدهای MHC کلاس II در شبکه آندوپلاسمی گردآوری می‌شوند و به وسیله پیام‌های همراه با زنجیره ثابت، به اجزای لیزوزومی / آندوزومی تحویل داده می‌شوند. انتقال جهت‌گیری شده به سمت آندوزوم‌های ثانویه، لیزوزوم‌ها و آندوزوم‌های اولیه، در معرض قرارگیری مولکول‌های MHC کلاس II را با آنتی‌ژن‌های حاصل از فرایند پروتئولیز در طی کل مسیر آندوسیتوزی تضمین می‌کند. مرحله (❺): انتقال پپتید با کمک DM، که یک پروتئین چاپرونی شبه MHC کلاس II می‌باشد، صورت می‌گیرد. مرحله (❻): ارائه MHC کلاس II حاوی پپتید در سطح سلول. برای جزئیات بیشتر به متن مراجعه کنید.

عنوان عوامل محدودکننده بشناسند. و از حالا به بعد آنها باید برای شناسایی آنتی‌ژن به آنها تکیه کنند. به طور همزمان عرضه پپتیدهای خودی توسط مولکول‌های MHC خودی، سلول T تکامل یافته را قادر می‌سازد تا یاد بگیرد که ترکیبات ـ MHC پپتید مشتق شده از پروتئین‌های خودی را جهت اجتناب از یک واکنش خود ایمنی مخرب باید نادیده بگیرد. تا به حال ویروسی شناخته نشده که به صورتی عمل کند که پپتیدهای مشتق از ویروس بتواند توسط کمپلمس پپتید ـ MHC عرضه شوند. کارایی کل مسیر به صورتی می‌باشد که تقریباً ۴۰۰۰ مولکول از یک پروتئین معین باید تخریب شود تا یک مجموعه منفرد پپتید ـ MHC تولید شود که ناقل یک

پپتید از آن پلی پپتیدهای معین است.

با این وجود یک الگوی غیر معمول در عرضه آنتی‌ژن که در تکامل سلول‌های T سیتوتوکسیک حیاتی است «عرضه متقاطع[۱]» می‌باشد. این اصطلاح در مورد کسب آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک از باقیمانده‌های سلول‌های در حال آپوپتوز کمپلکس‌های ایمنی و احتمالاً سایر اشکال آنتی‌ژنی که توسط عمل فاگوسیتوز فراهم شده مطرح می‌شود. این مواد توسط مسیری که هنوز شناخته نشده از اجزای اندوزومی فاگوزومی به داخل سیتوزولی فرار کرده و سپس مطابق با مراحلی که در بالا اشاره شد پردازش می‌شوند. تنها سلول‌های دندریتیک قادر به عرضه متقاطع بوده و بنابراین موجب ارائه کمپلکس مولکول‌های MHC کلاس I با پپتیدهایی می‌شوند که این پپتیدها به جای سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژنی از سلول‌های دیگر مشتق شده‌اند.

مسیر MHC کلاس II آنتی‌ژن‌هایی را که وارد مسیر اندوزومی می‌شوند عرضه می‌کند

اگرچه مولکول‌های MHC کلاس I و MHC کلاس II شباهت ساختاری قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند اما روشی که این دو کلاس برای کسب پپتید دارند و نیز عملکردشان در مرحله شناسایی ایمنی بسیار متفاوت است. عملکرد اولیه مولکول‌های MHC کلاس I هدایت سلول‌های T یاریگر $CD8^+$ به سمت سلول‌های هدف آنها می‌باشد در حالی که مولکول‌های MHC کلاس II جهت هدایت سلول‌های T یاریگر $CD4^+$ به طرف سلول هایی که با آنها واکنش می‌دهند به کار می‌روند که این سلول‌ها عمدتاً عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای می‌باشند.

همان طوریکه قبلاً اشاره شد مولکول‌های MHC کلاس II عمدتاً در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای از جمله سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها که فاگوسیتیک هستند و نیز سلول‌های B بدون این خاصیت، بیان می‌شوند. بنابراین مسیر پردازش و ارائه آنتی‌ژن توسط MHC کلاس II عمدتاً فقط در این سلول‌ها اتفاق می‌افتد. مراحل این مسیر در شکل ۲۶-۲۴ ترسیم و در زیر شرح داده شده است.

(❶) کسب آنتی‌ژن: در مسیر MHC کلاس II، آنتی‌ژن توسط پینوسیتوز، فاگوسیتوز یا اندوسیتوز با واسطه گیرنده کسب می‌شود. پینوسیتوز که نسبتاً غیر اختصاصی است شامل یک فرایند فرو رفتن غشا به سمت داخل و جذب حجمی از مایع خارج سلولی و مولکول‌هایی که در آن محلول هستند و در نهایت، جدا شدن وزیکول از غشا و تحویل این مواد به سیتوزول می‌باشد. فاگوسیتوز[۲] شامل مواد بسیار کوچک مثل باکتری‌ها و ویروس‌ها و باقیمانده‌های سلول‌های مرده می‌باشد که در واقع باعث شکل‌گیری مجدد قسمت وسیعی از اسکلت سلولی اکتینی می‌شود که موجب ایجاد فضای کافی برای ذرات تازه وارد می‌شود. اگرچه فاگوسیتوز ممکن است توسط میانکنش گیرنده با لیگاند صورت گیرد اما ضرورتاً برای عمل فاگوسیتوز لازم نمی باشد. حتی ذرات لاتکس می‌توانند با کارایی بالا توسط ماکروفاژها بلع شوند. در فرایند اپسونیزاسیون پاتوژن‌ها که توسط آنتی‌بادی‌ها و اجزای اختصاصی کمپلمان پوشیده شده‌اند مورد هدف ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک قرار گرفته و توسط گیرنده‌های سطح سلولی برای اجزای کمپلمان یا قسمت Fc ایمونوگلوبولین‌ها، شناسایی شده و سپس فاگوسیت می‌شوند (شکل ۲۷-۲۴). ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک همچنین چندین نوع گیرنده غیراختصاصی برای مثال گیرنده‌های شبه - تول[۳] و گیرنده‌های رفتگر که الگوهای مولکولی روی آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی را می‌شناسند بیان می‌کنند. آنتی‌ژن متصل شده به گیرنده توسط فرایند آندوسیتوز وابسته به گیرنده[۴] وارد سلول می‌شود. سلول‌های B بدون خاصیت فاگوسیتیک نیز می‌توانند آنتی‌ژن را به وسیله فرایند اندوسیتوز با واسطه گیرنده توسط گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن سلول B (ایمونوگلوبولین سطحی) کسب کنند (شکل ۲۸-۲۴). بالاخره آنتی‌ژن‌های سیتوزولی ممکن است وارد مسیر MHC کلاس II از طریق خودخواری شوند (شکل ۳۵-۱۴). در این فرایند بعد از تشکیل شکل شبه فنجان، وزیکول خود خواری تشکیل می‌شود. این وزیکول‌ها به اندازه‌ای هستند که می‌توانند اندامک‌های آسیب دیده و مقادیر نسبتاً وسیعی از سیتوپلاسم را که ممکن است در طی این فرایند وارد وزیکول شده باشد، در خود جای می‌دهند. اتو فاگوزوم‌های حاصل، جهت اتصال با لیزوزوم‌ها حرکت می‌کنند و سپس محتویات اتو فاگوزوم‌ها به منظور هضم در دسترس پروتئازهای لیزوزومی قرار می‌گیرند.

(❷) بر چسب خوردن آنتی‌ژن به منظور تخریب: پروتولیز برای تبدیل آنتی‌ژن پروتئینی به پپتیدهای با اندازه مناسب برای اتصال به مولکول‌های MHC کلاس II لازم است. باز شدن چین خوردگی تدریجی آنتی‌ژن‌های پروتئینی به منظور برچسب خوردن آنها و در

1- Cross-presentation 2- Phagocytosis

3- Scavenger

4- Receptor - mediated endocytosis

نهایت تخریب آنها ناشی از افت pH در حال مسیر پردازش پروتئینی اندوسیتوتیک صورت می‌گیرد. pH محیط خارج سلولی حدود ۷/۲ است ولی pH در اندوزوم‌های اولیه ۶/۵-۵/۵ و در اندوزوم‌های ثانویه و لیزوزوم‌ها ممکن است تا ۴/۵ افت کند. پمپ‌های پروتونی کلاس V که با ATP فعال می‌شوند و در غشاهای لیزوزومی وجود دارند مسئول این اسیدی شدن می‌باشند (شکل ۹-۱۱). پروتئین‌هایی که به pH خنثی مقاوم اند زمانی که در معرض pH خیلی بالاتر قرار می‌گیرند تمایل دارند از طریق گسسته شدن پیوندهای هیدروژنی و سست شدن پل‌های نمکی تاخوردگی‌شان باز شود. علاوه بر این، لیزوزوم‌ها غلظتی از اکی والانهای احیایی در حد میلی مولار راکسب می‌کنند که منجر به احیای اجزای محیط لیزوزومی اندوزومی می‌شود. احیای پیوندهای دی سولفیدی که بسیاری از پروتئین‌های خارج سلولی را مقاوم می‌سازد نیز توسط یک تیوردوکتاز[1] کاتالیز می‌شود که با قرار گرفتن در معرض IFNγ قابل القا است. عملکرد توأم pH پائین و محیط احیا شده، آنتی‌ژن را جهت پروتئولیز آماده می‌کند.

(❸) پروتئولیز: تجزیه پروتئین‌ها در مسیر MHC کلاس II توسط مجموعه بزرگی از پروتئازهای لیزوزومی انجام می‌شود که در کل به عنوان کاتپسین‌ها[2] نامیده می‌شوند و در واقع آسپارتیل یا سیستئین پروتئاز هستند. سایر پروتئازها مانند اندو پروتئاز اختصاصی آسپاراژین ممکن است به پروتئولیز کمک کند. میزان وسیعی از قطعات پپتیدی تولید می‌شود که بخشی از آنها می‌تواند به مولکول‌های MHC کلاس II متصل شود. پروتئازهای لیزوزومی در pH اسیدی داخل لیزوزوم به صورت مطلوبی عمل می‌کنند. در نتیجه عواملی که فعالیت پمپ‌های پروتونی کلاس V را مهار می‌کنند، از پردازش آنتی‌ژن نیز جلوگیری می‌کنند همان طوری که مهار کننده‌های پروتئاز لیزوزومی انجام می‌دهند.

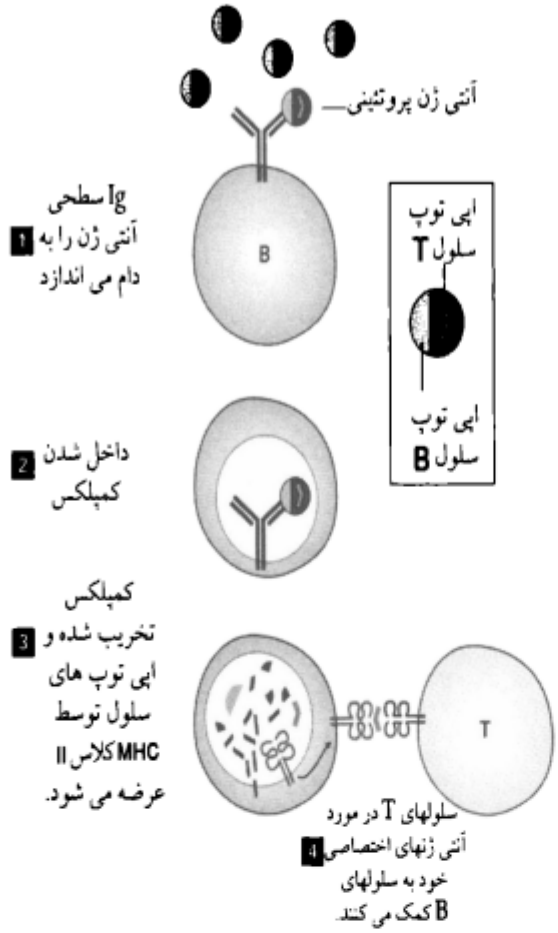
(❹) انتقال پپتیدها به مولکول‌های MHC کلاس II: به خاطر آورید که اکثر مولکول‌های MHC کلاس II که در شبکه آندوپلاسمی تولید می‌شوند، به سمت لیزوزوم ثانویه هدایت می‌شوند. به خاطر این که پپتیدهایی که توسط پروتئولیز تولید می‌شوند در فضای مشابهی که مولکول‌های MHC کلاس II در آنجا قرار دارند جای می‌گیرند انتقال پپتید به مولکول‌های MHC کلاس II نیازی به عبور از غشا ندارند. بنابراین فقط لازم است امکان برخورد مولکول MHC کلاس II و پپتیدها فراهم گردد که این اعمال در مسیر بیوسنتزی توسط یک سری مراحل طبقه بندی شده انجام می‌گیرد که وابسته به زنجیره ثابت (Ii) بوده و انتقال کمپلکس $(\alpha\beta Ii)_3$ - کلاس II را به اجزای اندوزومی تضمین می‌کند.

(❺) اتصال پپتیدها به مولکول‌های MHC کلاس II: کمپلکس $(\alpha\beta Ii)_3$ تحویل داده شده به اجزای اندوزومی؛ به علت این که شکاف اتصال پپتید در مولکول MHC کلاس II توسط (Ii) اشغال شده است قادر به اتصال پپتید نمی‌باشد. همان پروتئازهایی که بر روی آنتی‌ژن‌های کسب شده عمل کرده و آنها را به پپتیدها تجزیه می‌کنند می‌توانند بر روی کمپلکس $(\alpha\beta Ii)_3$ اثر گذاشته و منجر به حذف (Ii) شوند. به استثنای بخش کوچکی که قطعه CLIP نامیده می‌شود به علت این که CLIP به طور محکم در شکاف اتصالی پپتید مولکول MHC کلاس II قرار گرفته، مقاوم به حمله پروتئولیتیک است. خود مولکول‌های MHC کلاس II نیز نسبت به باز شدن تا خوردگی و حمله پروتئولیتیکی مقاوم‌اند، یعنی تحت شرایطی هستند که می‌توانند بر مسیر اندوسیتیک غلبه کنند. قطعه CLIP از طریق میانکنش کمپلکس $\alpha\beta$CLIP با یک چاپرون به نام DM برداشته می‌شود. اگرچه پروتئین DM توسط MHC کد می‌شود و شباهت زیادی از نظر ساختاری با MHC کلاس II دارد اما قادر به اتصال به پپتیدها نمی‌باشند. کمپلکس پپتید ـ MHC کلاس II که تازه سنتز شده است مستعد ویرایش بیشتر توسط DM هستند تا زمانی که مولکول MHC کلاس II، پپتیدی کسب کرده و آنچنان محکم به آن متصل شود که نتواند توسط میانکنش با DM از بیرون رانده شود. کمپلکس‌های پپتید ـ MHC کلاس II حاصل شده شدیداً محکم بوده و نیمه عمرشان بیش از ۲۴ ساعت تخمین زده می‌شود.

(❻) ارائه کمپلکس‌های پپتید ـ MHC به سطح سلول: کمپلکس‌های پپتید ـ MHC کلاس II تازه سنتز شده اکثراً در اجزای اندوزومی ثانویه جای گرفته‌اند که شامل اندوزوم‌های (یا اجسام) چند وزیکولی هستند (شکل ۲۳-۱۴). فراخوانی وزیکول‌های داخلی از اجسام چند وزیکولی به منظور محدود کردن آنها به داشتن غشاء، ناحیه سطحی شان را گسترش می‌دهد و توسط فرایند توبول سازی در امتداد مسیر تحکیم میکروتوبول‌ها، این اجزا طویل شده و سرانجام کمپکس‌های پپتید ـ MHC توسط جوش خوردن به غشاء به سطح سلول امتداد داده می‌شوند. چنین رویدادهایی به طور دقیقی تنظیم می‌شوند. توبول سازی و انتقال کمپلکس‌های MHC کلاس II به سطح در سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها افزایش می‌یابد که به دنبال فعال شدن این سلول‌ها در پاسخ به پیام‌هایی مثل لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی (LPS) که توسط گیرنده‌های شبه تول‌شان این پیام‌ها را می‌شناسند صورت می‌گیرد.

1- Thioreductase 2- Cathepsin

▲ **شکل ۲۷-۲۴ (شکل رنگی) ارائه آنتی‌ژن اپسونیزه شده توسط سلول‌های فاگوسیتیک.** سلول‌های فاگوسیتیک تخصص یافته مانند ماکروفاژها یا سلول‌های دندریتیک به کمک گیرنده‌های Fc مثل FcγR در سطح شان می‌توانند به پاتوژن‌هایی که با آنتی‌بادی پوشانده شده‌اند (اپسونیزاسیون) متصل شوند و پاتوژن مورد نظر را ببلعند. بعد از بلع ذرات فاگوسیت شده (مثل کمپلکس ایمنی باکتری - ویروس)، تعدادی پپتید تولید می‌شود که شامل قسمت‌هایی از پاتوژن (نارنجی) بوده که به مولکول MHC کلاس II منتقل می‌شود. کمپلکس‌های پپتید - MHC کلاس II که در سطح سلول ارائه می‌شوند موجب فعال سازی سلول‌های T اختصاصی نسبت به ترکیبات پپتید - MHC می‌شوند. آنتی‌ژن‌های لیپیدی به مولکول‌های شبه کلاس I ، CD1، که ناحیه اتصال شان برای جایگیری لیپیدها اختصاص یافته، تحویل داده می‌شوند. پپتیدهای مشتق از پاتوژن‌های خاص (ارغوانی) ممکن است به محصولات MHC کلاس I با استفاده از عرضه متقاطع تحویل داده شوند. مکانیسم‌هایی که اساس عرضه متقاطع را تشکیل می‌دهند هنوز ناشناخته است.



▲ **شکل ۲۸-۲۴ عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های B.** سلول‌های B به وسیله گیرنده‌های خود یا ایمونوگلوبولین‌های سطحی حتی در غلظت کم آنتی‌ژن به آن متصل می‌شوند. کمپلکس حاصل شده جذب سلول B می‌شود و بعد به اجزای اندوزومی / لیزوزومی که قرار است در آنجا عمل تخریب صورت گیرد تحویل داده می‌شود. پپتیدهایی که از کمپلکس ایمنی آزاد می‌شوند شامل قطعاتی از آنتی‌ژن پروتئینی هستند که به عنوان کمپلکس‌های پپتید - MHC کلاس II در سطح سلول نمایش داده می‌شوند. سلول‌های CD4 T که اختصاصی کمپلکس ارائه شده باشند می‌توانند به سلول‌های B کمک کنند. چنین کمکی محدود به MHC و اختصاصی آنتی‌ژن می‌باشد.

برای سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای، مراحل ذکر شده در بالا پیوسته است یعنی همیشه اتفاق می‌افتد. اما آنها می‌توانند در معرض عوامل میکروبی و سیتوکاین‌ها قرار گرفته و تنظیم شوند.

نکات کلیدی بخش ۴-۲۴

MHC و عرضهٔ آنتی ژن

■ MHC که به عنوان مناطق ژنتیکی ضروری برای قبول یا رد پیوندها کشف شده بود دو کلاس مهم از گلیکوپروتئین‌های

غشایی نوع I (مولکولهای MHC کلاس I و کلاس II) را کُد می‌کند. این پروتئین‌ها به شدت پلی‌مورفیک بوده و نوسانات آللی زیادی در جمعیت‌ها دارند (شکل ۲۱-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ عملکرد محصولات MHC اتصال به پپتیدها و نشان دادن آنها بر روی گیرنده‌های ویژه آنتی ژنی بر روی سلول‌های T می‌باشد. مولکولهای MHC کلاس I بر روی بسیاری از سلول‌های هسته دار یافت می‌شوند در حالیکه بیان مولکولهای MHC کلاس II در سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن مثل سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها و سلول‌های B روی می‌دهد.

■ سازمان یابی و ساختار مولکولهای MHC کلاس I و II مشابه بوده و شامل مناطق ویژه برای اتصال به طیف وسیعی از پپتیدیها می‌باشد (شکل ۲۳-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ واریانت‌های آللی مختلف مولکول‌های MHC به مجموعه‌های مختلف پپتیدی‌ها وصل می‌شوند زیرا تفاوت هایی که یک آلل را از دیگری تشخیص می‌دهند شامل اسیدهای آمینه‌ای هستند که معماری محل اتصال پپتید را معین می‌کنند (شکل ۲۴-۲۴ را ملاحظه کنید). اسیدهای آمینه آللی همچنین شامل ریشه هایی است که با گیرندهٔ سلول T برای آنتی ژن بر همکنش می‌دهد. بنابراین واریانت‌های آللی مختلف مولکول MHC، حتی اگر آنها به پپتیدیهای مشابهی وصل شوند، همیشه با گیرنده سلول T ای که برای برهمکنش با فقط یک آلل مولکول MHC طراحی شده است واکنش نخواهد داد. این پدیده محدودیت MHC نامیده می‌شود.

■ مولکولهای MHC کلاس I و II بخش‌های مختلف درون سلولی را بکار می‌گیرند: مولکول‌های کلاس I ترجیحاً از مواد سیتوزولی استفاده کرده در حالیکه مولکول‌های کلاس II از مواد واردشده توسط فاگوسیتوز، پینوسیتوز یا آندوسیتوز با واسطه گیرنده استفاده می‌کنند.

■ فرایندی که در آن آنتی‌ژن‌های پروتئینی کسب شده به پپتیدها پردازش شده و به صورت کمپلکس‌های پپتید - MHC در سطح نمایش داده می‌شود به عنوان پردازش و عرضه آنتی ژن شناخته می‌شوند. این فرایند به طور پیوسته در سلول‌هایی که مولکولهای MHC را بیان می‌کنند تعدیل می‌شود که حتی در فرایند پاسخ ایمنی نیز می‌تواند تعدیل می‌شود.

■ پردازش و عرضه آنتی‌ژن می‌تواند به شش مرحله جدا تقسیم‌بندی شود: (۱) کسب آنتی ژن (۲) دُمدار کردن آنتی ژن برای تخریب، (۳) پروتئولیز، (۴) رفتن پپتیدها به مولکولهای MHC و (۵) اتصال پپتید به مولکول MHC و (۶) نمایش پپتید قرار گرفته در مولکول MHC بر روی سطح سلول (اشکال ۲۵-۲۴ و ۲۶-۲۴ را ملاحظه کنید).

۵-۲۴ سلول‌های T، گیرنده‌های سلول‌های T و تکامل سلول‌های T

لنفوسیت‌های T، آنتی‌ژن را از طریق مولکول‌های MHC مورد شناسایی قرار می‌دهند. پذیرنده‌های مسئول شناسایی معمولاً از لحاظ ساختاری مرتبط با ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشند. به منظور تولید گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن، سلول‌های T ژن‌های کد کننده زیر واحدهای گیرنده سلول T را توسط مکانیسم‌های باز آرایی سوماتیک، باز آرایی می‌کنند که مشابه با مکانیسم‌هایی می‌باشند که سلول‌های B برای باز آرایی ژن‌های ایمونوگلوبولین مورد استفاده قرار می‌دهند. تکامل سلول‌های T همچنین بسیار وابسته به انجام موفق باز آرایی سوماتیک می‌باشد که منجر به ساخت زیر واحدهای TCR می‌شود. ما باید موارد زیر را شرح دهیم: زیر واحدهای شناسایی کننده اختصاصی آنتی‌ژن، چگونگی جفت شدن با گلیکو پروتئین‌های غشایی ضروری برای انجام عمل انتقال پیام و چگونگی تشکیل پپتید ـ MHC توسط پذیرنده‌های TCR.

همان گونه که در پاراگراف قبلی اشاره شد سلول‌های T آنتی‌ژن‌ها را فقط زمانی که همراه با مولکول‌های MHC پلی مورفیک میزبان باشند مورد شناسایی قرار می‌دهند. در مسیر تکاملی، سلول‌های T باید مولکول‌های MHC خودی را بشناسند و آموزش‌های لازم را برای نادیده گرفتن بافت‌های خودی میزبان دریافت کنند تا از واکنش‌های بالقوه خطرناک سلول‌های T جدیدتر تولید شده جلوگیری کنند (به عنوان مثال خود ایمنی). ما باید چگونگی تکامل سلول‌های T را شرح دهیم و همچنین کلاسهای اصلی سلول‌های T را مطابق با عملکردشان معرفی کنیم.

ساختار گیرنده‌های سلول‌های T مشابه متعلقات F(ab) ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد

مانند سلول‌های B که گیرنده سلول B را برای شناسایی آنتی‌ژن و سپس انتقال پیام و در نهایت گسترش کلونی به کار می‌برند سلول‌های T نیز بسیار مشابه با سلول‌های B، از **گیرنده‌های سلول T (TCR)** خود جهت این کار بهره می‌گیرند. سلول‌های T از طریق گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن، فعال شده و تکثیر می‌یابند و توانایی کشتن سلول‌های هدف حمل کننده آنتی‌ژن را بدست می‌آورند و یا

سایتوکاین‌هایی تولید می‌کنند که سلول‌های B را در مسیر تمایزشان یاری می‌رسانند. TCRها مولکول‌های MHC که با پپتیدهای مناسب ترکیب شده باشند را مورد شناسایی قرار می‌دهند.

ساختار گیرنده سلول‌های T (TCR) با کمک گرفتن از دو فرضیه اثبات شد. در فرضیه نخست تنوع TCRها مطرح شد و توانایی تمایز بین آنتی‌ژن‌های مشابه توسط آنها مورد توجه قرار گرفت. بر اساس این فرضیه که سلول‌های T دارای TCR هایی می‌باشند که به صورت کلونی انتشار یافته‌اند باید امکان تولید آنتی‌بادی در قبال چنین اشکال منحصر به فردی روی سلول‌های T ویژه وجود داشته باشد و چنین آنتی‌بادی هایی باید به طور انحصاری با همان کلون تولید کننده TCR واکنش دهند نه با سلول‌های T مربوط به کلونی دیگر. آنتی‌بادی هایی که مورد استفاده قرار گرفت به طور موفقیت آمیزی فرضیه نخست در موردTCR را تأئید کرد. فرضیه دوم این بود که تولید تعداد کافی TCR اختصاصی نیاز به باز آرایی سوماتیک می‌باشد و براساس این فرضیه زمانی که cDNA را که کد کننده زیر واحد شناخته شده‌ای از TCR می‌باشد به عنوان پروب استفاده کنیم باید وجود یا عدم وجود باز آرایی سوماتیک توسط مقایسه سازماندهی لوکوس TCR در فرم لایه زایا و سلول‌های T بالغ مشخص شود.

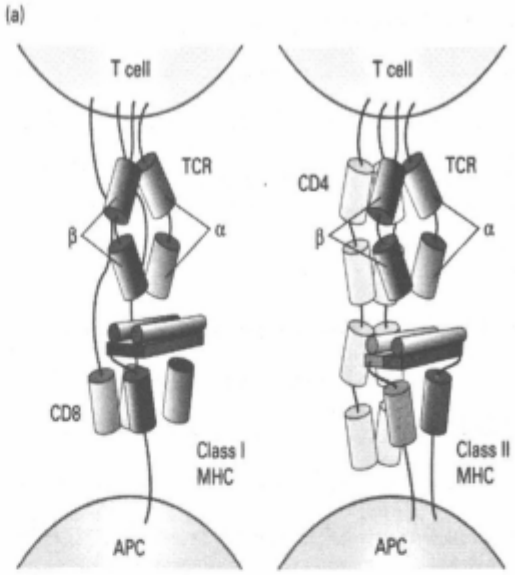
روشهای ایمونو شیمیایی از طریق به کارگیری آنتی‌بادی‌ها بر علیه کلونی‌های خاص (clonotypic Ab) و همچنین دیگر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی سلول‌های T، توانست ساختار TCR را مشخص کند. (شکل ۲۹-۲۴). TCR مرکب از دو زیر واحد گلیکو پروتئینی است که هر کدام، محصول بازآرایی ژن سوماتیک می‌باشند که به صورت $\alpha\beta$ و یا $\gamma\delta$ نمایش داده می‌شوند. ساختار این زیر واحدها مشابه قطعات F(ab) ایمونوگلوبولین می‌باشد. در سمت N- انتهایی یک دُمین متغیر و به دنبال آن یک دُمین ثابت و همچنین قطعات درون غشایی وجود دارد. دنباله‌های سیتوپلاسمی زیر واحدهای TCR به اندازه‌ای کوتاه هستند که نمی‌توانند موجب فرا خوانی فاکتورهای سیتوزولی لازم برای عمل انتقال پیام شوند. در عوض، TCRها با کمپلکس CD3 همراه می‌شوند که پروتئین‌های غشایی مرکب از زنجیرهای γ، δ، ε و ζ می‌باشد. (زیر واحدهای γ و δمربوط به TCR را نباید با زیر واحدهای مشابه مختص CD3 اشتباه گرفت). زنجیره ε با زنجیره γ و δ پیوند غیر کووالانسی تشکیل می‌دهد و منجر به تشکیل کمپلکس‌های دیمر $\gamma\varepsilon$ و $\delta\varepsilon$ می‌شود. دُمین‌های خارج سیتوزولی CD3 مشابه با دُمین‌های ایمونوگلوبولین می‌باشند. هر کدام از دُمین‌های سیتوزولی آنها دارای یک ITAM می‌باشند که از طریق مولکول‌های آداپتور، ریشهٔ تیروزین آنها فسفریله می‌شود. زنجیره ζ هومودیمری است که توسط پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده و به کمپلکس CD3-TCR ملحق می‌شود و دارای سه تا ITAM در هر زنجیره خود می‌باشد.

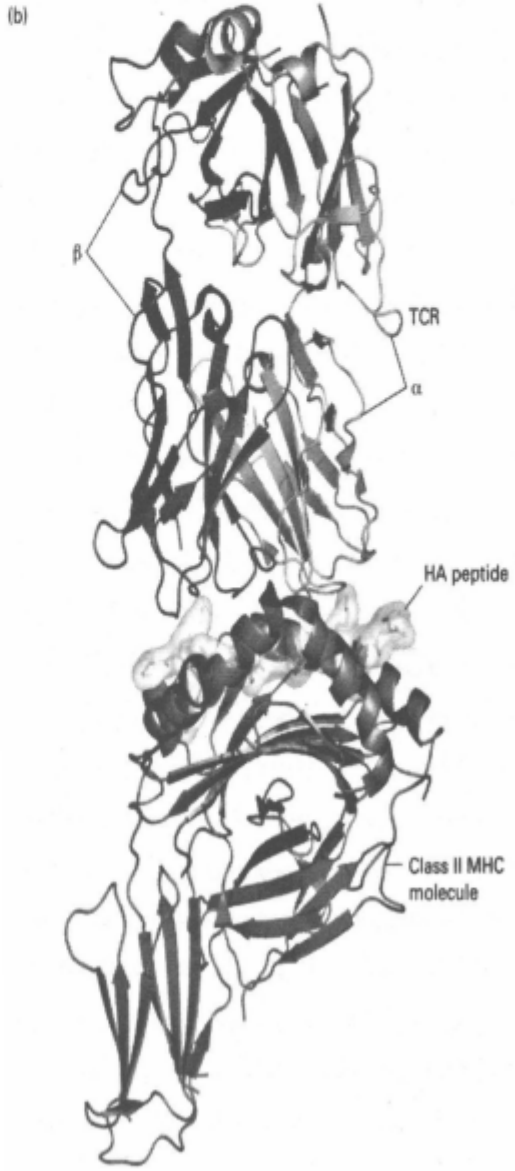
بازآرایی ژن‌های TCR توسط مکانیسم‌های مشابه با باز آرایی‌های ژن‌های ایمونوگلوبولین صورت می‌گیرد

تقریباً همه گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن که توسط مکانیسم نوترکیبی سوماتیک ایجاد می‌شود شامل زیر واحد هایی هستند که محصول باز آرایی VDJ (زنجیره سنگین ایمونوگلبولین، زنجیره TCR β) و V-J (از زنجیره سبک ایمونوگلبولین و زنجیره TCR α) می‌باشند. مکانیسم نو ترکیبی V-D-J و V-J برای لوکوس TCR مشابه با مکانیسمی است که برای ژن‌های ایمونوگلوبولین شرح داد شده و به همه پروتئین‌های لازم برای شکل‌گیری ماشین اتصال دهنده انتهایی زیر واحدهای غیرهمولوگ[1] نیاز دارند از جمله: RAG1، RAG2، Ku70، Ku80، زیر واحد کاتالیتیک DNA-PK، XRCC4 ، DNA لیگاز چهار (IV) و آرتمیس و همچنین نیاز واقعی به توالی‌های علامت دهنده نوترکیبی (RSS3) وجود دارد و ملزم به پیروی از قانون فاصله گذار ۱۲/۲۳ bp می‌باشد (شکل ۳۰-۲۴).

تعدادی خصوصیات قابل توجهی وجود دارد که به سازمان دهی و باز آرایی لوکوس TCR اختصاص دارد. اول سازماندهی پیام‌های باز آرایی در سلول‌های T به گونه‌ای می‌باشد که اجازه باز آرایی قطعه ژنی D را با D نیز می‌دهد. دوم آنزیم TdT در همه مراحل باز آرایی ژنی TCR فعال می‌باشد و نوکلئوتیدهای N می‌توانند در همه ژن‌های باز آرایی شده TCR وجود داشته باشند. سوم، در انسان و موش، لوکوس TCR δ مابین لوکوس TCR α قرار گرفته است. این سازماندهی منجر به برش کامل لوکوس δ می‌شود و بنابراین زمانی که لوکوس TCR α برای باز آرایی انتخاب می‌شود مانع از انتخاب لوکوس δ و در نتیجه منجر به حذف آن می‌شود. سلول‌های T بیان کنندهٔ گیرندهٔ $\alpha\beta$ و سلول‌های T بیان کنندهٔ گیرندهٔ $\gamma\delta$، اجداد مجزا و همچنین عملکردهای مجزایی دارند از بین سلول‌های T بیان کنندهٔ $\gamma\delta$، بعضی قادر به شناسایی مولکول‌های CD1 بوده که مسئول پردازش آنتی‌ژن‌های لیپیدی می‌باشند. سلول‌های T بیان

1- Nonhomologous end-joining machinery





◀ شکل ۲۹-۲۴ (شکل رنگی) ساختار گیرنده سلول‌های (TCR) T و کمک گیرنده‌های مربوط به آن. (a) گیرنده‌های سلول‌های T ویژه آنتی‌ژن مرکب از دو زنجیره β و α می‌باشد که به ترتیب توسط نوترکیبی V-J و V-DJ تولید می‌شوند. زیر واحدهای $\alpha\beta$ باید همراه با کمپلکس CD3 باشند (شکل۳۱-۲۴) تا بتوانند پیام‌های لازمه را ارسال کنند. تشکیل یک کمپلکس کامل TCR $\alpha\beta$-CD3 نیاز به بیان ژن‌ها در سطح سلول‌ها دارد. سلول‌های T علاوه بر TCR و CD3 کمک گیرنده‌هایی به نام CD8 (آبی روشن) و CD4 (سبز روشن) دارند که به ترتیب با قسمت‌های مشخص از مولکول‌های MHC-I و MHC-II روی سلول‌های پردازش کننده آنتی‌ژن واکنش می‌دهند. (b) ساختار پذیرنده‌های سلول T اتصال یافته به مولکول‌های پپتید ـ MHC که با کریستالوگرافی اشعه X تعیین شده است.

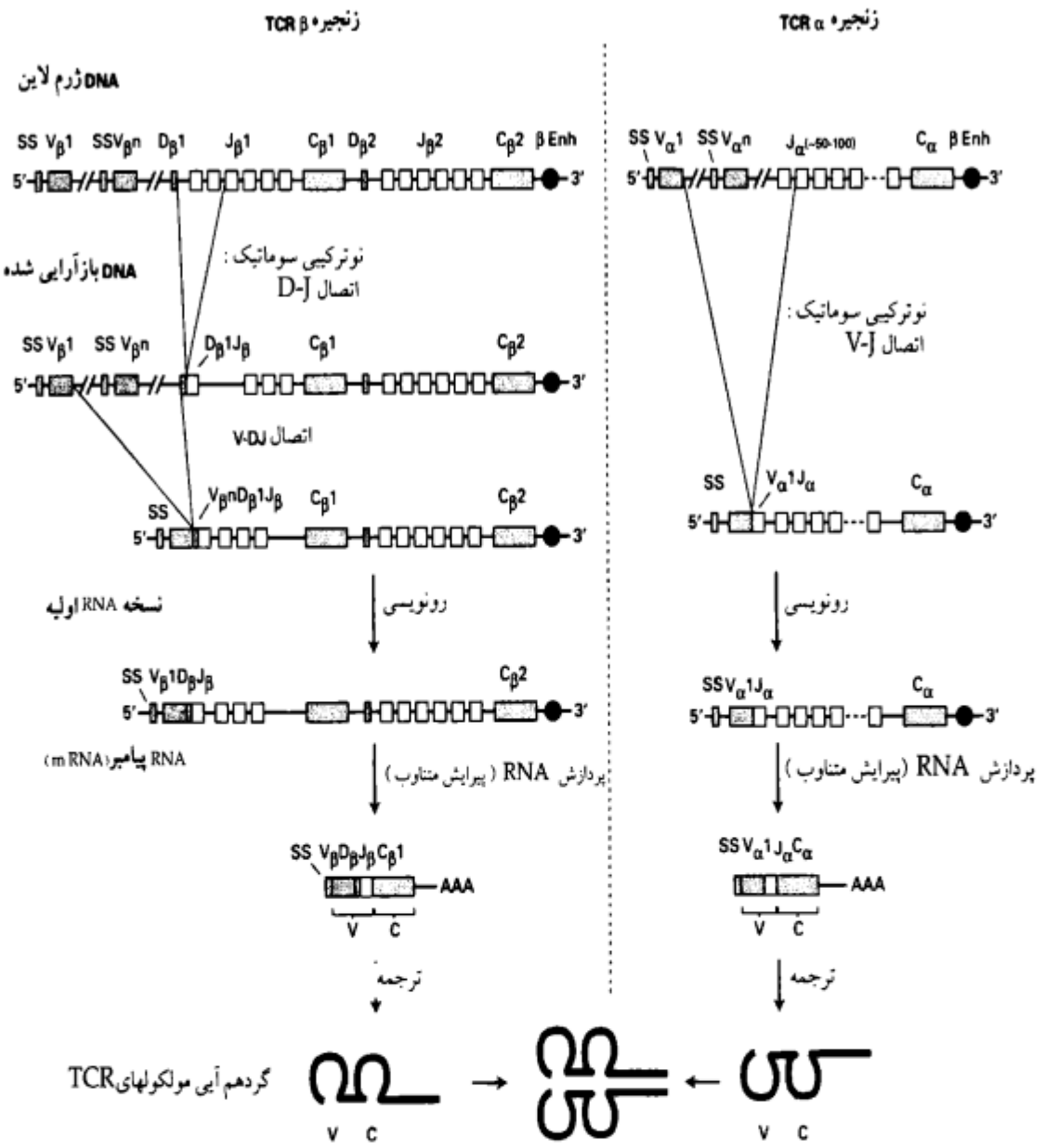
کنندهٔ $\gamma\delta$ در مناطق آناتومیکی مجزایی قرار گرفته‌اند تا عملکردهای اختصاصی را انجام دهند (به عنوان مثال: دیواره اپیتلیوم مجاری تناسلی، پوست) و احتمالاً نقش مهمی را در دفاع میزبان در مقابل پاتوژن‌های رایج موجود در این مناطق بر عهده دارند.

نقص در اجزای کلیدی نوترکیبی سوماتیک مانند ریکامبیناز RAG مانع از باز آرایی ژن‌های TCR می‌شود و همان گونه که برای مولکول‌های B گفته شد و در مطالب زیر نیز برای سلول‌های T گفته خواهد شد تکامل لنفوسیت‌ها بسیار وابسته به باز آرایی ژن‌های گیرنده آنتی‌ژنی می‌باشد. نقص RAG موجب پیشگیری از تکامل سلول های B و T می‌شود.

TCR ها به علت وجود تعداد زیادی ریشه‌های متنوع که در نواحی اتصالی بین قطعات V، D و J ایجاد می‌شود، متنوع تر می‌شوند

تنوع ایجاد شده توسط باز آرایی سوماتیک ژن‌های TCR، فوق‌العاده زیاد می‌باشد و تخمین زده می‌شود که بیش از 10^{10} گیرنده سلول‌های T در این روش تولید شود. نوترکیبی ژن‌های V، D و J نقش مهمی را مشابه مکانیسم‌های متنوع در اتصال و اضافه شدن نوکلئوتیدهای N ایفا می‌کند و در نتیجه موجب ایجاد درجه‌ای از تنوع در مناطق V می‌شود که با نواحی CDR3 ایمونوگلوبولین مطابقت دارد (۱۲-۲۴). بر خلاف ژن‌های ایمونوگلوبولین، ژن‌های TCR تحت مکانیسم جهش سوماتیک قرار نمی‌گیرند و در نتیجه بلوغ میل پیوندی نیز در آنها دیده نمی‌شود.

ساختار کریستالی تعدادی از گیرنده‌های سلول‌های T (TCRs)



▲ **شکل ۳۰-۲۴ سازماندهی و باز آرایی لوکوس ژنی TCR.** سازماندهی لوکوس ژنی TCR اساساً مشابه با لوکوس ژنی ایمونوگلبولین می‌باشد (شکل ۱۴-۲۴). (چپ) لوکوس زنجیره TCR B شامل قطعات متعدد V، D و تعدادی قطعه J می‌باشند و در سمت فرو دست آنها نیز دو قطعه ژنی ثابت وجود دارد. پیام‌های باز آرایی به گونه‌ای است که نه تنها موجب اتصال D-J می‌شود بلکه همچنین اجازه اتصال V-DJ را نیز می‌دهند. اتصال مستقیم V-J لوکوس TCR B در این شکل نشان داده‌نشده است. (راست) لوکوس زنجیره TCR α مرکب از قطعات V متعدد و نیز تعداد زیادی قطعه J می‌باشد. S = اگزون کد کننده توالی پیام‌دهنده، Enh = افزاینده

که به کمپلکس پپتید ـ MHCI و یا کمپلکس پپتید ـ MHCII متصل شده‌اند مشخص شده است. با توجه به این ساختارها، تنوع زیادی در چگونگی اتصال TCR ها با کمپلکس پپتید ـ MHC نشان داده شده، اما بیشترین تماس در ناحیهٔ CDR3 که به قسمت پپتیدی مرکزی کمپلکس اتصال می‌یابد و همچنین CDR1 و CDR2 که به قسمت‌های α - هلیکس مولکول MHC اتصال می‌یابند، دیده می‌شود. بیشتر TCR هایی که ساختارشان مشخص شده است، بطور مورب مقابل شیار اتصال شونده پپتیدی کمپلکس پپتید ـ MHC قرار می‌گیرند و در نتیجه تماس وسیعی را با پپتید (پپتید موجود در کمپلمکس پپتید ـ MHC) علاوه بر α هلیکس‌های مولکول‌های MHC که به آن متصل شده است، برقرار می‌کنند. وضعیت قرارگیری آلل‌های مولکول‌های MHC از یکدیگر متفاوت می‌باشد و بیشتر اوقات ریشه‌هایی از TCR که در تماس مستقیم قرار

دارند را درگیر می‌کند و بدین ترتیب از اتصال محکم آلل‌های MHC نامناسب جلوگیری می‌کند.

تفاوت‌های اسید آمینه‌ای علاوه بر این که موجب تمایز بین آلل‌های MHC می‌شود، بر ساختار شیار اتصال شونده به پپتید نیز تأثیر می‌گذارد. حتی اگر ریشه‌هایی از MHC که در تماس مستقیم با TCR قرار می‌گیرند در دو آلل MHC مشترک باشند، اختصاصیت ناحیه اتصال شونده به پپتید به علت وجود اسیدهای آمینه‌ای مختلف در شیار اتصال شونده به پپتید متفاوت از یکدیگر خواهد بود. در نتیجه TCR با ریشه‌هایی تماس حاصل می‌کند که به وسیله پپتید اتصال یافته به MHC فراهم شده‌اند که برای اتصال پایدار TCR نیز ضروری بوده و موجب جلوگیری از واکنش با کمپلکس پپتید ـ MHC نامناسب می‌شود و اتصال واکنش ناموفق TCR را از بین می‌برد.

پیام‌های دریافتی از طریق گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن موجب تکثیر و تمایز سلول‌های B و T می‌شود

هر دو BCR و TCR اختصاص آنتی‌ژن پیام‌ها را از طریق پروتئین هایی که همراه خودشان (زنجیره سبک و سنگین برای ایمونوگلوبولین و زنجیره α و β برای TCR) وجود دارند، دریافت می‌کنند. قسمت های سیتوزولی گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن بسیار کوتاه می‌باشند و نمی‌توانند پیام‌ها را در بخش سیتوزولی غشای پلاسمایی به پیش ببرند و قادر به فرا خوانی مولکول‌های پیام‌دهنده رو به پائین نیز نمی باشند. در حقیقت همان گونه که قبلاً بحث شد گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن روی سلول‌های B و T با زیر واحدهای کمکی که شامل ITAM هستند همراه می‌شوند. (ITAM= موتیف‌های فعال سازی با ساختار تیروزین در پذیرنده ایمنی). اتصال گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن به لیگاند مورد نظر یک سری وقایعی را در نزدیکی گیرنده آغاز می‌کند از جمله: فعال شدن کینازها، تغییراتی روی ITAM ها و فرا خوانی بعدی مولکول‌های آداپتیو که به عنوان ساختاری پایه برای فراخوانی دیگر مولکول‌های علامت دهنده رو به پائین عمل می‌کنند.

همان طوری که در شکل ۳۱-۲۴ خلاصه شد، اتصال گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن به آنتی‌ژن، تیروزین کینازهایی را از خانواده Src فعال می‌کند. (به عنوان مثال Lck در CD4 سلول‌های T، Lyn و Fyn در سلول‌های B). این کینازها در مجاورت نزدیک یا از لحاظ فیزیکی همراه با گیرنده‌های آنتی‌ژنی یافت می‌شوند. کینازهای Src فعال، ITAM ها را در زیر واحدهای کمکی گیرنده‌های آنتی‌ژن فسفریله می‌کنند. ITAM های فسفریله شده نیز موجب فرا خوانی و فعال سازی تیروزین کینازهای متفاوت از خانواده Src (به عنوان مثال ZAP-70 در سلول‌های T و Syk در سلول‌های B)، علاوه بر مولکول‌های آداپتیو دیگر می‌شوند. فرا خوانی و فعال سازی این مولکول‌ها، ایزوفرم γ آنزیم فسفولیپاز C اختصاصی فسفو اینوزیتید و آنزیم فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز (PI3 kinase) را فعال می‌کند. رویدادهای رو به پائین بعدی مشابه با رویدادهای انتقال پیام از طریق تیروزین کیناز می‌باشد که در فصل ۱۶ بیان شد. بالاخره فرایند انتقال پیام از طریق گیرنده اختصاصی آنتی‌ژن، موجب شروع فرایند رو نویسی شده و سرنوشت نهایی لنفوسیت‌های فعال شده (تکثیر و تمایز) را تعیین می‌کند.

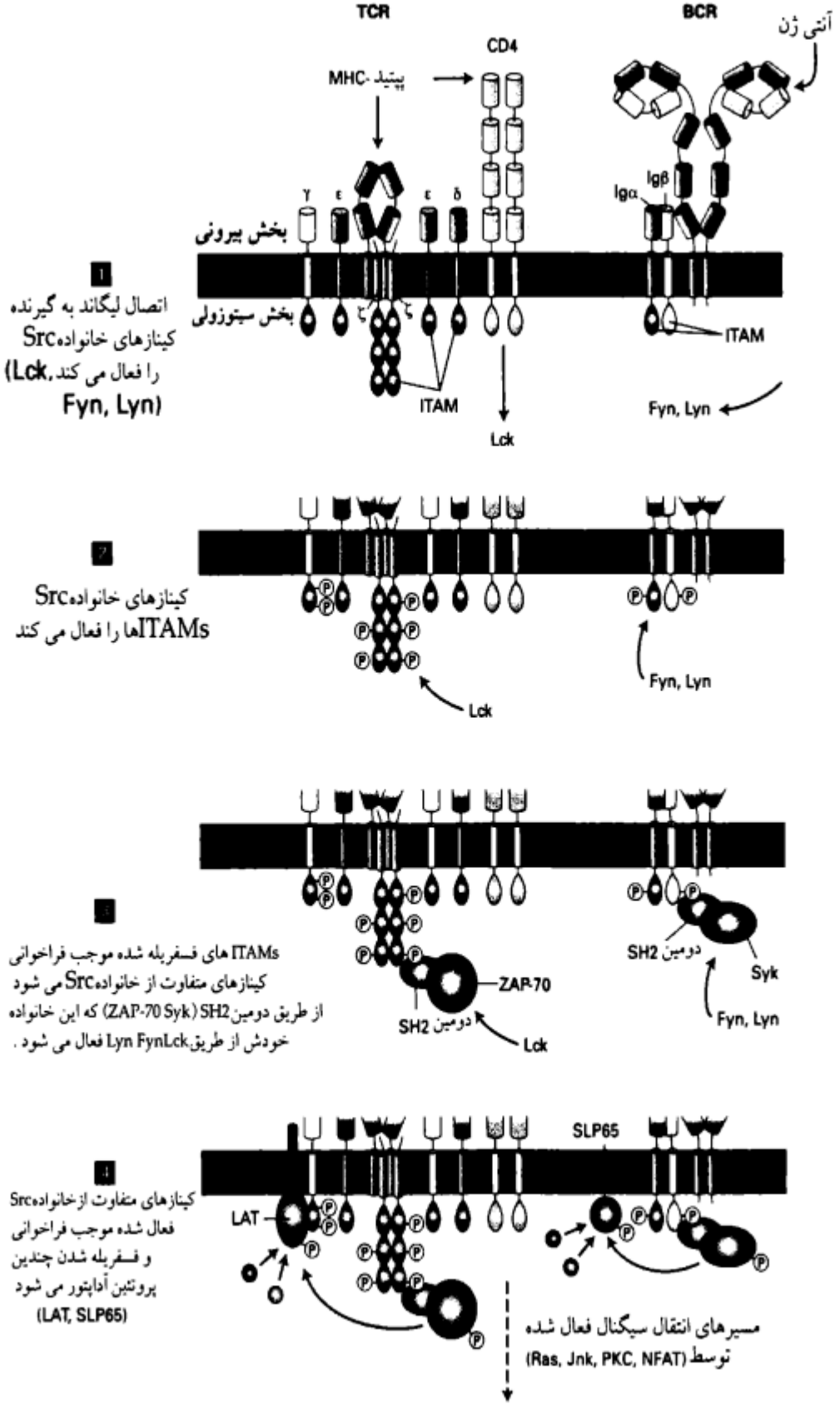
سلول‌های T جهت تکثیر شان به مقدار فراوانی سایتوکاین IL-2 وابسته هستند. IL-2 یکی از اولین ژن‌هایی است که به دنبال تحریک آنتی‌ژن سلول‌های T، بیان می‌شود. پاسخ سلول‌های T به افزایش ناگهانی اولیه IL-2 و همچنین ادامه سنتز بیشتر IL-2، مثالی از تحریک اتوکرین[1] و قسمتی از حلقه فیدبک مثبت محسوب می‌شود. فاکتور رو نویسی مهمی که برای القای سنتز IL-2 مورد نیاز می‌باشد پروتئینی به نام NF-AT[2] (فاکتور هسته‌ای سلول‌های T فعال شده) می‌باشد. این پروتئین در داخل سیتوپلاسم به فرم فسفریله وجود دارد و نمی‌تواند وارد هسته سلول شود مگر این که ابتدا به فرم دفسفریله تبدیل شود. دفسفریله کردن NF-AT بر عهده فسفاتازی به نام کلسی نورین است که آنزیمی فعال شونده توسط Ca^{2+} می‌باشد. بدین صورت که هیدرولیز PIP2 منجر به تولید همزمان IP3 می‌شود که بر روی ذخیره کلسیمی شبکه آندوپلاسمی اثر کرده و موجب افزایش Ca^{2+} سیتوزولی شده که در نهایت کلسی نورین را فعال می‌کند (برای مطالعه بیشتر به مراحل ❷ و ❹ شکل ۳۰-۱۵ مراجعه کنید).

داروی مهار کننده ایمنی به نام سیکلو سپورین[3] فعالیت کلسی نورین را از طریق تشکیل سیکلوسپورین ـ سیکلوفیلین مهار می‌کند. بدین ترتیب که اگر عمل دفسفریله کردن NF-AT مهار شود دیگر NF-AT نمی‌تواند وارد هسته شود و در تنظیم مثبت رو نویسی ژن IL-2 شرکت کند و در نتیجه از گسترش سلول‌های T تحریک شده جلوگیری به عمل آمده و منجر به مهار ایمنی می‌شود. مسلماً سیکلوسپورین مهم‌ترین مداخله کننده منفرد

1- Autocrine

2- Nuclear factor of activated T cells

3- Cyclosporine



▲ **شکل ۳۱-۲۴ انتقال پیام از طریق گیرنده‌های سلول T (TCR) و گیرنده‌های سلول B (BCR).** مسیر انتقال پیام به کار رفته توسط گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن سلول‌های T (چپ) و سلول های B (راست) مشابه یکدیگر می‌باشد. مراحل اولیه در شکل ترسیم شده است. وقایع پیام‌دهنده رو به پائین منجر به تغییراتی در بیان ژن‌ها می‌شود و موجب تکثیر و تمایز لنفوسیت‌های تحریک شده توسط آنتی‌ژن می‌شود (برای بحث بیشتر به متن مراجعه کنید).

می‌باشد که به پیوند موفق یک اندام کمک می‌کند. اگرچه درجه موفقیت اندام پیوندی با توجه به نوع اندام متغیر است اما در دسترس بودن مهار کننده ایمنی قوی مثل سیلکوسپورین احتمال پیوندهای بالینی را به طور فوق العاده زیادی‌افزایش می‌دهد.

سلول‌های T از طریق فرایندهای انتخاب مثبت و انتخاب منفی تکامل یافته و توانایی شناسایی مولکول‌های MHC را کسب می‌کنند.

باز آرایی قطعات ژنی که گیرنده عملکردی سلول‌های T را بوجود می‌آورند یک رویداد اتفاقی محسوب می‌شود که در آن، سلول‌های T بدون هیچ آگاهی از مولکول های MHC که در نهایت توسط TCR خود با این مولکول‌ها واکنش خواهند داد تکامل می‌یابد. قطعات ژنی اولیه TCR مشابه با نوترکیبی سوماتیک لوکوس زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در سلول های B، برای بازآرایی قطعات D و J مربوط به زنجیره βی TCR می‌باشد که به دنبال آن نیز اتصال قطعه V با DJ جدیداً باز آرایی شده و صورت می‌گیرد. در این مرحله از تکامل سلول‌های T، باز آرایی موفق منجر به سنتز زنجیره βی TCR می‌شود که با زیر واحد αی Pre-T همراه شده و Pre-TCR ایجاد می‌کند. عملکرد این گیرنده بسیار مشابه Pre-BCR می‌باشد که در سیر تکاملی سلول‌های B بوجود می‌آید. سلول‌های Pre-TCR که تحت باز آرایی موفق قرار گرفته باشند گسترش می‌یابند. بدین ترتیب که باز آرایی موفق منجر به حذف آللی می‌شود و به عنوان یک قانون، فقط زیر واحد منفرد عملکردی زنجیره βی TCR برای سلول‌های T مورد نظر و اَخلاف آنها تولید می‌شود. بعد از این که مرحله گسترش سلول‌های Pre-T کامل شد باز آرایی لوکوس αی TCR شروع می‌شود و در نهایت منجر به تولید سلول‌های T با گیرنده‌های کاملاً گرد هم آوری شده $\alpha\beta$ TCR می‌شود. شکل ۲۲-۲۴ مرحله مشابه را در تکامل سلول‌های B و T نشان می‌دهد.

چگونه گنجینه جدیداً تولید شده سلول‌های T، قادر به انجام واکنش موفق با مولکول‌های MHC خودی می‌شود؟ خصوصیت تصادفی فرایند باز آرایی ژنی و وجود تنوع فوق‌العاده در آنها، موجب تولید مجموعه‌ای از گیرنده‌های سلول‌های T می‌شود که اکثریت آنها قادر به انجام واکنش موفق با مولکول‌های MHC میزبان نمی‌باشند به خاطر آورید که پردازش و ارائه آنتی‌ژن جزو وقایع اولیه‌ای محسوب می‌شود که در تیموس انجام می‌گیرد. همه مولکول‌های MHC خودی لزوماً با پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های خودی همراه می‌شوند. زمانی که مخلوطی از پپتیدهای خودی با مولکول‌های MHC کلاس I و II ترکیب می‌شوند موجب ایجاد کمپلکس‌های اولیه‌ای می‌شوند که باید بر روی این مجموعه اولیه گیرنده‌های سلول‌های T، تنظیم اعمال شود.

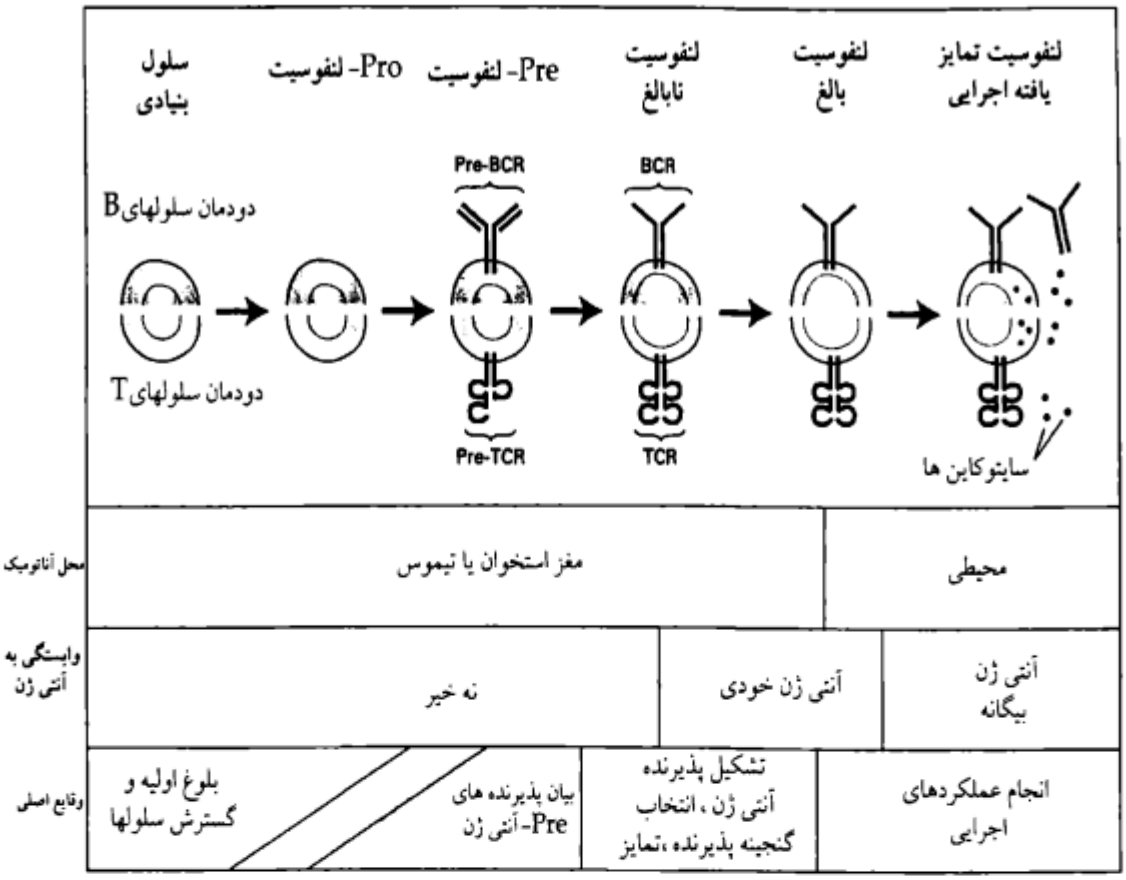
سلول‌های T تولیدی که گیرنده هایشان قادر به واکنش با مولکول‌های MHC خودی نیستند بی فایده می‌باشند. چنین سلول‌های T قادر به دریافت پیام‌های بقاء از سوی گیرنده‌های سلول T جدیداً تولید شده نبوده و محکوم به مرگ می‌باشند. از طرف دیگر سلول‌های Tای می‌توانند تولید شوند که حاوی گیرنده‌هایی هستند که اتصال محکمی را با مولکول‌های MHC خودی که حمل کننده پپتیدهای خودی معینی هستند برقرار می‌کنند. اگر چنین سلول‌های T، تیموس را ترک کرده و در اندام‌های لنفوئیدی محیطی لانه گزینی کنند می‌توانند بر علیه بافت‌های خودی واکنش دهند و باعث بیماری‌های خود ایمنی شوند. اگر تعداد کمپلکس‌های پپتید ـ MHC خودی از حد آستانه‌ای که برای به راه انداختن TCR ها کافی است، فراتر برود، این سلول‌ها آموزشهای لازم را می‌بینند تا تحت روند آپوپتوز[1] قرار بگیرند. این فرایند را انتخاب منفی می‌نامند که سعی دارد سلول‌های غیر واکنش‌دهنده را از سلول‌های T که برعلیه بافت‌های خودی به صورت بارزی واکنش می‌دهند، جدا کند. هر سلول T دارای گیرنده، پیام‌هایی را که به اندازه کافی قوی باشند و منجر به بقا سلول شوند و از طرف دیگر زیر حد آستانه‌ای باشد که سلول‌ها را مجبور به آپوپتوز نکند دریافت کنند تحت فرایند انتخاب مثبت قرار گرفته‌اند.

ناهمگونی کمپلکس‌های پپتید ـ MHC سلول‌های T که تحت فرایند انتخاب مثبت و منفی قرار می‌گیرند احتمال این که TCRها میزان پیام‌ها را توسط عمل جمع (جمع دریافتی) تغییر بدهند بسیار بالا می‌برد. به عبارت دیگر مجموع انرژی اتصالی کمپلکس‌های پپتید ـ MHC خودی مختلف، نتیجه فرایند انتخاب مثبت و منفی را معین می‌کند که مدل اویدیتی انتخابی سلول‌های T[2] نام دارد.

اگر آنتی‌ژن‌های خودی به اندازه کافی در تیموس به صورت کمپلکس پپتید ـ MHC ارائه شود موجب آپوپتوز سلول‌های T خود واکنش دهنده می‌شود. اما پروتئین هایی که در بافت‌های اختصاصی بیان می‌شوند مثل انسولین در سلول‌های بتای پانکراس یا اجزای میلینی در سیستم عصبی، تحت روند آپوپتوز قرار نمی‌گیرند. البته

1- Apoptosis

2- Avidity model of T-cell selection

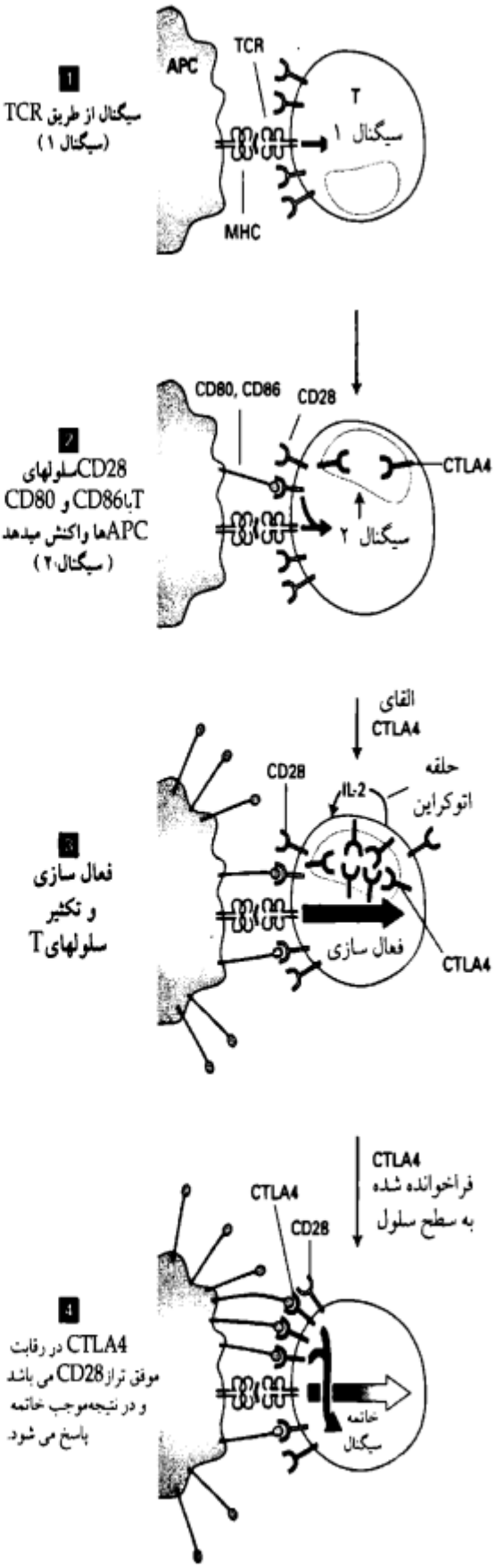


▲ **شکل ۳۲-۲۴ (شکل رنگی) مقایسه تکامل سلول‌های T و سلول‌های B.** اهداف نهایی سلول به وسیله گیرنده هایی مرکب از زنجیره μ جدیداً باز آرایی شده Pre-BCR با زنجیره β جدیداً باز آرایی شده در Pre-TCR تحقق می‌یابد. گیرنده‌های سلول‌های Pre-B و Pre-T عملکردهای بسیار مشابهی دارند به عنوان مثال گسترش سلول هایی که به طور موفقیت‌آمیزی باز آرایی را پشت سر گذاشته‌اند و همچنین حذف آللی. این مرحله از تکامل لنفوسیت‌ها به شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن نیاز ندارد. Pre-BCR و Pre-TCR حاوی زیر واحدهای منحصر به فردی می‌باشند که در پذیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن مربوط به سلول‌های بالغ یافت نمی شود: V Pre B و λ_5 (نارنجی، سبز) مربوط به Pre-BCR، Pre-Tα (آبی) مربوط به Pre-TCR. بعد از تکمیل مرحله گسترش سلول‌ها بیان ژن‌های کد کننده مابقی زیر واحدهای پذیرنده اختصاصی آنتی‌ژن شروع می‌شود: زنجیره سبک ایمونوگلوبولین (آبی روشن) مربوط به BCR، زنجیره TCR α (قرمز روشن) مربوط به TCR. تکامل لنفوسیت‌ها و تمایز آنها در محل‌های آناتومیکی مجزا از هم صورت می‌گیرد و فقط پذیرنده های اختصاصی آنتی‌ژن کاملاً گرد هم آمده (BCR و TCR) قادر به شناسایی آنتی‌ژن می‌باشند. لنفوسیت‌های بالغ برای فعال شدن به طور کامل به شناسایی آنتی‌ژن وابسته می‌باشند.

فاکتوری به نام AIRE[1] (تنظیم‌کننده خود ایمنی) منجر به تولید زیر مجموعه‌ای از سلول‌های اپی تلیال می‌شود که حاوی آنتی‌ژن‌های اختصاصی بافت می‌باشند. مکانیسم عملکرد AIRE شناخته شده نیست اما بیشتر تصور بر این است که تنظیم مستقیم رو نویسی ژن‌های مربوطه، در این مکانیسم دخیل باشد. نقص در AIRE، منجر به شکست میان آنتی‌ژن‌های اختصاصی بافت در تیموس می‌شود. در افرادی که AIRE بیان نمی شود سلول‌های T در مسیر تکاملی خود در تیموس نمی‌توانند آموزش‌های کاملی را که منجر به حذف سلول‌های بالقوه خود واکنش دهنده می‌شود دریافت کنند. در نتیجه این افراد مجموعه‌ای از پاسخ‌های گیج کننده خود ایمنی که منجر به تخریب وسیع بافت‌ها می‌شود را نشان می‌دهند.

باز آرایی TCR به طور همزمان با کسب تدریجی کمک گیرنده‌های CD4 و CD8 صورت می‌گیرد. سلول‌های حد واسط اصلی در تکامل سلول‌های T، تیموسیت هایی می‌باشند که CD4 و CD8 را علاوه بر کمپلکس TCR-CD3 عملکردی بیان می‌کنند. چنین سلول‌هایی، دو گانه مثبت (CD4، CD8) نامیده می‌شوند

1- Autoimmune regulator



◀ شکل ۳۳-۲۴ پیام‌های موثر در شروع و خاتمه فعالیت سلول‌های T. مدول دو پیامی فعال‌سازی سلول‌های T شامل کمپلکس پپتید ـ MHC توسط TCR که پیام (❶) را تشکیل می‌دهد و شناسایی مولکول‌های کمک محرک (CD86 , CD80) سطح سلول‌های پردازش‌کننده آنتی‌ژن توسط CD28 پیام (سیگنال)۲ (❷) را تشکیل می‌دهد می‌باشد. اگر مولکول‌های کمک محرک وجود نداشته باشند سلول‌های T که جدیداً با آنتی‌ژن برخورد کردند بی پاسخ (آنرژیک) می‌شوند. فراهم شدن پیام ۱ از طریق گیرنده‌های سلول T و پیام ۲ از طریق اتصال CD28 به CD80 و CD86 موجب فعال شدن کامل سلول‌ها می‌شود. به دنبال فعال شدن کامل سلول‌های T، بیان CTLA4 افزایش می‌یابد (❸). بعد از جابجایی که در سطح سلول‌های T صورت می‌گیرد مولکول‌های CTLA4 به CD80 و CD86 متصل شده و منجر به مهار پاسخ‌های سلول‌های T می‌شود (❹). چون میل پیوندی CTLA4 به CD80 و CD86 بیشتر از CD28 می‌باشد نهایتاً فعال‌سازی سلول‌های T خاتمه می‌یابد.

و فقط به عنوان حد واسط‌های تکاملی در تیموس یافت می‌شوند. با توجه به این که کدام گیرنده CD4 و CD8 انتخاب شود، سلول‌های T به MHC-I و یا MHC-II پاسخ می‌دهند. نحوه آموزش سلول‌های CD4 CD8 جدیداً تولید شده به منظور تبدیل به سلول‌های $CD4^+$ T (محدود شده به MHC-I) و یا سلول‌های $CD8^+$ T (محدود به MHC-II) هنوز به طور کامل مورد توافق واقع نشده است.

سلول‌های T جهت فعال شدن کامل به دو پیام نیاز دارند

تمام سلول‌های T برای فعال شدن از طریق گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژن TCR به یک پیام نیاز دارند اما این پیام کافی نیست و سلول‌های T به پیام‌های کمک تحریکی بیشتری نیاز دارند. سلول‌های T به منظور دریافت پیام‌های کمکی تحریکی بر روی سطح خود، چندین گیرنده متعدد را دارا می‌باشند که مولکول CD28 شناخته شده‌ترین مولکول در این مورد است. مولکول‌های CD28 سطح سلول‌های T با CD80 و CD86 روی سلول‌های پردازش کننده آنتی‌ژن (APC_s) واکنش می‌دهد. سلول‌های پردازش کننده آنتی‌ژن پیام‌های تحریکی مناسب برای مثال از طریق گیرنده‌های شبه تول (TLR)[1] را دریافت می‌کنند و منجر به تنظیم مثبت بیان CD80 و CD86 بر روی خودشان می‌شوند. پیام‌های فرستاده شده از طریق CD28 موجب تقویت پیام‌های ناشی از TCR می‌شود که همه آنها برای فعال شدن کامل سلول‌های T ضروری می‌باشند (شکل ۳۲-۲۴).

به محض این که سلول‌های T فعال شدند گیرنده‌های تضعیف کننده یا مهاری که خیلی مشابه با مولکول‌های کمک تحریکی می‌باشند بیان می‌کنند. پروتئین CTLA4 که بیان آن روی سلول‌های T فقط بعد از فعال شدن سلول‌های T القا می‌شود و با مولکول‌های CD28 جهت اتصال به CD80 و CD86 رقابت می‌کند به علت این که میل پیوندی CTLA4 به CD80 و CD86 بالاتر از CD28 به CD80 و CD86 می‌باشد در نهایت پیام‌های مهاری مولکول CTLA4 بر پیام‌های تحریکی CD28 غلبه می‌کند. بنابراین مولکول‌های کمک تحریکی می‌توانند از نوع تحریکی یا مهاری باشند و نقش مهمی را در فعال سازی و مدت زمان پاسخ‌های سلول‌های T ایفا کنند.

سلول‌های T سیتوتوکسیک حاوی مولکول CD8 بوده و برای کشتن سلول‌ها اختصاص یافته‌اند.

همان طوری که می‌دانیم، سلول‌های T سیتوتوکسیک را لنفوسیت‌های T سیتولیتیک (CTLs) نیز می‌نامند که عمدتاً گلیکوپروتئین CD8 را حمل می‌کنند و وظیفهٔ آنها شناسایی مولکول‌های MHC-I می‌باشد و به آنها، سلول‌های محدود به MHC-I هم می‌گویند. CTL ها سلول هایی را که کمپلکس پپتید ـ MHC مناسبی را ارائه کند، مورد هدف قرار داده و این عمل را با حساسیت بالایی انجام می‌دهند. سلول‌های T CD8 که به طور مناسبی حساس شده‌اند می‌توانند سلول‌های هدف را که دارای تعداد کافی از یک کمپلکس منفرد پپتید ـ MHC می‌باشند، از بین ببرند.

در مکانیسم کشتن سلول‌ها توسط CTL ها، دو پروتئین به نام‌های پرفورین[1] و گرآنزیم[2] نقش دارد که به صورت هم‌افزایی عمل می‌کنند (شکل ۳۴-۲۴). پرفورین‌ها همولوگ اجزای انتهایی آبشار کمپلمان می‌باشند که تشکیل دهنده MAC (کمپلکس حمله کننده به غشاء)[3] می‌باشند و به غشاء سلول هدف متصل شده و سوراخ‌هایی را حداکثر به قطر ۲۰ نانومتر در غشاء ایجاد می‌کنند و نفوذپذیری انتخابی غشاء را به هم زده و منجر به از دست رفتن الکترولیت‌ها و مواد محلول کوچک شده و مرگ سلول‌ها اتفاق می‌افتد. گرآنزیم‌های تولید شده توسط سلول‌های CTL احتمالاً از طریق سوراخ‌های ایجاد شده توسط پرفورین وارد سلول‌های هدف می‌شوند. گرآنزیم‌ها سرین پروتئازهایی هستند که کاسپازهای مجری را فعال کرده، بنابراین سلول‌ها را به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) سوق می‌دهند. پرفورین‌ها و گرآنزیم‌ها در داخل گرانول‌های سیتوتوکسیک بسته‌بندی شده و در داخل سلول‌های TC ذخیره می‌شوند. بعد از اتصال TCR به آنتی‌ژن، گرانول‌های سیتوتوکسیک و محتوای درون آنها به شیاری که بین TC و سلول‌های هدف تشکیل شده، آزاد می‌شوند. چگونگی رهایی سلول‌های T از کشته شدن توسط گرآنزیم‌ها و پرفورین‌های آزاد شده در شیار سیناپسی هنوز مشخص نشده است. سلول‌های کشنده طبیعی علاوه بر پرفورین و گرآنزیم از فعالیت سیتوتوکسیسیتهٔ خود نیز به منظور از بین بردن سلول‌های مورد هدف استفاده می‌کنند (شکل۵-۲۴).

سلول‌های T سایتوکاین‌های زیادی را تولید می‌کند که پیام‌هایی برای سلول‌های اصلی دیگر محسوب می‌شود.

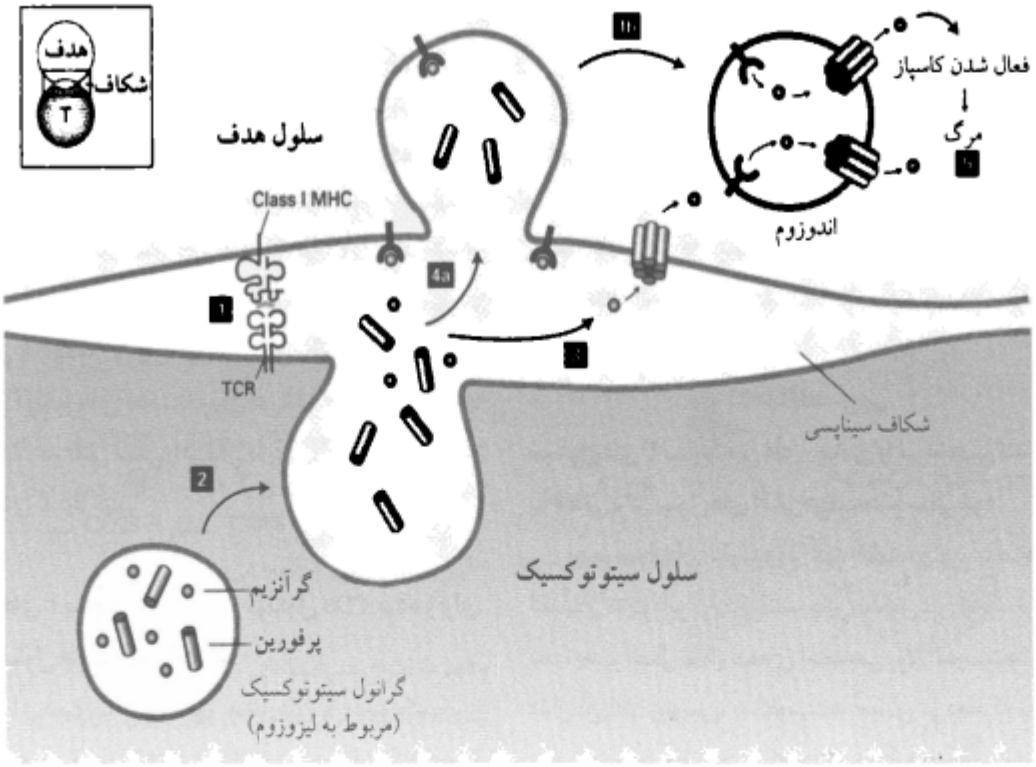
اغلب سلول‌های لنفوئیدی و غیر لنفوئیدی ، در بافت‌های لنفوئیدی سایتوکاین تولید می‌کنند. چنین مولکول‌های کوچک ترشح شده، بعد از اتصال به گیرنده‌های اختصاصی روی لنفوسیت‌ها و به دنبال آن آغاز رونویسی، به لنفوسیت‌ها آموزش می‌دهند که تکثیر یابند و به سلول‌های مجری که آماده برای انجام فعالیت سیتو توکسیک (CD8 Tcells) یا فعالیت یاری دهنده (CD4 Tcells) و یا ترشح آنتی‌بادی (B cells) می‌باشند تمایز یابند. به علت این که سایتوکاینها عمدتاً توسط لکوسیت‌ها تولید و بر روی لکوسیت ها اثر می‌گذاشتند اینترلوکین[4] نامیده شدند. حداقل ۲۷ اینترلوکین شناسایی شده و از لحاظ مولکولی ساختارشان مشخص شده است. اینترلوکین هایی که ساختارشان مشابه است توسط گیرنده‌های هم خانواده با ساختارهای مشابه مورد شناسایی قرار می‌گیرند. گیرنده IL-2 نمونه کاملاً شناخته شده به خصوص در این مورد است. IL-2 به عنوان فاکتور رشد سلول‌های T و یکی از اولین سایتوکاین‌های تولید شده در زمان فعال شدن سلول‌های T محسوب می‌شود. IL-2 به عنوان فاکتور رشد اتوکرین عمل کرده و موجب گسترش سلول‌های T فعال شده می‌شود.

اینترلوکین 4 (IL-4) که توسط سلول‌های CD4 T تولید می‌شود موجب تکثیر، تغییر ایزوتایپی و جهش‌های سوماتیک در سلول‌های B می‌شود. اینترلوکین 7 (IL-7) تولید شده توسط مولکول‌های سوماتیک در مغز استخوان، برای تکامل سلول‌های B و T از پیش سازهای متعهد شده ضروری می‌باشد. هر دو منجر به حفظ

1- Perforin 2- Granzyme

3- Membrane Attack Complex

4- Interleukin



▲ **شکل ۳۴-۲۴ کشتن سلول به واسطه پرفورین و گرآنزیم تولید شده توسط سلول‌های T سیتو توکسیک.** به دنبال شناسایی سلول‌های هدف (❶)، سلول‌های T سیتوتوکسیک تماس محکم اختصاصی را با آنتی‌ژن‌های سلول‌های هدف برقرار می‌کنند. این تماس محکم منجر به تشکیل فضای سیناپتیکی می‌شود که محتویات گرانول‌های سیتوتوکسیک در آنجا آزاد می‌شود. (❷). محتویات این گرانول‌ها شامل پرفورین و گرآنزیم می‌باشد. پرفورین سوراخ هایی را در غشایی که به طرف آن جذب شده است ایجاد می‌کند و گرآنزیم‌ها که سرین پروتئاز هستند از طریق سوراخ‌های ایجاد شده توسط پرفورین وارد سلول می‌شوند. (❸). اعتقاد بر این است که پر فورین نه تنها روی سلول‌های هدف عمل می‌کند بلکه بعد از این که از سطح سلول هدف جذب شده باشد، در سطح بخش‌های اندوزومی سلول‌های هدف قرار می‌گیرند (❹). گرآنزیم‌ها بلافاصله در سیتوپلاسم کاسپازها را فعال می‌کنند که موجب آغاز مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شوند (❺).

سلول‌های T خاطره[1] می‌شوند که تجربه برخورد قبلی با آنتی‌ژن را دارند و زمانی که بدن با همان آنتی‌ژن برخورد می‌کند این سلول‌ها به محل آنتی‌ژن فرا خوانده شده و به سرعت تکثیر می‌یابند و عامل مهاجم را از بین می‌برند.

انتقال پیام توسط گیرنده‌های سایتوکاین از طریق مسیر JAK/STAT صورت می‌گیرد که در فصل ۱۶ شرح داده شد. (برای مرور سریع به شکل ۱۶-۱۶ مراجعه کنید). از بین ژن‌های متعددی که تحت کنترل مسیر STAT می‌باشند پروتئین‌هایی مثل SOCS پیام‌های مهار کننده را ایجاد می‌کنند. این پروتئین‌ها توسط سایتوکاین‌ها القا می‌شوند و به JAK های فعال شده متصل شده و آنها را مورد هدف تخریب پروتئازومی قرار می‌دهند.

سلول‌های CD4 T را بر اساس سایتوکاین‌های تولیدی و مارکرهای سطحی شان به سه دسته بزرگ تقسیم بندی می‌کنند

عملکرد اصلی سلول‌های CD4 T کمک به سلول‌های B می‌باشد تا به پلاسما سل‌ها که آنتی‌بادی هایی با میل پیوندی بالا تولید می‌کنند، تمایز یابند. چنین عملی توسط سلول‌های T کمکی انجام می‌گیرد که نیازمند تولید و ترشح سایتوکاین‌ها و تماس مستقیم بین سلول‌های CD4 T و سلول‌های B می‌باشد.

دسته دوم از سلول‌های CD4 T به عنوان عاملین اصلی ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی محسوب می‌شوند. انواع متعدد سلول‌های CD4 T بر اساس تولید سایتوکاین‌های خاص و خصوصیات عملکردی شان تعریف می‌شوند. همه سلول‌های T فعال

شده IL-2 را تولید می‌کنند در حالی که سایتوکاین‌های دیگر توسط زیر مجموعه‌های خاصی از سلول‌های CD4 T تولید می‌شوند. سلول‌های CD4 T که IFN-γ و TNF تولید می‌کنند سلول‌های T_H1 و سلول هایی که IL-4 و IL-10 تولید می‌کنند، سلول‌های T_H2نامیده می‌شوند. سلول‌های T_H1 از طریق تولید IFN-γ ماکروفاژها را فعال کرده و موجب تحریک پاسخ‌های التهابی می‌شود که به آنها سلول‌های T التهابی [1] نیز می‌گویند. این سلول‌ها علاوه بر نقش مهمی که در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی ایفا می‌کنند به طور قابل توجهی تولید آنتی‌بادی‌های تثبیت کننده کمپلمان مثل IgG1 و IgG2 را تسهیل می‌کنند. سلول‌های T_H2 از طریق تولید IL-4 نقش مهمی را در پاسخ‌های سلول‌های B به عنوان مثال تغییر ایزوتیپ به ایزوتیپ‌های IgE و IgG ایفا می‌کنند. مجموعه سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های T و واکنش ما بین مولکول‌های CD40 القا شده روی سلول‌های T فعال شده و لیگاند CD40 روی سلول‌های B موجب القای تولید آنزیم AID می‌شود و سلول‌های B را برای تغییر ایزوتیپ و جهش‌های سوماتیک آماده می‌کند.

اخیراً زیر مجموعه‌ای از سلول های CD4 T شناخته شده است که آنها را سلول‌های T تنظیمی [2] می‌نامند. این سلول‌ها سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های T دیگر را مهار کرده و بدین ترتیب پاسخ‌های ایمنی را تضعیف می‌کنند. سلول‌های T تنظیمی فعالیت سلول‌های T بالقوه خود واکنش گر را محدود می‌کنند که این عمل برای حفظ تحمل مهم می‌باشد (تحمل: فقدان پاسخ‌های ایمنی به آنتی‌ژن‌های خودی).

لکوسیت‌ها در پاسخ به الگوی کموتاکتیک فراهم شده توسط کموکاین‌ها جابجا می‌شوند

اینترلوکین ها به وسیله برانگیختن مکانیسم‌های رونویسی موجب می‌شوند که لنفوسیت‌ها، عملکردهای مجری اختصاصی خود را انجام دهند. از طرف دیگر لکوسیت‌ها در پاسخ به کموکاین‌ها، مکان مورد نظر خود را می‌یابند. اغلب سلول‌ها، الگوهای کموتاکتیکی را در فرم کموکاین نشان می‌دهند. زمانی که آسیب بافتی اتفاق می‌افتد فیبروبلاست‌های مکان مورد نظر، شروع به تولید کموکاین،IL-8 کرده و نوتروفیل‌ها را به مکان آسیب می‌کشانند. تنظیم ترافیک لنفوسیت‌ها در گره‌های لنفی به منظور این که سلول‌های دندریتیک، سلول T را جذب کنند و سلول‌های B و T با یکدیگر واکنش دهند، ضروری می‌باشد. تمام مراحل تنظیم ترافیک لنفوسیت‌ها توسط کموکاین‌ها کنترل می‌شود.

تقریباً ۴۰ کموکاین مجزا و بیش از ۱۲ گیرنده کموکاین شناخته شده است. یک کموکاین ممکن است به بیش از یک گیرنده اتصال یابد و همچنین یک گیرنده منفرد به چندین کموکاین اتصال یابد. چنین روندی احتمال تولید یک کد را که الگوی کموتاکتیک بسیار پیچیده‌ای دارد، ممکن می‌سازد. این کد جهت حرکت لکوسیت‌ها را از جایی که تولید می‌شود مثلاً مغز استخوان به جایی که مقصد نهایی شان مثلاً جریان خون است را نشان می‌دهد.

بعضی کموکاین‌ها موجب می‌شوند که لنفوسیت‌ها جریان خون را ترک کرده و در اندام‌های لنفوئیدی ساکن شوند. چنین مهاجرتی به هر یک از اندام‌های لنفوئیدی کمک می‌کند که با توجه به نیازشان جمعیت لنفوسیتی خود را تکمیل کنند. به علت این که چنین جابجایی به عنوان بخشی از تکامل اندام‌های لنفاوی محسوب می‌شود کموکاین‌های مسئول این کار را کموکاین‌های لانه گزینی [3] می‌نامند و کموکاین‌هایی که عمل فراخوانی لکوسیت‌ها به محل التهاب و بافت‌های آسیب دیده را بر عهده دارند کموکاین‌های التهابی می‌نامند.

گیرنده‌های کموکاینی جزو گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G می‌باشند که عملکرد آنها یک مرحله ضروری در تنظیم چسبندگی و مهاجرت سلولی می‌باشد. لکوسیت‌ها در جریان رگ‌های خونی، تحت شرایط سرعت بالا و در معرض نیروی منقطع هیدرودینامیک بالایی قرار دارند. برای این که لکوسیت‌ها از اندوتلیوم عبور کنند و در گره‌های لنفی لانه گزینی کنند یا محل عفونت در بافت را جستجو کنند، در ابتدا باید سرعت خود را کم کنند که نیاز به فرایندی دارد که در آن عمل متقابل گیرنده‌های سطحی به نام سلکتین با لیگاندهایش که تقریباً به طور طبیعی کربوهیدرات هستند، صورت می‌گیرد. اگر کموکاین‌هایی که در مجاورت (ماتریکس) یافت می‌شوند، به ماتریکس خارج سلولی جذب شوند و اگر لکوسیت‌های دارای گیرنده برای آن کموکاین در آن محل وجود داشته باشد موجب فعال شدن گیرنده‌ها و تحریک پیام‌هایی می‌شود که منجر به تغییر ساختاری اینتگرین‌های روی لکوسیت‌ها می‌شود. چنین تغییری موجب افزایش تمایل اینتگرین به لیگاندش شده و باعث اتصال محکم لکوسیت‌ها می‌شود. اکنون ممکن است لکوسیت‌ها به وسیله فرایندی به نام extravasation (خروج از عروق) از رگ‌های خونی خارج شوند (شکل ۳۶-۱۹).

1- Inflammatory Tcells 2- Regulatory T cells

3- Homeostatic chemokines

نکات کلیدی بخش ۵-۲۴

سلول‌های T گیرنده‌های سلول T و تکامل سلول T

■ گیرنده‌های سلول T ویژه آنتی ژن پروتئین‌های دیمری حاوی زیرواحدهای α و β یا γ و δ می‌باشد. سلول‌های T بر اساس بیان گلیکوپروتئین همراه گیرنده‌ای CD4 و CD8 حداقل در دو کلاس مهم قرار می‌گیرند (شکل ۲۹-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ سلول‌هایی که مولکولهای MHC کلاس نوع I را به عنوان عناصر محدودی بکار می‌برند حاوی CD8 هستند و آنهایی که مولکولهای MHC کلاس نوع II را بکار می‌برند حاوی CD4 هستند. این کلاس از سلول‌های T از لحاظ عملکردی متفاوت هستند. سلول‌های T CD8 سلول‌های T سیتوتوکسیک هستند ؛ سلول‌های T CD4 به سلول‌های B کمک کرده ومنبع مهمی از سیتوکین‌ها می‌باشند.

■ ژنهای کدکننده زیرواحدهای TCR توسط نوترکیبی سوماتیکی قسمت‌های J,V (زنجیره α) و قسمت‌های D,V و J (زنجیره β) تولید می‌شوند ؛ بازآرایی آنها از همان قوانین مشابهی که برای بازآرایی ژنهای Ig در سلول‌های B تعریف شد تبعیت می‌کنند (شکل ۳۰-۲۴ را ملاحظه کنید). بازآرایی ژنهای TCR در تیموس و فقط در آن سلول‌هایی که قرار است به لنفوسیت‌های T تبدیل شوند صورت می‌گیرد.

■ یک گیرنده کامل سلول T شامل کمپلکس همراه CD3 است که برای انتقال پیام مورد نیاز می‌باشد. هر زیرواحد از کمپلکس CD3 در دم سیتوپلاسمی خود یک یا سه دُمین ITAM دارد ؛ هنگامیکه فسفریله می‌شود این ITAMها مولکولهای ضروری لازم در انتقال پیام را سازماندهی می‌کنند (شکل ۳۱-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ در جریان تکامل سلول T لوکوس TCKβ در ابتدا بازآرایی شده، یک زیرواحد β عملکردی را کد می‌کند که در pre-TCR مشارکت می‌کند که همچنین حاوی زیرواحد α pre-TCR ویژه کد شده توسط ژن غیربازآرایی شده می‌باشد (شکل ۲۳-۲۴ را ملاحظه کنید) مشابه pre-BCR، pre-TCR تکثیر آن سلول‌هایی که به طور موفق در بازآرایی TCRβ هستند را تعدیل می‌کند.

■ سلول‌های T که قرار است به سلول‌های T دارای CD8 تبدیل شوند باید به هنگام تکامل با مولکولهای MHC کلاس I برهمکنش دهند و آنهایی که قرار است به سلول‌های T دارای CD8 تبدیل شوند باید با مولکولهای MHC کلاس II برهمکنش کنند. تکامل سلول‌های T که عاجز از شناخت هر کدام از مولکولهای MHC هستند فاقد پیامهای رشد می‌باشند. سلول‌های Tای که در هنگام تکامل با کمپلکس‌های پپتید - MHC پیوند محکمی برقرار می‌کنند می‌میرند (انتخاب منفی) ؛ آنهایی که تمایل متوسطی برای کمپلکس‌های پپتید - MHC دارند اجازه بلوغ شدن می‌یابند (انتخاب مثبت) و از تیموس به محیط صادر می‌شوند.

■ سلول‌های T به جاهایی که پیامهای کموتاکتیک در شکل کموکاین‌ها دارند حرکت می‌کنند (مهاجرت سلولی). گیرنده‌ها برای کموکاین‌ها، گیرنده‌های جفت شونده با G پروتئین هستند که در اتصال به کموکاین‌ها ویژگی از خود نشان می‌دهند. پیچیدگی خانواده کموکاین - گیرنده کموکاین باعث تنظیم دقیق ترافیک لوکوسیتی در هر دو اندام‌های لنفوئیدی و محیطی می‌شود.

۶-۲۴ همکاری سلول‌های سیستم ایمنی در پاسخ آداپتیو (اختصاصی)

پاسخ موثر سیستم ایمنی آداپتیو به حضور سلول‌های B، T و سلول‌های عرضه کنندهٔ آنتی ژن (APC) نیاز دارد. سلول‌های T فعال شده به سلول‌های B کمک می‌کنند تا فرایند تغییر ایزوتیپی و جهش‌های سوماتیک راکه لازمه تولید آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا می‌باشد به انجام برسانند و سلول‌های T نیز فقط توسط APC های حرفه‌ای مانند سلول‌های دندریتیک سل‌ها که پاتوژن را توسط گیرنده‌های شبه - تول (TLRs) شناسایی می‌کنند فعال می‌شوند. چنین تأثیر متقابلی بین اجزای سیستم ایمنی ذاتی و ایمنی آداپتیو جنبه مهمی از پاسخ ایمنی آداپتیو می‌باشد. در این بخش شرح خواهیم داد چگونه این عناصر متنوع فعال می‌شوند و چگونه انواع مرتبط سلول‌ها با یکدیگر واکنش می‌دهند.

گیرنده‌های شبه تول (TLRs) الگوی ماکرو مولکولی مشتق شده از پاتوژن‌های متنوع را شناسایی می‌کنند

یکی از وظایف مهم ایمنی ذاتی، توانایی تشخیص سریع حضور مهاجمان میکروبی و پاسخ به آنها می‌باشد. چنین پاسخ هایی نه تنها شامل حذف مستقیم پاتوژن می‌باشد بلکه همچنین سلول‌های پستانداران را غالباً از طریق فعال سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای برای پاسخ دهی ایمنی آداپتیو مناسب آماده

می‌کنند. سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (APCs) در سرتاسر سلول‌های اپی تلیال وجود دارند (راه‌های هوایی، معدی - روده‌ای، ژنتیال) یعنی مکان هایی که بیشترین تماس را با پاتوژن دارند. در پوست مجموعه‌ای از سلول‌های دندریتیک به نام سلول‌های لانگرهانس[1] وجود دارند که تقریباً غیر ممکن است پاتوژن بتواند چنین سد دفاعی را بشکند و از تماس با چنین سلول‌های APC حرفه‌ای اجتناب کند. سلول‌های دندریتیک و دیگر APC های حرفه‌ای حضور باکتری‌ها و ویروس‌ها را از طریق TLR سطح خودشان تشخیص می‌دهند. علت نام‌گذاری این پروتئین‌ها آن است که از لحاظ ساختاری و عملکردی شبیه به پروتئینی به نام تول در دروزوفیلا[2] می‌باشند. پروتئین تول دروزوفیلا به علت نقش مهمی که در ناحیه پشتی - شکمی این مگس میوه داشت شناخته شد. اما هم اکنون گیرنده‌های مرتبط دیگری که توانایی پیش بردن پاسخ ایمنی ذاتی را دارند علاوه بر مهره‌داران در حشرات شناسایی شده‌اند.

ساختار TLR: گیرنده تول و تمام گیرنده‌های شبه تول، نواحی تکرار شده غنی از لوسین در دُمین خارج سلولی خود دارند. این نواحی تکرار شونده یک دُمین خارج سلولی داسی شکل را بوجود می‌آورند که اعتقاد بر این است در شناسایی لیگاند مربوطه‌اش نقش دارد. ناحیه سیتو پلاسمی گیرنده‌های شبه تول شامل دُمینی می‌باشد که مسئول فرا خوانی پروتئین‌های آداپتیو است که وظیفه انتقال پیام را بر عهده دارند. مسیر انتقال پیام در گیرنده‌های شبه تول با اغلب اجزای دیگر در مسیر انتقال پیام در گیرنده‌های تحریک شونده توسط IL-2 مشترک می‌باشد. (شکل ۳۵-۲۴).

پروتئین تول دروزوفیلا با لیگاند مربوطه‌اش، Spaetzle، واکنش می‌دهد که این لیگاند محصول تجزیه پروتئولیتیک اجزای دیواره سلولی قارچ می‌باشد که توسط دروزوفیلا به دام افتاده است. در حشرات، فعال سازی تول موجب آغاز آبشار پیامهایی می‌شود که در نهایت رونویسی ژن‌های کد کننده پپتیدهای ضد میکروبی را کنترل می‌کنند تا با مکانیسم‌های رو نویسی ارتباط برقرار کند. این کینازها واسطه بین TLR ها و فاکتورهای رونویسی که توسط لیگاندهای دریافت شده از هر دو گیرنده فعال می‌شوند می‌باشند. یک مرحله کلیدی، تخریب پروتئازومی وابسته به یوبیکوئیتن[3] پروتیئنی به نام کاکتوس می‌باشد که حذف این پروتئین موجب ورود پروتئین Dif به هسته و آغاز رونویسی می‌شود. این مرحله از نظر عملکردی و ترکیب ساختاری بسیار مشابه مسیر NF-κB در پستانداران می‌باشد (شکل۳۵-۱۶).

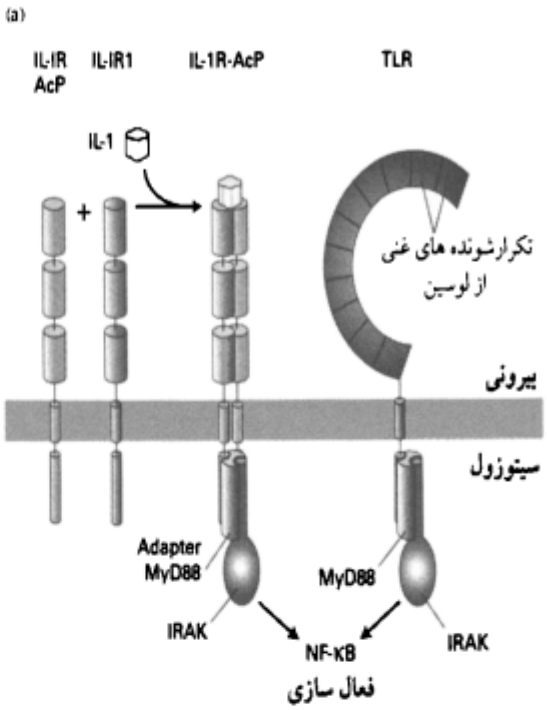
تنوع TLRها: در پستانداران حدود ۱۲ عدد TLR وجود دارد که توسط محصولات میکروبی متنوعی فعال می‌شوند. TLRها توسط انواع مختلفی از سلول‌ها بیان می‌شوند. اما عملکرد آنها برای فعال سازی سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها ضروری می‌باشد. نوتروفیل‌ها نیز TLRها را بیان می‌کنند. محصولات میکروبی شناسایی شده توسط TLR شامل ماکرو ملکول‌های موجود در پوشش باکتریها مثل لیپوپلی‌ساکارید ها(LPS) ، فلاژلین (زیر واحد فلاژل باکتری) و لیپو پپتید باکتری‌ها می‌باشد. اگرچه اتصال مستقیم ماکرو مولکول‌ها به TLR هنوز به طور مستقیم نشان داده نشده است اما حضور آنها توسط گیرنده‌های مجزایی حس می‌شود. برای مثال TLR4 برای LPS، هترودیمر TLR1/2 TRL2/6 برای لیپوپپتیدها، TLRs/s برای فلاژلین. شناسایی اجزای غشایی باکتری‌ها در سطح سلول‌ها اتفاق می‌افتد.

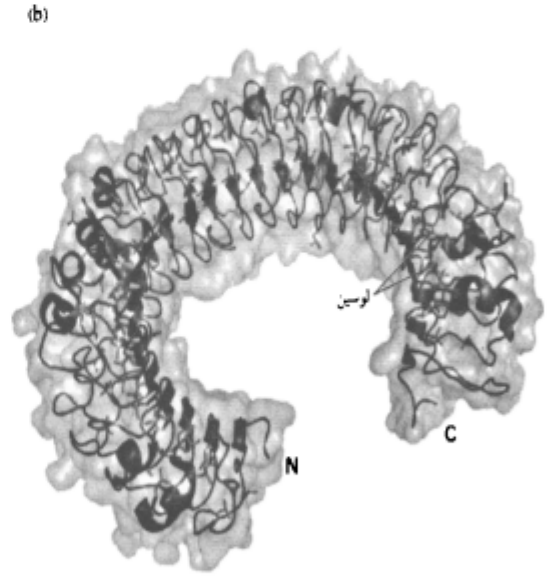
مجموعه دومی از گیرنده‌های شبه تول (TLR3، TLR7 و TLR9) حضور اسید نوکلئیک مشتق از پاتوژن‌ها را حس می‌کنند. چنین گیرنده هایی در سطح سلول نمی‌باشند بلکه در بخش‌های اندوزومی قرار دارند. DNAی پستانداران در اغلب مکان‌های دی‌نوکلئوتید CpG متیله می‌شوند. در حالی که DNA میکروب‌ها به طور کلی فاقد چنین تغییراتی هستند. چنین نواحی غیر متیله CpG در DNA میکروبی منجر به فعال سازی TLR9 می‌شود. به طور مشابه مولکول‌های RNA دو رشته‌ای که در سلول‌های عفونی ویروسی تولید می‌شوند منجر به فعال سازی TLR3 می‌شوند و بالاخره مولکول‌های RNA تک رشته‌ای خاصی منجر به فعال سازی TLR7 می‌شوند. بنابراین مجموعه کامل TLR پستانداران می‌تواند ماکرومولکول‌های متنوعی را که مشخصه حضور باکتری، ویروس و قارچ‌های پاتوژنی می‌باشد مورد شناسایی قرار دهند.

آبشار انتقال پیام: همان طوری که در شکل ۳۵-۲۴ نشان داده شده، فعال شدن گیرنده‌های شبه تول پستانداران منجر به فراخوانی پروتئین آداپتیو MyD88 و در نتیجه اتصال و فعال سازی IRAK (کیناز همراهی‌کننده گیرنده اینترلوکین۱) می‌شود. بعد از این که فاکتور ۶ همراهی کننده گیرنده TNF (TRAF6) توسط IRAK فسفریله شد، کینازهای پائین رو بعدی نیز فعال شده و منجر به فعال شدن NF-κB می‌شود که یکی از فاکتورهای رونویسی می‌باشد و

1- Langerhans cells 2- Drosophila

3- Ubiquitin - dependent protoeasomal degradation





◀ **شکل ۳۵-۲۴ گیرنده‌های شبه تول.** (a) مقایسه انتقال پیام از طریق گیرنده IL-1 و گیرنده شبه تول (TLR). IL-1 به کمک اتصال همزمان پروتئین کمکی IL-1R (IL-1R ACP) به گیرنده مربوطه‌اش متصل می‌شود. سپس پروتئین آداپتیو MyD88 به محل این‌گیرنده‌های فعال فراخوانده می‌شود و توسط کینازهای معرفی کننده گیرنده IL-1 به نام IRAK، موجب فعال سازی مسیر NF-κB می‌شوند (شکل۳۵-۱۶). گیرنده‌های شبه تول اگرچه از لحاظ دُمین‌های متصل شونده به لیگاند خودشان کاملاً از یکدیگر متفاوت اند اما فراخوانی MyD88، IRAK و به دنبال آن فعال سازی NF-kB در هر دو مسیر مشترک می‌باشد (b) ساختار دُمین خارج سلولی TLR3 انسان.

سپس NF-κB از سیتو پلاسم به هسته جابجا شده و ژن‌های مورد هدف متنوعی را فعال می‌کند. (شکل۳۵-۱۶). ژن‌های مورد هدف علاوه بر ژن‌های TNF و IL-12 شامل ژن‌های کد کننده IL-1 و IL-6 نیز می‌باشند که به التهاب کمک می‌کنند. اینترفرون نوع I که پروتئین‌های کوچک با تأثیرات ضد ویروسی می‌باشد نیز در پاسخ به‌پیام‌های TLR بیان می‌شود.

پاسخ‌های سلولی به پیام‌های TLR کاملاً متنوع می‌باشند. در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن، چنین پاسخ هایی نه تنها شامل تولید سیتوکاین می‌باشد همچنین منجر به تنظیم مثبت مولکول‌های‌کمک تحریکی می‌شود که پروتئین‌های سطحی مهمی برای فعال سازی کامل سلول‌های T دست نخورده محسوب می‌شوند. پیام‌های TLR موجب مهاجرت سلول‌های دندریتیک از جایگاه برخوردشان با پاتوژن به گره لنفی که محل واکنش آنها با لنفوسیت‌های دست نخورده است، می‌شوند. همه گیرنده‌های شبه تول تحریک شده پاسخ‌های مشابهی را تحریک نمی کنند. هر کدام از TLRهای فعال شده تولید یک مجموعه ویژه‌ای از سایتوکاین‌ها را توسط سلول‌های دندریتیک کنترل می‌کنند. هر TLRای که توسط لیگاند مربوطه فعال می‌شود موجب القای ترکیب پروتئین‌های سطحی و مجموعه سایتوکاین هایی می‌شود که فنوتیپ منحصر به فردی را برای سلول دندریتیک فعال شده ایجاد می‌کند. ویژگی میکروبی که با TLR مواجه می‌شود الگوی TLR هایی را که فعال خواهند شد، تنظیم می‌کند. در نتیجه مسیرهای مجزایی از سلول‌های دندریتیک فعال شده شکل می‌گیرد و منجر به تولید سایتوکاین، مولکول‌های سطحی و عوامل کموتاکتیک می‌شود که نحوهٔ پاسخ سلول‌های دندریتیک را تعیین می‌کند

مسیر فعال شدن سلول‌های دندریتیک و سایتوکاین‌هایی که تولید می‌کنند یک محیط منحصر به فردی را برای مقایسه سلول‌های T ایجاد می‌کنند و سلول‌های T خصوصیات عملکردی را کسب می‌کنند که برای مقابله با عوامل عفونی که منجر به فعال سازی TLR ها در مراحل اولیه می‌شود لازم می‌باشد.

اشغال گیرنده‌های شبه تول منجر به فعال سازی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌شود

سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای به طور دائمی عمل

آندوسیتوز را انجام می‌دهند و در غیاب پاتوژن، پپتیدهای مشتق از پروتئین خودی را به همراه MHC-I و MHC-II در سطح خودشان عرضه می‌کنند. در حضور پاتوژن، گیرنده‌های شبه تول سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن فعال می‌شوند و موجب القای حرکت این سلول‌ها می‌گردند. به عبارتی سلول‌ها از لایه‌های پیرامون خود جدا شده و در جهت مسیر گره‌های لنفی یعنی جایی که کموکاین‌ها الگوی حرکتی را به آنها نشان می‌دهد مهاجرت می‌کنند. برای مثال در سلول‌های دندریتیک فعال شده، میزان برداشت آنتی‌ژن کاهش می‌یابد. فعالیت پروتئازی اندوزومی / لیزوزومی و انتقال کمپلکس پپتید - MHC از محل تشکیل به سطح سلول افزایش می‌یابد. بالاخره سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای فعال شده و بیان مولکول‌های کمک تحریکی CD80 و CD86 را افزایش می‌دهند که این مولکول‌ها موجب می‌شوند تا سلول‌های T به طور موثری فعال شوند. بنابراین تماس اولیه سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن با یک پاتوژن موجب مهاجرت آنها به گره‌های لنفی می‌شود که در آنجا به طور کامل سلول‌های T دست نخورده را فعال می‌کنند. به منظور فعال شدن سلول‌های T، آنتی‌ژن به شکل کمپلکس پپتید ـ MHC عرضه می‌شود. مولکول‌های کمک تحریکی به طور فراوانی روی سلول‌ها ظاهر می‌شوند و همچنین سایتوکاین‌های تنظیم کننده تمایز صحیح سلول‌های T تولید می‌شوند.

سلول‌های دندریتیک حمل کننده آنتی‌ژن با سلول‌های T اختصاصی همان آنتی‌ژن واکنش نشان داده و موجب تکثیر و تمایز سلول‌های T می‌شوند. سایتوکاین‌های تولید شده در مسیر واکنش اولیه تعیین می‌کند که سلول‌های CD8 T در جهت فنوتیپ التهابی پیشروی بکند و یا به فنوتیپ سلول‌کمک کننده تبدیل شوند. اگر واکنش از طریق مولکول‌های MHC-I صورت بگیرد سلول‌های CD8 T ممکن است از سلول‌های سیتوتوکسیک پیش ساز به سلول‌های T سیتوتوکسیک کاملاً فعال تکامل یابند. سلول‌های T فعال شده متحرک هستند و در نتیجه از میان گره لنفی عبور کرده و برای مواجهه با سلول‌های B آماده می‌شوند و یا به منظور فعالیت در قسمت‌های خاصی از بدن وارد جریان خون می‌شوند. همچنین برای انجام عملکردهای اجرایی در جاهای دیگری از بدن، گره لنفی را ترک می‌کنند.

تولید آنتی‌بادی‌های با میل پیوندی بالا به همکاری بین سلول‌های B و T نیازمند می‌باشد

به منظور تولید آنتی‌بادی‌هایی با میل پیوندی بالا که در اتصال آنتی‌ژن و خنثی کردن پاتوژن‌ها بهتر عمل می‌کنند، سلول‌های B به کمک سلول‌های T نیازمند می‌باشند. بنابراین فعال شدن سلول‌های B به منبعی از آنتی‌ژن که به گیرنده‌های سلول‌های B (BCR) متصل می‌شوند و همچنین به سلول‌های T فعال شده اختصاصی آنتی‌ژن نیاز دارد. آنتی‌ژن‌های محلول از طریق رگ‌های لنفاوی آوران وارد گره لنفی می‌شوند (شکل ۴-۲۶). رشد باکتری‌ها همراه با آزاد کردن محصولات میکروبی می‌باشد که به عنوان آنتی‌ژن عمل می‌کنند. اگر عفونت همراه با تخریب بافت موضعی باشد، فعال شدن آبشار کمپلمان منجر به کشته شدن باکتری و به طور همزمان آزاد شدن پروتئین‌های باکتریایی می‌گردد که از طریق رگ‌های لنفاوی به گره لنفی تخلیه می‌شود. آنتی‌ژن هایی که توسط اجزای کمپلمان پوشیده شده‌اند، آنتی‌ژن‌های قوی‌تری برای فعال کردن سلول‌های B محسوب می‌شوند. چون علاوه بر BCR های روی سلول‌های B، کمک گیرنده‌های همراه BCRها را که مختص اجزای کمپلمان می‌باشند نیز فعال می‌کنند و منجر به فعال شدن قوی‌تر سلول‌های B می‌شوند. سلول‌های B بعد از اتصال آنتی‌ژن به گیرنده‌های مربوطه، کمپلکس ایمنی تشکیل شده را به درون خود می‌کشند و آن را پردازش می‌کنند و از طریق مولکول‌های MHC ـ II، آنتی‌ژن را عرضه می‌کنند. به عبارت دیگر سلول‌های B که تجربه برخورد با آنتی‌ژن را داشته باشند آنتی‌ژن کسب شده از طریق BCR را به صورت کمپلکس پپتید -MHCII عرضه می‌کنند که به عنوان پیام درخواست کمک از سوی سلول‌های T محسوب می‌شود (شکل ۳۶-۲۴). به این نکته توجه کنید که اپی‌توپهای شناسایی شده توسط گیرنده‌های سلول B ممکن است کاملاً مجزا از پپتیدهایی باشد که نهایتاً روی سلول‌های B همراه با MHC II عرضه می‌شود. اگر اپی‌توپ شناسایی شده توسط سلول B و پپتید عرضه شده همراه کلاس II (اپی‌توپ سلول T) از لحاظ فیزیکی با هم مرتبط باشند منجر به شروع تمایز موفق سلول‌های B می‌گردد.

مفهوم شناسایی مرتبط، علت پائین بودن بعضی از پاسخ‌ها را شرح می‌دهد. به عنوان مثال پپتیدهایی که به طور موفقیت آمیزی موجب پاسخ آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا می‌شوند، دارای چندین خصوصیت می‌باشند. آنها باید دارای اپی‌توپ هایی باشند که توسط گیرنده‌های سلول‌های B شناسایی شوند و تحت فرایند آندوسیتوز و سپس پروتئولیز قرار بگیرند و توانایی اتصال به یکی از آلل‌های مولکول‌های MHCII را به منظور عرضه به صورت کمپلکس پپتید MHC ـ II داشته باشند که کمپلکس ضروری برای فعال شدن سلول‌های T می‌باشد. با توجه به این دلایل پپتیدهای سنتتیک

(مصنوعی) که برای برانگیختن تولید آنتی‌بادی ساخته می‌شوند به حاملین پروتئینی متصل می‌شوند تا ایمونوژنیسیته آنها را افزایش دهند. چون فقط از طریق شناسایی کمپلکس پپتید MHC ـ II توسط TCRهای سلول‌های T می‌توان کمک لازم را برای اجرای کامل فرایند تمایز سلول‌های B فراهم آورد.

این مفهوم به طور مشابهی برای سلول‌های B که قادر به شناسایی تغییرات ویژه‌ای که روی پروتئین یا پپتیدها صورت می‌گیرد صدق می‌کند. آنتی‌بادیهایی که شکل فسفریله آنزیم کیناز را شناسایی می‌کنند، توسط ایمونیزاسیون حیوانات آزمایشگاهی با پپتیدهای فسفریله مورد بحث که با پروتئین حامل کونژوگه شده‌اند تولید می‌شوند. سلول‌های B اختصاصی به طور مناسبی، جایگاه فسفریله پپتید مورد نظر را شناسایی می‌کند و پپتید فسفریله را همراه با حامل به درون خود می‌کشند و توسط پروتئولیز اندوزومی، پروتئین حامل یک مجموعه پیچیده‌ای از پپتیدها را تولید می‌کنند. از بین این پپتیدها حداقل یک پپتید باید وجود داشته باشد که بتواند به مولکول‌های MHCII سلول‌های B متصل شود و اگر این پپتید به طور صحیحی به صورت کمپلکس پپتید -MHC روی سلول‌های B نمایش داده شود قادر به فرا خوانی کمک سلول‌های T می‌باشد به شرطی که سلول‌های CD4 T مجهز به گیرنده‌هایی باشند که بتوانند کمپلکس مولکولی MHC II و پپتیدهای مشتق شده از حامل را شناسایی کنند.

سلول‌های T از طریق TCR خود، آنتی‌ژنی که توسط سلول‌های B به صورت کمپلکس پپتید -MHC در آمده و در سطح سلول‌های B به نمایش گذارده شده است را مورد شناسایی قرار می‌دهند. سلول‌های B همچنین مولکول‌های کمک تحریکی و گیرنده سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های T فعال شده را نیز در سطح خود به نمایش می‌گذارند (به طور مثال سایتو کاین IL-4). سپس این سلول‌های B تکثیر می‌یابند. بعضی از آنها به پلاسماسل تمایز می‌یابند و بقیه به سلول‌های B خاطره تبدیل می‌شوند. نخستین موج تولید آنتی‌بادی، همیشه IgM می‌باشد. تغییر ایزوتیپی و جهش‌های سوماتیک (فرایندهای لازم برای تولید و انتخاب آنتی‌بادی با میل پیوندی بالا) به حضور آنتی‌ژن و یا در معرض قرارگیری مجدد با آنتی‌ژن نیاز دارد. علاوه بر سایتوکاین، سلول‌های B برای شروع جهش سوماتیک و تغییر ایزوتیپی به تماس سلول به سلول نیاز دارند. این تماس شامل اتصال پروتئین CD40 سلول‌های B با CD40 L سلول‌های T می‌باشد. این پروتئین‌ها جزو اعضای خانواده گیرنده TNF - TNF می‌باشند.

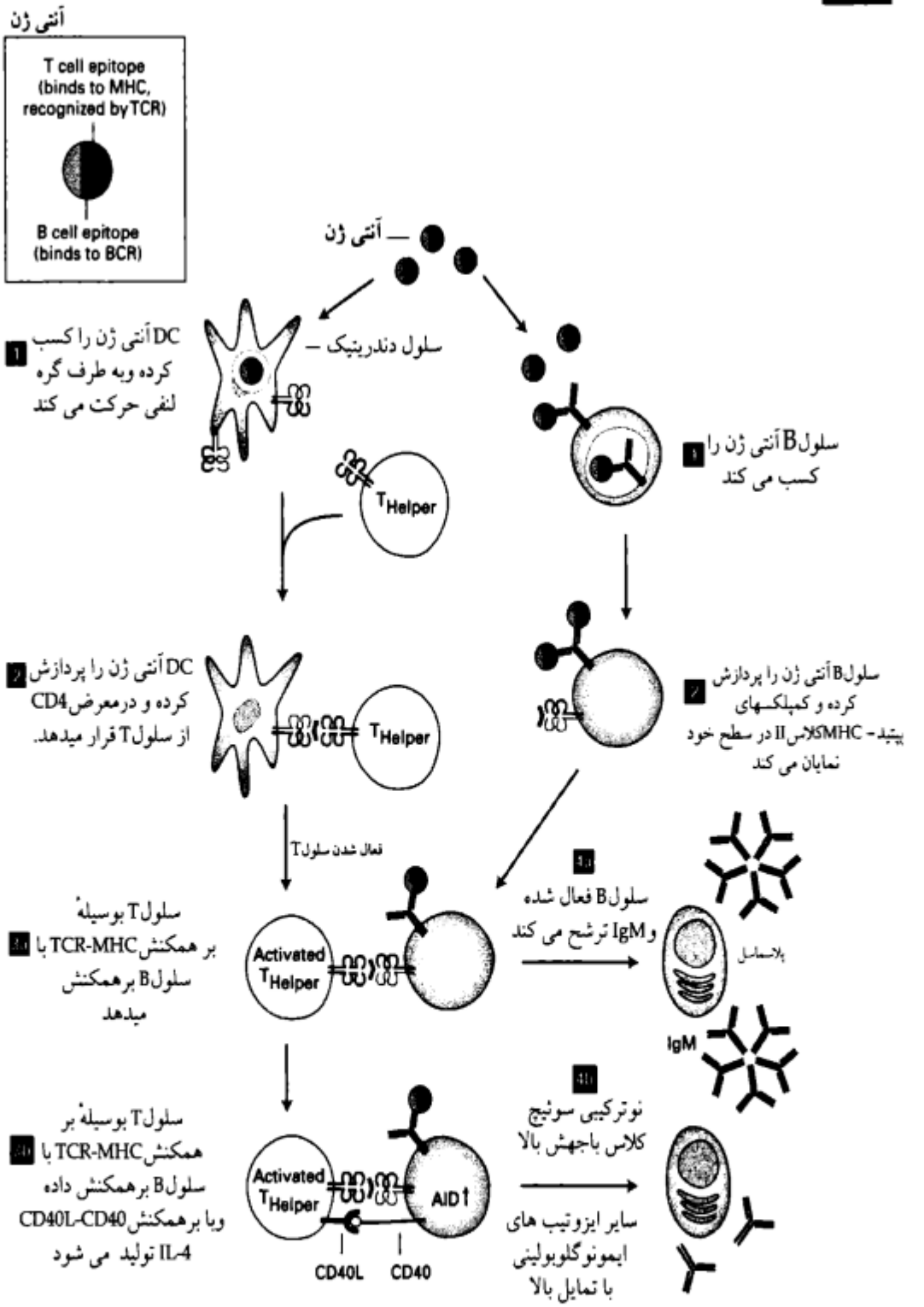
واکسن‌ها، ایمنی حفاظتی را در مقابل پاتوژن‌های متنوعی بر می‌انگیزند

مسلماً یکی از مهم‌ترین کاربردهای مبانی ایمونولوژی، ساخت واکسن‌ها می‌باشد. واکسن‌ها موادی می‌باشند که به صورت بی ضرر برای بدن، طراحی می‌شوند اما می‌توانند پاسخ‌های ایمنی بدن را به منظور فراهم آوردن حفاظت در مقابل انواع بیماری زایی پاتوژن‌ها تحریک کنند (شکل ۳۷-۲۴). تا کنون علت موفقیت تمامی واکسن‌ها مشخص نشده است اما در بیشتر موارد توانایی تولید آنتی‌بادی که بتواند پاتوژن‌ها (ویروس‌ها) را خنثی کند و یا اثر میکروب کشی باکتری‌ها از خود نشان دهد، شاخص‌های خوبی برای تشخیص واکسیناسیون موفق می‌باشد.

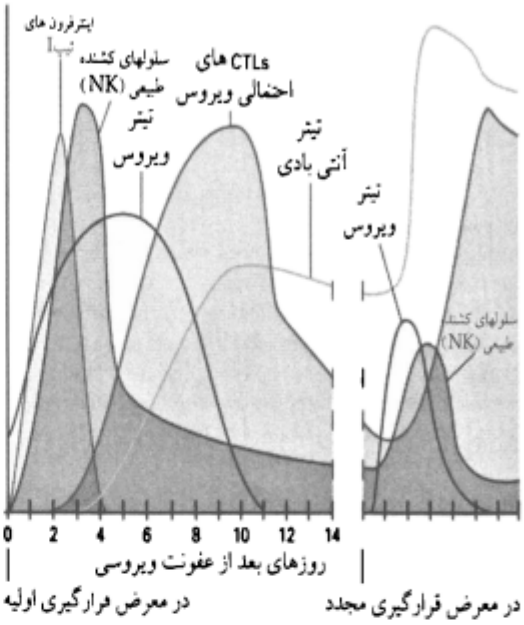
روشهای متعددی می‌تواند منجر به تولید واکسن‌های موثر شود. واکسن ممکن است از نوع واکسن زنده ضعیف شده از یک پاتوژن بیماری زا باشد. پاساژ (انتقال) مکرر در محیط کشت بافتی یا از حیوانی به حیوانی دیگر اغلب منجر به ضعیف شدن[1] پاتوژن می‌گردد. اساس مولکولی این مکانیسم هنوز به خوبی مشخص نشده است. نوع ضعیف شده پاتوژن موجب ابتلای فرد به شکل خفیف بیماری و یا بدون هیچ علایم می‌شود. واکسن‌های زنده ضعیف شده به وسیله فرا خوانی همه اجزای سیستمیک ایمنی آداپتیو می‌توانند موجب تحریک تولید سطح حفاظتی از آنتی‌بادی شوند. سطح این آنتی‌بادی‌ها با افزایش سن کاهش می‌یابند و ایمونیزاسیون مکرر (تزریق‌های یاد آور) برای نگهداری حفاظت کامل لازم می‌باشد. واکسن‌های زنده ضعیف موجود شامل آنفولانزا، سرخک، اوریون و سل می‌باشد. در مورد آخر سوش ضعیف شده مایکو باکتریومی که موجب بیماری می‌شود مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bacille Calmett - Guerin; BCG). اگرچه ویروس زنده ضعیف شده فلج اطفال تا همین اواخر به عنوان واکسن استفاده می‌شد اما به علت خطر دوباره پیدایش سوش‌های بیماری زایی ویروس فلج اطفال در بدن فرد واکسینه شده که بر فایده واکسن غلبه می‌کرد دیگر مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. امروزه ویروس کشته شده فلج اطفال به عنوان واکسن انتخابی محسوب می‌شود.

واکسن‌هایی که از ویروس آبله گاوی که ارتباط نزدیکی با ویروس پاتوژن انسانی واریولا داشت و مسئول ایجاد بیماری آبله انسانی بود ساخته شد و به طور موفقیت آمیزی منجر به ریشه کنی

1- Attenuation



▲ **شکل ۳۶-۲۴ همکاری بین سلول‌های T و B برای شروع تولید آنتی‌بادی‌ها ضروری است.** (چپ) فعال شدن سلول‌های T توسط سلول‌های دندریتیک حاوی آنتی ژن (DCS). (راست) کسب آنتی ژن و فعال شدن متعاقب توسط سلول‌های B. مرحلهٔ (❶): سلول‌های عرضه‌کنندهٔ آنتی ژن (DCS، سلول‌های B)، آنتی ژن را کسب می‌کنند. مرحلهٔ (❷): آنتی ژن وارد شده، پردازش شده و به سلول‌های T عرضه می‌شود. فعال شدن سلول‌های T هنگامی روی می‌دهد که سلول‌های دندریتیک، آنتی ژن را به سلول‌های T عرضه کنند. مرحلهٔ (a❸): سلول‌های T فعال شده سلول‌های B بیان کنندهٔ آنتی ژن را به واسطهٔ کمپلکس‌های پپتید ـ MHC بر روی سطح سلول‌های B به دام می‌اندازند. مرحلهٔ (b❸): سلول T به وسیلهٔ برهمکنش TCR-MHC با سلول B برهمکنش داده و با برهمکنش CD40 ـ CD40L، IL-4 تولید می‌کند. مرحلهٔ (a❹): سلول B که با سلول‌های T کمکی CD4 برهمکنش کرده بود، به سلول‌های پلاسماسل تولید کنندهٔ IgM تبدیل می‌شود. مرحلهٔ (b❹): سلول Bای که پیام‌ها را در شکل برهمکنش‌های CD40-CD40L از سلول‌های کمکی CD4 T دریافت می‌کند می‌تواند متحمل تعویض دسته ایمونوگلوبولینی گردد و هیپرموتاسیون سوماتیک ایجاد کند.



▲ **شکل ۳۷-۲۴ مسیر زمانی عفونت ویروسی.** پاسخ اولیه ضد ویروسی زمانی مشاهده می‌شود که تعداد ذره‌های عفونی کننده افزایش یابد و در نتیجه منجر به القا و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و تولید اینترفرون نوع I شود. چنین پاسخ‌هایی بخشی از ایمنی ذاتی می‌باشند و به دنبال آن فعالیت سلول‌های T سیتوتوکسیک (CTL) افزایش می‌یابد. همچنین آنتی‌بادی‌ها تولید می‌شوند و بالاخره عفونت از بین می‌رود. در معرض قرارگیری مجدد با همان ویروس منجر به پاسخ سریع‌تر و تولید بیشتر آنتی‌بادی و فعالیت سریع‌تر سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌گردد. واکسن‌های موفق پاسخ ایمنی مشابهی را از بعضی جنبه‌ها با زمانی که برای اولین بار در معرض پاتوژن قرار می‌گیریم، القا می‌کنند اما بدون این که منجر به بروز علایم مشخص بیماری شود. اگر شخص واکسینه شده مجدداً در معرض همان پاتوژن قرار بگیرد سیستم پاسخ ایمنی آداپتیو که قبلاً حساس شده است پاسخ سریع‌تر و قوی‌تری را می‌دهد.

بیماری آبله در انسان شد. این اولین ریشه کنی یک بیماری عفونی بود. تلاش برای ساختن یک شاهکار مشابه برای فلج اطفال رو به اتمام می‌باشد.

واکسن‌های زیر واحدی از انواع دیگر واکسن‌ها می‌باشند که به جای به کارگیری سوش زنده ضعیف شده ویروس یا باکتری بیماری‌زا، فقط بخشی از اجزای آن برای تحریک سیستم ایمنی به کار می‌رود. در موارد خاصی ایجاد یک حفاظت طولانی مدت در مقابل یک پاتوژن با به کارگیری منبعی از آنتی‌ژن‌های پاتوژن زنده و بیماری زا در واکسیناسیون کافی می‌باشد. چنین روشی در مورد پیشگیری از عفونت با ویروس هپاتیت B موفق بوده است. واکسنی که به طور معقول برای ویروس انفولانزا مورد استفاده قرار می‌گیرد عمدتاً از پروتئین‌های نورآمینیداز و هماگلوتینین پوشش ویروس آنفولانزا می‌باشد. (شکل ۱۰-۳). چنین واکسن هایی موجب افزایش آنتی‌بادی‌های خنثی کننده می‌شوند. برای واکسیناسیون در مقابل سروتیپ HPV16 پاپیلوما که ویروس عامل سرطان دهانه رحم در انسان می‌باشد از ذره‌های شبه ویروسی که فقط شامل پروتئین کپسید می‌باشند و ماده ژنتیکی ندارند استفاده می‌شود. چنین ذره‌های شبه ویروسی غیر عفونی می‌باشند اما در بیشتر جنبه‌ها از شکل دست نخورده ویروس تقلید می‌کنند. واکسن HPV جزو اولین واکسن‌هایی است که برای پیشگیری سرطان دهانه رحم مجوز استفاده در مورد انسان را کسب کرده و انتظار می‌رود که شیوع این سرطان را که حدود ۸۰٪ افراد مستعد ابتلا به آن می‌باشند را کاهش دهد.

از دیدگاه سلامت عمومی، واکسن هایی که به صورت ارزان و در حد وسیع تولید و انتشار یابند ابزارهای ترسناکی در ریشه کنی بیماری‌های مسری می‌باشد. تلاشهای فعلی در جهت تولید واکسن در مقابل بیماری هایی متمرکز یافته است که هیچ درمان مناسبی برای آنها در دسترس نیست (مانند Ebola Virus) و یا شرایط اقتصادی - اجتماعی مشکلاتی را برای توزیع دربر داشته است (مثل مالاریا، HIV/AIDS). از طریق یادگیری کامل و جامع‌تر اینکه، چگونه سیستم ایمنی انجام وظیفه می‌کند این احتمال وجود دارد که طراحی واکسن‌های رایج بهتر شود و طراحی واکسن برای بیماری هایی که هنوز واکسن‌های موفقی برای آنها در دسترس نمی‌باشد، گسترش یابند.

نکات کلیدی ۶-۲۴

هماهنگی سلول‌های سیستم ایمنی در پاسخ ایمنی آداپتیو

■ سلول‌های عرضه‌کننده آنتی ژن مثل سلول‌های دندریتیک بوسیله پیامهایی که از سوی گیرنده‌های شبه toll آنها حاصل می‌شود نیاز به فعال شدن دارند. این گیرنده‌ها به طور گسترده‌ای برای ماکرومولکولهای تولید شده توسط باکتری‌ها و ویروس‌ها اختصاصی هستند. اشغال گیرنده‌های شبه Toll، مسیرهای پیام رسانی NF-κB را فعال می‌کند که نتیجه آن شامل سنتز سیتوکاین‌های التهابی است (شکل ۳۵-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ به هنگام فعال شدن، سلول‌های دندریتیک مهاجرشده و به گره‌های لنفی می‌روند و توسط سلول‌های T مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. فعال شدن سلول‌های دندریتیک همچنین نمایش کمپلکس‌های پپتید - MHC و بیان مولکول‌های مورد نیاز

برای شروع پاسخ ایمنی را افزایش می‌دهد.

■ سلول‌های B برای تمایز و تکامل و تبدیل شدن به پلاسماسل‌ها به کمک سلول‌های T فعال شده نیاز دارند. ویژگی آنتی ژنی سلول‌های B توسط سلول‌های T فعال شده فراهم می‌شود که کمپلکس‌های پپتید - MHC را بر روی سطح سلول‌های B شناسایی می‌کند. این سلول‌های B کمپلکس‌های پپتید - MHC را با داخل کردن آنتی ژن توسط آندوسیتوز به واسطه BCR و سپس پردازش و عرضه آنتی ژن بوسیله مسیر MHC کلاس II تولید می‌کنند (شکل ۳۶-۲۴ را ملاحظه کنید).

■ علاوه بر تولید سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های T فعال شده، سلول‌های B به تماس سلول - سلول برای شروع هیپرموتاسیون سوماتیکی و نوترکیبی تعویض کلاس نیاز دارند. این امر مستلزم CD40 بر روی سلول‌های B و CD40L بر روی سلول‌های T است.

■ کاربرد مهم هماهنگی ایمونولوژیک بین سلول‌های B و T شامل واکسن‌هاست. بیشتر فرمهای واکسن‌های رایج، باکتریها و ویروسهای زنده را می‌کشند که می‌توانند یک پاسخ ایمنی محافظتی بدون اثرات پاتولوژیکی ایجاد کنند.

چشم‌اندازی به آینده

مراکز متعدد تحقیقات ایمونولوژیکی سعی می‌کنند تا موفقیت‌های بزرگی را در زمینه ساخت واکسن بدست آورند. اما تولید واکسن جدیدی که هر دو خصوصیت سالم و موثر بودن را داشته باشد هنوز به صورت هدف عمده از لحاظ اهمیت عملی و اقتصادی باقی مانده است. ایدز، سل مقاوم به دارو و مالاریا سه نمونه از بیماری‌های کشنده‌ای هستند که هر کدام مسئول مرگ میلون‌ها انسان در هر سال می‌باشند که هیچ واکسن موفقی در حال حاضر برای آنها در دسترس نمی‌باشد. محققان باید بیولوژی سلولی را با مبانی ایمونولوژیکی تلفیق کنند تا بتوانند این نیاز برآورده نشده را حل کنند. اگر چه بعضی از موفق‌ترین واکسن‌ها بدون داشتن جزئیات دانش ایمونولوژی تکامل یافته است اما شرایط کنترل شده کنونی یادگیری جزئی‌تر موقعیت واکسن‌های موفق و علت کار ساز بودن آنها را ایجاب می‌کند. لنفوسیت‌ها جزء معدود تیپ سلولی می‌باشند که به عنوان سلول‌های اصلی، واکنش‌های اختصاصی سلول و بافت را در کشت بافتی دوباره از سر می‌گیرند و بنا به این خصوصیت، لنفوسیت‌ها یک مدل مطالعاتی جالب برای مطالعه انتقال پیام بررسی واکنش‌های متقابل بین انواع مختلف و متمایز سلول‌ها تحت شرایط مشخص آزمایشگاهی و اندازه‌گیری صحیح پاسخ‌های برانگیخته شده توسط تحریکات خاصی محسوب می‌شود.

توانایی لنفوسیت‌ها برای تولید گیرنده‌های اختصاصی آنتی‌ژنی تقریباً بی نهایت متنوع، آنها را به سلول‌های بسیار ارزشمندی تبدیل کرده است: تولید گیرنده‌های خود واکنش گر که فاکتورهای اصلی کمک کننده در مکانیسم ایجاد بیماری‌های خود ایمنی می‌باشند مهره داران دارای چندین مکانیسم کنترل کننده برای چنین لنفوسیت‌های خود واکنش گر می‌باشند اما هیچ کدام از آنها بدون خطا نمی‌باشند. ما باید چگونگی مکانیسم ایجاد تحمل در مقابل آنتی‌ژن‌های خودی، حفظ تحمل و نهایتاً شکست آن را در زمان شروع بیماری‌های خود ایمنی دریابیم. یادگیری این مطالب باید به ما کمک کند تا روشهای جدیدی را برای دستکاری و کنترل لنفوسیت‌های خود واکنش گر بیابیم تا از بیماری‌های خود ایمنی پیشگیری کنیم و یا بتوانیم آنها را درمان کنیم (به عنوان مثال دیابت تیپ I، مالتیپل اسکلروز و آرتریت).

با پیشرفت هایی که در زمینه سلول‌های بنیادی و چگونگی کاربرد این سلول‌ها برای درمان بیماریها (به عنوان مثال بیماری پارکینسون، دیستروفی عضلانی و صدمات طناب نخاعی) و پیوند سلول‌های بنیادی هترو لوگوس (به عبارت دیگر سلول‌های مشتق از فرد دیگر به جای بیمار) صورت گرفته، راه برای درمان باز شده است. توانایی سیستم ایمنی برای شناسایی مشتقات سلول‌های بنیادی پیوندی به عنوان بیگانه، یک فاکتور محدود کننده کاربرد سلول‌های بنیادی می‌باشد. در نتیجه، یافتن راه حل‌های جدید برای سرکوب کردن این پاسخ‌ها نسبت به پیوند و یا القای تحمل نسبت به آنها، یکی از اهداف مهم می‌باشد.

به کارگیری ابزارهای ژنتیکی اصلاح شده، امکان شناسایی زیر مجموعه‌های بیشتری از لنفوسیت‌ها را فراهم می‌آورد که دارای عملکردهای مجزایی می‌باشند. چنین طرح طبقه بندی اصلاح شده به فهم عملکرد لنفوسیت‌ها کمک خواهد کرد. و بنابراین نوید بخش دستکاری اختصاصی عملکرد لنفوسیت‌ها جهت مصارف درمانی می‌باشد.

اطلاعات در حال افزایش ما از توالی و ساختار ژن‌های پاتوژن و میزبان، به فهم ما از واکنش متقابل بین پاسخ‌های ایمنی ذاتی و آداپتیو و شیوه هایی که پاتوژن‌ها بین ایمنی آداپتو و ذاتی اختلال ایجاد می‌کنند، کمک خواهد کرد. به کارگیری ارگانیسم‌های پاتوژن تغییر یافته ژنتیکی برای بررسی عملکرد پاسخ‌های ایمنی میزبان، ما را در یادگیری اصول ایمونولوژی یاری خواهد کرد و این یک زمینه سریعاً گسترش یابنده در تحقیقات بیولوژی سلولی پایه می‌باشد.

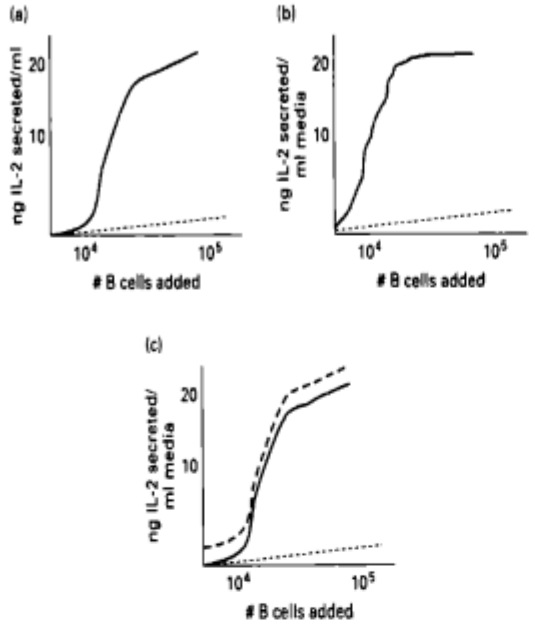
تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور یادگیری نحوه ارائه اوآلبومین (پروتئین موجود در تخم مرغ) و دیگر آنتی‌ژن‌های بیگانه در سیتوپلاسم سلول با هدف ایجاد مراقبت ایمنی (Immunosurveillance) می‌توان اوآلبومین را توسط تکنیک الکتروپوریشن وارد سیتو پلاسم سلول B اولیه کرد. در سیتوپلاسم، اوآلبومین به قطعات پپتیدی متعددی تجزیه می‌شود که یکی از این محصولات تجزیه شده، پپتیدی با توالی SIINFEKL (مخفف تک تک کلمات) می‌باشد. زمانی که سلول‌های B را با جمعیتی از کلون سلول‌های T که به طور اختصاصی، SIINFEKL قرار گرفته در داخل مولکول MHC را شناسایی می‌کنند مخلوط می‌کنیم، سلول‌های T تحریک می‌شوند. نمودارهای زیر ترشح IL-2 را بعد از این که سلول‌های T با سلول‌های B مخلوط می‌شوند و به شیوه‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته شده، نشان می‌دهند.

نمودار A: سلول‌های B تحت الکتروپوریشن با اوآلبومین (خط توپر) و یا با پروتئین کنترل (خط نقطه‌چین) که توسط جمعیت سلول‌های T به کار رفته مورد شناسایی قرار نمی‌گیرد قرار گرفته‌اند.

نمودار B: سلول‌های B در ابتدا با مهارگر سیستئین پروتئاز لیزوزومی (خط توپر) و یا با مهارگر پروتئازوم (خط نقطه‌چین) انکوبه شدند و سپس با اوآلبومین الکتروپوریشن شدند.

نمودار C: سلول‌های B در معرض غلظت بالایی از پپتید SIIFEKL قرار گرفته‌اند و بعداً بلافاصله با فرمالدئید (خط نقطه چین) فیکس (کشته) شده‌اند و یا در ابتدا به مدت ۲ ساعت با مهار کننده پروتئازم (خط تیره) و یا بدون مهار کننده پروتئازم انکوبه شده و بعداً با فرمالدئید فیکس شده‌اند.



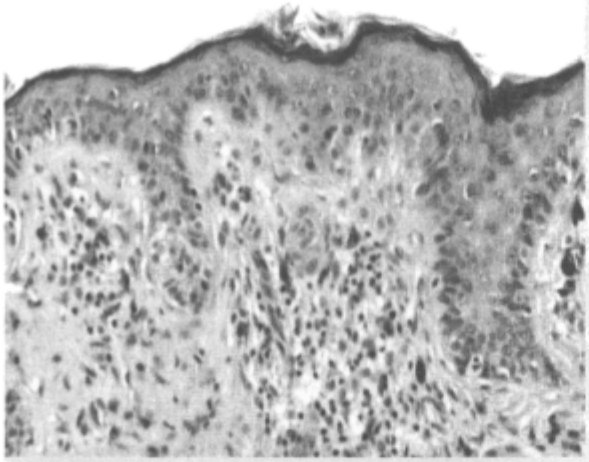
a. تحت چه شرایطی IL-2 ترشح شده است؟ احتمالاً کدام سلول (سلول T یا B) IL-2 ترشح می‌کند.

b. با به کارگیری مهار کننده لیزوزومی و پروتئازومی چه اطلاعاتی را می‌توان بدست آورد؟ احتمالاً اوا آلبومین همراه کدام MHC (MHC-I یا MHC-II) عرضه می‌شود. محتمل‌ترین مسیری که اواآلبومین در سیتوپلاسم سلول‌های B پردازش می‌شود و به سلول‌های T عرضه می‌شود تا توسط سلول‌های T شناسایی شود کدام است؟

c. چرا حضور و یا عدم حضور مهار کننده پروتئازم در تجربه C هیچ تأثیری بر ترشح IL-2 نمی‌گذارد در حالی که حضور مهار کننده در تجربه B تأثیر مشخصی را نشان می‌دهد؟

فصل ۲۵

سرطان



(شکل رنگی) تومور ملانوما در پوست انسان که با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده‌اند. بعضی از سلول‌های نرمال اپی‌تلیوم در بالا به صورت سلول‌های ملانومای مهاجم در آمده‌اند که بسیاری از آنها هستهٔ کوچک **سیاه** داشته و بعضی انکلوزیونهای ملانوم قهوه‌ای تولید کرده‌اند. تومورهای **ملانوما**، بدخیم بوده و در محل اولیه خودشان در پوست به انواع بافتها مهاجرت می‌کنند؛ این متاستازها می‌تواند کشنده باشد. هر ساله در کل دنیا، ۴۸۰۰۰ نفر به خاطر ملانوما فوت کرده و ۱۶۰۰۰۰ مورد جدید هم شناسایی می‌شود. درمان فقط به تشخیص اولیه بستگی دارد.

رئوس مطالب

۲۵.۱ سلول‌های توموری و شروع سرطان

۲۵.۲ پایه ژنتیکی سرطان

۲۵.۳ جهش‌های انکوژنیک در پروتئین‌های شروع کننده رشد

۲۵.۴ جهش‌هایی که سبب فقدان مهار رشد و کنترل چرخه سلولی می‌شوند

۲۵.۵ کارسینوژن‌ها و ژن‌های کارتاکر در سرطان

سرطان، علت یک پنجم مرگ و میرها را هر سال در ایالات متحده تشکیل می‌دهد. در دامنه میان ۱۰۰ تا ۳۵۰ نفر از ۱۰۰۰۰۰۰ انسان در هر سال بر اثر سرطان می‌میرند. سرطان معمولاً در نتیجه نقص در مکانیسم‌هایی است که معمولاً رشد و تکثیر سلول‌ها را کنترل می‌کنند. در طی پدیده تکوین عادی و در سرتاسر زندگی بزرگسالی، سیستمهای پیچیده کنترل ژنتیکی، تعادل میان تولد و مرگ سلول را در پاسخ به پیامهای رشد، پیامهای مهار رشد و پیام‌های مرگ تنظیم می‌کنند. سرعت تولد و مرگ سلول، اندازه بدن بزرگسالان را مشخص می‌کند و در عین حال سرعت رشد، این اندازه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در برخی از بافت‌های بالغ، تکثیر سلولی به صورت یک فرایند تجدیدکننده بافت، به صورت پیوسته انجام می‌شود. به عنوان مثال سلول‌های اپیتلیال روده چند روز زنده‌اند، سپس می‌میرند و دوباره جایگزین می‌شوند؛ انواع ویژه‌ای از سلول‌های سفید خونی به سرعت جایگزین می‌شوند و سلول‌های پوست عموماً تنها ۲-۴ هفته زنده مانده و سپس می‌میرند. سلول‌های اکثر بافتهای بالغ در حالت عادی تکثیر نمی‌شوند مگر در طی فرایندهای التیام دهنده. چنین سلول‌های پایایی (مثل هپاتوسیت‌ها، سلول‌های ماهیچه قلبی، نورون‌ها) می‌توانند در طی دوره‌های طولانی یا حتی در تمام طول عمر یک موجود زنده به صورت عملکردی باقی بمانند. سرطان‌ها زمانی رخ می‌دهند که مکانیسم‌های حفظ کننده سرعت رشد نرمال، اختلال پیدا کنند و سبب افزایش تقسیم سلول شوند.

فقدان تنظیم سلولی که منشاء اکثر یا تمامی انواع سرطان است در نتیجه آسیب ژنتیکی می‌باشد که اغلب در اثر مواد شیمیایی شروع کننده تومور، هورمون‌ها، و گاهی ویروس‌ها ایجاد می‌شوند (شکل ۲۵-۱). بروز جهش دو دسته وسیع از ژن‌ها، **پروتو - انکوژن‌ها** و **ژن‌های سرکوب کننده تومور**، در آغاز سرطان نقش دارند. پروتو - انکوژن‌ها رشد سلول را بطور عادی شروع می‌کنند. جهش‌هایی که پروتو انکوژن‌ها را به انکوژن‌ها تبدیل می‌کنند، سبب می‌شوند که این ژن در فرایند شروع رشد، فعالیت افزاینده‌ای یابد. سایر مواردی که سبب افزایش بیان ژن می‌شوند یا سبب تولید یک محصول با فعالیت بالا می‌گردند نیز، چنین اثری خواهند داشت. ژن‌های سرکوب کننده تومور نیز در حالت عادی از رشد جلوگیری می‌کنند. بنابراین جهش‌هایی که سبب غیر فعال شدن این ژن‌ها می‌گردند، به سلول اجازه می‌دهند که به طور مطلوبی تقسیم گردد. سومین دسته ژنی که

فوق‌العاده تخصصی هستند؛ **ژن‌های کارتاکر**[1] هستند که اغلب با سرطان ارتباط دارند. ژن‌های کارتاکر در حالت عادی سبب حفظ سلامت ژنوم می‌شوند؛ زمانی که این ژن‌ها غیرفعال می‌شوند، سلول‌ها با سرعت زیادی دچار جهش‌های فراوانی می‌گردند که فرایند کنترل رشد را مختل کرده و منجر به سرطان می‌شوند. اکثر ژن‌های این سه دسته، پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در تنظیم تولد سلول (مثل ورود و پیشرفت سلول به چرخه سلولی) یا در مرگ سلول به واسطه **آپوپتوز** نقش دارند. سایرین، پروتئین‌هایی راکد می‌کنند که در ترمیم آسیب‌های وارده به DNA نقش دارند.

عموماً سرطان‌ها در نتیجه جهش‌هایی هستند که بر اثر قرار گرفتن در معرض کارسینوژن‌ها (موادی که در محیط پراکنده‌اند) ایجاد می‌گردند که این مواد شامل ترکیبات شیمیایی ویژه و تشعشعات رادیواکتیو می‌باشد.

اکثر سلول‌های سرطانی فاقد یک یا چندین سیستم ترمیمی DNA هستند که فقدان این سیستم‌ها، ممکن است بتوانند تعداد زیادی از جهش‌هایی که در این سلول‌ها رخ می‌دهد را توضیح دهند. اگرچه آنزیم‌های ترمیم‌کننده DNA مستقیماً تکثیر سلولی را مهار نمی‌کنند، اما سلول‌هایی که توانایی ترمیم خطاها، شکاف‌ها یا شکست در انتهای DNA را از دست داده‌اند، در بسیاری از ژن‌ها (آنهایی که در کنترل رشد و تکثیر سلول حیاتی‌اند)، دچار جهش‌های فراوانی می‌شوند. بنابراین جهش‌هایی که سبب از دست رفتن عمل در ژن‌های کارتاکر از قبیل ژن‌های کد کننده آنزیم‌های ترمیم DNA می‌شوند، مانع از این می‌شوند که سلول‌ها به تصحیح جهش‌هایی بپردازند که سبب غیر فعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور یا فعال شدن انکوژن‌ها می‌گردند.

جهش‌های مولد سرطان اکثراً در سلول‌های سوماتیک و نه در سلول‌های رده زایا رخ می‌دهند که سلول سوماتیک جهش یافته نمی‌تواند نسل بعدی را به وجود آورد. برعکس، جهش‌های ارثی ویژه‌ای نیز وجود دارند که در رده زایا اتفاق می‌افتند و سبب افزایش احتمال بروز سرطان در برخی مواقع می‌شوند. جهش‌های سوماتیک می‌توانند با جهش‌های ارثی شریک شده و سبب سرطان شوند.

بنابراین، فرایند ایجاد سرطان که انکوژنز[2] یا تومورژنز[3] نام دارد حاصل فعل و انفعال میان ژنتیک و محیط است. اکثر سرطان‌ها پس از تغییر ژن‌ها توسط کارسینوژن‌ها یا به علت بروز خطا در فرایندهای همانندسازی و ترمیم ژن‌ها، رخ می‌دهند. حتی اگر آسیب ژنی تنها در یک سلول سوماتیک رخ دهد، تقسیم این سلول، آسیب وارده را به سلول‌های دختر انتقال داده و سبب ایجاد یک **کلون** از سلول‌های تغییر یافته می‌گردد. ندرتاً، بروز یک جهش در یک ژن منفرد، منجر به شروع سرطان می‌شود.

یک سری از جهش‌ها در ژن‌های چندگانه، یک تیپ سلولی که به طور پیشرونده و با سرعت زیاد تکثیر می‌یابند را ایجاد می‌کند که مانع از رشد عادی سلول شده و شرایط بروز جهش‌های بیشتری را فراهم می‌کند. سلول‌ها همچنین ویژگی‌هایی را به دست می‌آورند که برای آنها مزیت محسوب می‌شود، مثل تحریک تبدیل سلول‌های اپیتلیوم عادی به سلول‌های عروقی که توانایی کسب اکسیژن را دارند و در نهایت این کلون سلولی یک تومور تولید می‌کنند. در برخی حالات، سلول‌ها از تومور اولیه به سمت جایگاه‌های جدید مهاجرت کرده و در آنجا تومورهای ثانویه را تشکیل می‌دهند که این فرایند **متاستاز** نام دارد. اغلب سرطان‌های کشنده براثر تومورهای متاستاز داده شده‌ای هستند که به صورت سریع و تهاجمی رشد می‌کنند.

متاستاز فرایندی پیچیده است که مراحل زیادی دارد. تهاجم به بافت‌های جدید به صورت غیر تصادفی صورت می‌گیرد و هم به سلول متاستاز دهنده و هم به بافت مورد تهاجم قرار گرفته بستگی دارد. اگر سلول‌های توموری فاکتورهای رشد و فاکتورهای آنژیوژنز (القاگرهای رشد رگ خونی) را داشته باشند فرایند متاستاز تسهیل می‌گردد. سلول‌های مهاجم بسیار خطرناکند. بافت‌های مورد حمله، از قبیل استخوان، رگ‌های خونی و کبد اگر فاکتورهای رشد تولید کنند بسیار آسیب‌پذیر شده و به آسانی تبدیل به سلول‌های عروقی می‌شوند تا بتوانند نیاز بافت‌های مهاجم را تأمین کنند. این سلول‌ها در صورت تولید چندین فاکتور، نسبت به توموری شدن بسیار پایدار می‌شوند (۱) فاکتورهای ضد تزاید که مانع از تقسیم سلول‌های توموری می‌شوند و (۲) مهارکننده‌های آنزیم‌های پروتئولیتیک؛ این عوامل پروتئازهای موجود در سلول‌های سرطانی که برای نفوذ آنها به داخل بافت به کار گرفته می‌شوند را مهار می‌کنند. و (۳) فاکتورهای ضد آنژیوژنز که مانع از تبدیل سلول‌های توموری به رگ‌های خونی می‌شوند.

محققان بررسی چارچوب ساختار ژنتیکی یک نوع خاص از سرطان را غالباً توسط مشخص نمودن یک یا چند ژن که به واسطه جهش به صورت سلول‌های توموری تغییر نموده‌اند، شروع می‌کنند. در نتیجه انجام چنین بررسی‌هایی ضروری است. حال چه این ژن تغییر یافته، به صورت یک عامل شرکت‌کننده در تولید تومور باشد یا

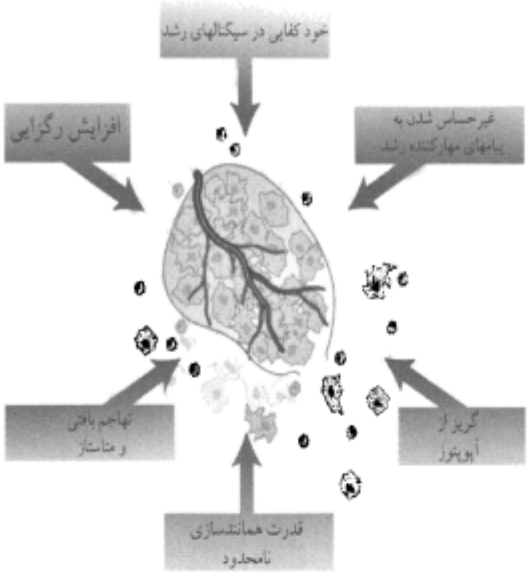
1- Caretaker genes 2- Oncogenesis
3- Tumorigenesis

به عنوان یک عامل جنبی نامربوط باشد. چنین تحقیقاتی معمولاً از تکنیک‌های متعددی بهره می‌برند: مقایسات اپیدمیولوژیکی به منظور بررسی میزان ارتباط تغییرات ژنتیکی با یک نوع ویژه از تومور، سنجش ویژگی‌های رشد سلول‌ها در محیط کشت که دارای یک جهش خاص شده‌اند، و ایجاد مدل‌های موشی بیمار به منظور مشاهده اثرات حاصل از جهش یافتن یک ژن مشهور مرتبط با سرطان است. یک بررسی بسیار دقیق زمانی ممکن است که ژن تغییر یافته یکی از ترکیبات مربوط به یک مسیر مولکولی ویژه (مثل یک مسیر پیام رسانی داخل سلول) را کُند کند. بنابراین در این حالت سایر ترکیبات همان مسیر تغییر نموده و مشاهده می‌شود که آیا همان نوع سرطان ایجاد می‌شود یا نه؟

زمان نقش مهمی در سرطان بازی می‌کند. ممکن است سالیان زیادی لازم باشد که جهش‌های چندگانه که برای تشکیل یک تومور ضرورند، تجمع یابند. بنابراین اکثر سرطان‌ها در مراحل پایانی زندگی گسترش می‌یابند. همچنین نیاز به ایجاد جهش‌های چندگانه سبب کاهش کثرت سرطان نسبت به انواعی که ایجاد تومور نیازمند یک جهش ساده است می‌شود. بنابراین، در طول حیات ما تعداد بیشماری از سلول‌ها جهش می‌یابند و سبب تغییر وضعیت رشد سلول می‌گردند و یک انتخاب قدرتمند سلول‌های مطلوب را نه برطبق آنچه که ما می‌خواهیم، جدا می‌کند. سلول‌هایی که به سرعت تکثیر می‌یابند و میزانشان زیاد می‌شود، تحت اثر تغییرات ژنتیکی قرار گرفته و به مرور زمان خطرآفرین می‌شوند. در نتیجه، سرطان پس از گذر از سن بلوغ به میزان بیشتری رخ می‌دهد و به این ترتیب نقش کم رنگ‌تری در مراحل بلوغ خواهد داشت. بنابراین به طور کلی می‌توان گفت که سرطان از یک سو سبب افزایش طول عمر انسان می‌شود و اما احتمالاً از سوی دیگر سبب عدم انتخاب تکامل بر علیه بیماری می‌شود.

در این فصل، ابتدا به شرح ویژگی‌های سلول‌های توموری و توضیح فرایند چند مرحله‌ای اونکوژنز می‌پردازیم و سپس به شرح انواع کلی تغییرات ژنتیکی که منجر به بروز ویژگی‌های منحصر به فرد سلول‌های سرطانی و ارتباط میان جهش‌های سوماتیک[1] و توارثی خواهیم پرداخت. بخش‌هایی که در ادامه توضیح داده می‌شوند جزئیات دقیق نحوه اثر جهش‌ها بر فرایندهای شروع کننده و مهار کننده رشد را که سبب افزایش تزاید سلولی می‌شود، بیان می‌کنند.

بحث ما در این فصل با شرح نقش مواد سرطانزا و نحوه ایجاد اختلال در مکانیسم‌های ترمیم DNA، به دلیل فقدان ژن‌های کارتاگر یا فعال‌سازی آنزیم تلومرازی که به سلول اجازه تقسیمات



▲ **شکل ۱ - ۲۵ مروری بر تغییرات سلولی که سبب ایجاد سرطان می‌شوند.** در طی پدیده سرطان زایی، شش ویژگی بنیادی سلولی دچار تغییر می‌گردد که همانطور که در این شکل نشان داده شده است، در یک تومور در حال رشد در داخل بافت سالم، از زمان رشد تا زمان کامل شدن آن، این فنوتیپهای سرطانی مخرب بروز می‌کنند. تومورهایی که زیاد خطرناک نیستند زمانی که تنها تعدادی از این تغییرات اتفاق می‌افتد، بروز می‌یابند. در این فصل به شرح تغییرات ژنتیکی که سبب تغییر این ویژگی‌های سلولی می‌شوند، خواهیم پرداخت.

بیشتر را داده و می‌تواند منجر به اونکوژنز بشود، خاتمه می‌یابد.

۲۵ـ۱ سلول‌های سرطانی و مراحل آغازین سرطان

قبل از شرح جزئیات مربوط به اساس ژنتیکی سرطان، توجه خود را بر روی ویژگی‌های سلول‌های سرطانی که سبب تمایز آنها از سلول‌های سالم می‌شود و فرایند کلی ایجاد سرطان متمرکز می‌کنیم. تغییراتی که در یک سلول سالم ایجاد می‌شود و آن را به یک سلول سرطانی تبدیل می‌کند عموماً شامل چندین مرحله است که هر مرحله خصوصیاتی را در سلول ایجاد می‌کند که تمایل آن را به سمت توموری شدن فزونی می‌بخشد. تغییرات ژنتیکی که سبب ایجاد سرطان می‌شوند، چندین ویژگی اساسی سلول را تغییر داده و به سلول این امکان را می‌دهند که از عوامل کنترل کننده رشد عادی سلول فرار کرده و سرانجام فنوتیپ کامل یک سلول سرطانی را پیدا کند (شکل ۱

1- Somatic

– ۲۵). سلول‌های سرطانی دارای یک نیروی محرکه برای تکثیر شدن دارند که نیازی به پیام‌های القاگر خارج سلولی ندارد. این سلول‌ها پیام‌های حسی را که سبب مهار تقسیم سلولی می‌شوند رد کرده و در زمانی که باید بمیرند، به حیات خود ادامه می‌دهند. این سلول‌ها غالباً اتصالشان را با سلول‌های مجاور یا ماتریکس خارج سلولی قطع کرده، از جای خود حرکت کرده و تومور را پخش می‌کنند. یک سلول سرطانی را می‌توان از جهتی همانند یک نوع خاص از یک سلول سالم با تقسیم سریع در نظر گرفت اما سلول سرطانی و سلول‌های حاصل از آن به صورت جاودانه و نامیرا خواهند بود. تومورها اغلب دارای ویژگی هیپوکسیک (فقر اکسیژن) هستند که این به دلیل رشد زیاد آنها بیش از اندازه طبیعی است. بنابراین باید یک منبع تامین کننده خونی داشته باشند. این سلول‌ها چنین منبعی را توسط القاء رشد رگ‌های خونی در داخل تومور، تامین می‌کنند. همانطور که سرطان رشد می‌کند، تومورها تبدیل به یک اندام غیر عادی می‌شوند که برای رشد و تهاجم به بافت‌های اطرافش سازگاری می‌یابد.

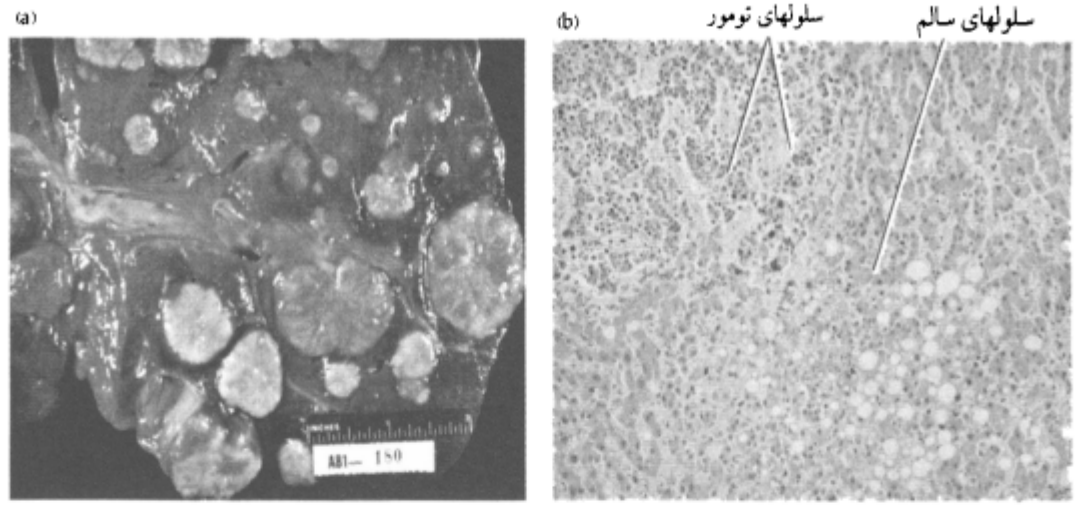
سلول‌های حیوانی سالم غالباً برحسب منبع جنینی دسته‌بندی می‌شوند و سلول‌های سرطانی را نیز مطابق با آن می‌توان نامگذاری کرد. **تومورهای بدخیم**[1] در صورتی که از بافت‌های اپی‌تلیومی از قبیل اندودرم (اپی تلیوم دستگاه گوارش) یا اکتودرم (اپیتلیوم پوست و عصب) منشاء گرفته باشد تحت عنوان **کارسینوماها**[2] دسته‌بندی می‌شوند ولی اگر از مزودرم (ماهیچه، خون و پیش سازهای بافت پیوندی) منشاء گرفته باشند **سارکوما**[3] نامیده می‌شوند. کار سینوماها شایع‌ترین انواع تومورهای بدخیم (بیش از ۹۰ درصد) می‌باشند. **لوکمی**[4] یک دسته از سارکوماهاست که به صورت سلول‌های مجزا در خون رشد می‌کنند، در حالی که اکثر انواع دیگر سرطان به صورت توده‌های جامد هستند. (نام لوکمی از کلمه لاتین «خون سفید» مشتق شده است: تکثیر زیاد سلول‌های لوکمیک سبب می‌شود که خون بیماران به صورت شیری رنگ به نظر برسد). **لنفوما**[5] نوع دیگری از سارکومای بدخیم است که حاصل تومورهای جامد حاوی لنفوسیت‌ها و سلول‌های پلاسماست. تومورهای بدخیم مغزی می‌توانند از سلول‌های عصبی مشتق شوند و گلیوبلاستوماها تومورهای حاصل از سلول‌های گلیال می‌باشند که این سلول‌ها بخش عمده انواع سلول‌های مغزی را تشکیل می‌دهند.

سلول‌های سرطانی متاستازی، مهاجم هستند و می‌توانند پخش شوند.

تومورها با فراوانی بالایی مخصوصاً در افراد سالمند ایجاد می‌شوند، امابه این دلیل که در یک جا ساکن هستند و اندازه کوچکی دارند، در اکثر موارد ریسک کمی را در میزبان خود به وجود می‌آورند. ما چنین تومورهایی را **خوش‌خیم**[6] می‌نامیم؛ به عنوان مثال زگیل، یک تومور خوش‌خیم پوست است. سلول‌های تشکیل دهنده تومورهای خوش خیم بسیار شبیه سلول‌های عادی هستند و حتی می‌توانند همانند آنها عمل کنند. مولکول‌های چسباننده سلولی که سلول‌های توموری خوش‌خیم را در کنار هم نگه می‌دارند، همانند سلول‌های عادی، سلول‌ها را در جایی که از آنجا منشاء گرفته‌اند نگه می‌دارند. معمولاً یک کپسول رشته‌ای، حد و مرز یک تومور خوش خیم را مشخص می‌کند و آن را به عنوان یک هدف آسان برای جراحی شدن آماده می‌کند. تومورهای خوش خیم تنها زمانی مشکلات پزشکی حاد ایجاد می‌کنند که اعمال آنها از حالت عادی خارج شود و یا مقادیر اضافی از مواد فعال بیولوژیکی از قبیل هورمون‌ها را ترشح کنند. مثلاً آکرومگالی که رشد بیش از حد سر، دستها و پاهاست زمانی اتفاق می‌افتد که یک تومور خوش خیم در هیپوفیز سبب افزایش تولید هورمون رشد شود.

برعکس، سلول‌های تشکیل دهنده یک تومور بدخیم، یا **سرطان**[7] (شکل ۲ – ۲۵) اغلب بسیار سریعتر از یک سلول عادی رشد کرده و تقسیم می‌شوند و در سرعت عادی از مرگ می‌گریزند (مثل لنفوستیک لوکمیای مزمن، که یک تومور سلول‌های سفید خون است). خصوصیات کلیدی سلول‌های بدخیم، توانایی آنها برای تهاجم به بافت‌های مجاورشان است که سبب پراکنده شدن و افزایش تومورها می‌شود که در آنجا سلول‌ها به تکثیر و تزاید خود ادامه می‌دهند. برخی از تومورهای بدخیم، از قبیل آنهایی که تخمدان و یا پستان را درگیر می‌کنند، برای مدت زمان کوتاهی در جای خود ساکن می‌مانند و درون یک کپسول قرار می‌گیرند. زمانی که این تومورها به رشد پیشرونده خود ادامه می‌دهند، سلول‌ها به بافت‌های اطراف حمله کرده و سبب متاستاز می‌شوند (شکل ۳a – ۲۵). اغلب سلول‌های بدخیم سرانجام توانایی متاستاز را به دست می‌آورند. بنابراین ویژگی اصلی که تومورهای متاستازی (یا بدخیم) را از تومورهای خوش خیم متمایز می‌کند، توانایی آنها برای حمله به بافت‌های مجاور و پخش شدن در بدن است.

1- Malignant tumor
2- Carcinoma
3- Sarcoma
4- Leukemia
5- Lymphoma
6- Benign
7- Caneer



▲ **شکل ۲ - ۲۵ تصویر میکروسکوپی درشت شده از یک توموری که به بافت‌های سالم کبدی حمله کرده است.** (a) شکل درشت شده از کبد انسانی که در آن یک تومور متاستازی ریوی در حال رشد است. برجستگی‌های سفید در سطح کبد، توده‌های تومور هستند. (b) یک میکروگراف روشن از قسمتی از تومور در (a) که نشان دهنده نواحی کوچک از سلول‌های توموری با رنگ‌آمیزی تیره است که به ناحیه‌ای از سلول‌های سالم کبدی که به صورت بزرگتر و با رنگ‌آمیزی روشن دیده می‌شوند، حمله نموده‌اند.

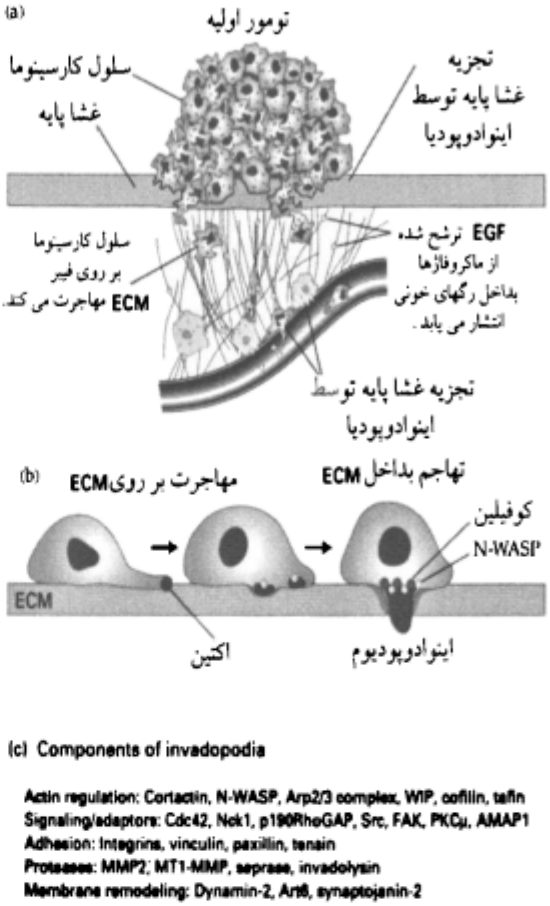
سلول‌های سالم در داخل یک اندام یا بافت توسط اتصالات سلول به سلول و موانع فیزیکی از قبیل غشاء پایه در جای خود ثابت می‌شوند. غشاء پایه، لایه داخلی سلول‌های اپی تلیال را مفروش کرده و سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی را فرا می‌گیرد (فصل ۱۹). سلول‌های سرطانی ارتباط پیچیده‌ای با ماتریکس خارج سلولی و غشاء پایه دارند. این سلول‌ها می‌توانند توسط یک پیش رفتگی سلولی که «**اینوادوپودیوم**»[1] نامیده می‌شود به داخل ماتریکس نفوذ کنند، که این پیش رفتگی، آرایشی مشابه اکتین در اسکلت سلولی دارد (شکل ۳b - ۲۵). سلول‌ها باید غشاء پایه را تجزیه کنند تا به داخل آن نفوذ کرده و متاستاز دهند، اما در برخی موارد سلول‌ها می‌توانند در امتداد غشاء مهاجرت کنند. اکثر سلول‌های سرطانی، یک پروتئین ویژه (فعال کننده پلاسمینوژن) را ترشح می‌کنند که سبب تبدیل پروتئین پلاسمینوژن سرم به پروتئاز فعال پلاسمین می‌شود. افزایش فعالت پلاسمین به همراه فعالیت سایر پروتئازها، با هضم غشاء پایه، سبب شروع متاستاز می‌شود. به این ترتیب سلول‌های توموری می‌توانند به داخل آن نفوذ کنند (شکل ۳b - ۲۵). همان طور که غشاء پایه تجزیه می‌شود، برخی از سلول‌های توموری به داخل خون وارد خواهند شد. اما کمتر از ۱ در ۱۰۰۰۰ سلول‌هایی که تومور اولیه را ترک می‌کنند، زنده می‌مانند تا در بافت‌های دیگر کلونی تشکیل دهند و یک تومور ثانویه متاستازی ایجاد کنند.

علاوه بر خروج از تومور اولیه و ورود به داخل خون، سلول‌هایی که تومورهای جدید ایجاد می‌کنند باید با یک سلول اندوتلیال که یک مویرگ را آستر کرده است اتصال برقرار کرده (به آن بچسبد) و در امتداد آن مهاجرت کنند و یا به داخل بافتی که در زیر این لایه آستری وجود دارد نفوذ کنند. لایه‌های بافتی چندگانه که سلول‌های بدخیم را پوشانده‌اند اغلب حاوی پروتئین‌های سطحی جدید یا تغییر یافته‌ای هستند که توسط سلول‌های توموری ساخته شده‌اند (شکل ۳c - ۲۵).

علاوه بر اهمیت تغییرات صورت گرفته در پروتئین‌های سطح سلولی، تغییرات مؤثری در اسکلت سلولی در طی تشکیل سلول توموری و متاستاز اتفاق می‌افتد. این تغییرات ممکن است در نتیجه تغییر در بیان ژن‌های کد کننده Rho و سایر GTPآزهای کوچکی که اکتین موجود در اسکلت سلولی را تنظیم می‌کنند، ایجاد گردند (فصل ۱۷). به عنوان مثال، یافته‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های توموری، ژن RhoC را به میزان زیادی بیان می‌کنند که این ژن پروتئینی را بیان می‌کند که شروع انقباض اکتین/میوزین در سلول‌ها را به عهده دارد و این افزایش در فعالیت RhoC، متاستاز را تحریک می‌کند.

سلول‌های سرطانی را اغلب می‌توان توسط بررسی‌های میکروسکوپی از سلول‌های سالم تشخیص داد. این سلول‌ها اغلب نسبت به سلول‌های سالم یا سلول‌های تومور خوش خیم، تمایز یافتگی کمتری دارند. در یک بافت خاص، سلول‌های بدخیم معمولاً نشانه‌هایی از رشد سریع سلولی را نشان می‌دهند که در این سلول‌ها

1- Invadopodium



▲ **شکل ۳-۲۵ (شکل رنگی) متاستاز.** (a) به منظور بررسی مراحل اولیه متاستاز، از سلول‌های کارسینوهای پستان به عنوان نمونه استفاده کرده‌ایم. سلول‌های سرطانی تومور اولیه را ترک کرده و به غشا پایه می‌چسبند و از فیبرهای ماتریکس خارج سلولی (ECM) برای رسیدن به رگهای خونی استفاده می‌کنند. سلول‌های سرطانی می‌توانند پیامهایی از قبیل فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) را که توسط ماکروفاژها (زرد) ترشح می‌شوند جذب کنند. در رگ‌های خونی، این سلول‌ها می‌توانند به لایه سلول‌های اندوتلیالی که دیواره عروق را تشکیل می‌دهند نفوذ کرده و به داخل گردش خون وارد شوند. (b) سلول‌های کارسینوما توسط تشکیل «اینوادوپودیا» به ماتریکس خارج سلولی و دیواره عروق خونی نفوذ می‌کنند که این نوع سلول‌ها متالوپروتئازها و سایر پروتئازهای مربوط به ماتریکس را ترشح کرده تا راهی را برای خود باز کنند. (c) پروتئین‌های بکار گرفته شده توسط اینوادوپودیا. N-WASP (فصل ۱۶) آرایش اکتین را به داخل فیلامانت‌هایی که اسکلت درونی اینوادوپودیا را تشکیل می‌دهند، کنترل می‌کنند. یکی از روش‌های امیدبخش برای مبارزه با سرطان، تولید داروهایی است که هدف آنها اجزاء و مراحل تهاجم و متاستاز است بدون آنکه اعمال ضروری و عادی سلول را مسدود کنند.

نسبت هسته به سیتوپلاسم بالاست و هستک به طور برجسته‌ای قابل تشخیص است و دفعات تقسیم میتوز افزایش یافته و به طور محسوسی ساختار آنها تمایز یافتگی کمی دارد. وجود سلول‌های مهاجم در سایر قسمت‌های یک بافت سالم برای تشخیص یک سرطان بدخیم بکار می‌رود.

منشا سرطان‌ها معمولاً سلول‌های تکثیر شونده می‌باشد.

با توجه به اینکه اکثر جهش‌های اونکوژنیک که ایجاد سرطان را القاء می‌کنند، انواعی هستند که در سلول‌های تقسیم شونده رخ می‌دهند، بنابراین جهش می‌تواند از سلول‌های والد به سلول‌های دختری منتقل شود و به این ترتیب توسط نسل‌های آتی به ارث برسد.

زمانی که این جهش‌ها در سلول‌های منحصر به فرد (مثل سلول‌های عصبی و ماهیچه) ایجاد می‌شوند، در اغلب موارد سرطان را ایجاد نمی‌کنند، به همین دلیل تومور ماهیچه و سلول‌های عصبی در جوانان خیلی نادر است. با این حال، سرطان می‌تواند در بافت‌هایی ایجاد شود که به طور عمده از سلول‌های تمایز یافته که تقسیم نمی‌شوند تشکیل شده است مانند اریتروسیت‌ها و اغلب سلول‌های سفید خونی، سلول‌های جذب کننده‌ای که روده را مفروش کرده‌اند، و سلول‌های کراتینیزه شده‌ای که پوست را تشکیل می‌دهند. سلول‌هایی که تومورها را تشکیل می‌دهند، زیاد تمایز نیافته‌اند، اما نسبت به سلول‌های پیش سازشان تا حدی متمایز شده‌اند. سلول‌هایی که بطور کامل تمایز یافته‌اند معمولا تقسیم نمی‌شوند. به تدریج که این سلول‌ها می‌میرند یا فرسوده می‌شوند به طور پیوسته توسط تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی جایگزین شده و این سلول‌ها دارای قابلیت تبدیل شدن به سلول‌های توموری هستند.

در فصل ۲۱، بیان می‌کنیم که سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی فناناپذیرند و می‌توانند تبدیل به سلول‌های تمایز یافته‌ای شوند که قادر به بازسازی یک بافت خاص برای یک موجود زنده می‌باشند (شکل ۲ - ۲۱). به عنوان مثال، اکثر سلول‌های خونی تمایز یافته، دارای عمر کوتاهی هستند و به طور پیوسته توسط سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (سازنده خون) در مغز استخوان ایجاد و جایگزین می‌شوند (شکل ۱۵ - ۲۱). تجمعاتی از سلول‌های بنیادی در روده، کبد، پوست، استخوان و سایر بافت‌ها که به طور مشابه می‌تواند تمام یا اکثر انواع سلول‌ها در این بافت‌ها را ایجاد کند توسط مسیرهایی مشابه هماتوپوئیزیس در مغز استخوان می‌تواند سلول‌های پیر و مرده را جایگزین کند و همچنین قادر به ایجاد تمام یا اکثر سلول‌ها در این

بافتها باشد. توسط مسیرهایی مشابه در یک تومور هم، احتمالا فقط سلول‌های خاصی وجود دارند که توانایی تقسیم شدن بطور کنترل نشده را دارا هستند و می‌توانند تومورهای جدید را به وجود بیاورند؛ چنین سلول‌هایی، **سلول‌های توموری بنیادی**[1] نام دارند که در پائین به شرح آنها خواهیم پرداخت.

به دلیل این که سلول‌های توموری می‌توانند در طی حیات یک موجود زنده بطور پیوسته تقسیم شوند، بنابراین جهش‌های انکوژنیک در DNA آنها تجمع کرده و سرانجام سبب تبدیل آنها به سلول‌های سرطانی می‌شود. سلول‌هایی که دچار چنین جهش‌هایی می‌شوند دارای یک ظرفیت تکثیری غیر عادی بوده و عموماً نمی‌توانند فرایندهای عادی تمایز را در خود انجام دهند. اکثر جهش‌های انکوژنیک، از قبیل انواعی که مانع آپوپتوز می‌شوند یا پیام‌های نامناسب تحریک رشد سلولی را ایجاد می‌کنند نیز می‌توانند در سلول‌های با تمایز یافتگی بالا ایجاد شوند. اما تا زمانی که سلول‌ها در حال همانندسازی‌اند و به صورت اجدادی می‌باشند چنین جهش‌هایی در سلول‌های اجدادی هماتوپوئیتیک منجر به انواع خاصی از لوکمی می‌شوند.

سلول‌های توموری بنیادی می‌توانند جمعیت کوچکی باشند

تومورها می‌توانند از سلول‌های بنیادی سالم منشا یابند. به علاوه دست کم در برخی از انواع تومورها، بنظر می‌رسد که خودشان سلول بنیادی هستند. بنابراین، اینها تنها سلول‌های توموری هستند که قابلیت ایجاد یک تومور جدید را دارند. این بدین معناست که سلول‌های توموری متنوع هستند و در برخی از آنها تقسیم متوقف شده است در حالی که در سایرین، رشد می‌تواند به صورت سرطانی ادامه یابد. مورد اخیر خطرناکتر بوده و از لحاظ درمانی تخریب آن توسط مواد ضد سرطان اهمیت بیشتری نیز دارد. همانند سلول‌های بنیادی عادی، سلول‌های توموری بنیادی، تقسیم شده و دو سلول دختری ایجاد می‌کنند: یک سلول توموری بنیادی دیگر و یک سلول دیگر با ظرفیت همانند سازی محدود.

یکی از روش‌های تشخیص سلول‌های بنیادی سرطانی، تخلیص کلاس‌های متفاوت سلول‌ها از یک توموری است که مارکرهای متفاوتی را روی سطح خود داراست، که اغلب برای تشخیص این مارکرها از مواد شناسایی کننده سلولی فعال شده با مواد فلورسانت استفاده می‌گردد (FACS، فصل ۹ رجوع شود). تست‌های پیوندی[2] که اغلب روی موش انجام می‌شود، مشخص کرده است که برخی از کلاس‌های سلولی دارای توانایی ایجاد یک تومور جدید هستند در حالی که برخی دیگر این توانایی را ندارند. برای مثال، تعداد کمی از میان هزاران سلول سرطانی مغز در انسان دارای یک آنتی ژن بنام CD133 هستند که بر روی سطح سلول قرار گرفته و به عنوان یک عامل مهم در شروع تشکیل تومورهای جدید در موش‌هایی هستند که فاقد سیستم ایمنولوژیکی سالم هستند. در حالی که بیش از صدها سلول توموری بدون CD133، قادر به تشکیل تومورهای جدید نبودند. یافته‌های حاصل از مطالعه چندین نوع میلومای انسانی نشان می‌دهد که کمتر از ۵ درصد سلول‌ها فاقد یک مارکر با نام CD138 هستند که این سلول‌ها توانایی بیشتری برای شروع رشد تومور نسبت به بقیه سلول‌ها دارند. بررسی پروتئین‌های سطحی موجود در سطح سلول‌های سرطان پستان در انسان، امکان تشخیص دسته کوچکی از کلاس‌های سلولی که دارای پتانسیل ایجاد خطر و تشکیل تومور هستند را برای ما فراهم می‌آورد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که شناسایی سلول‌های توموری بنیادی و سپس هدف‌گیری این سلول‌ها به طور اختصاصی با داروها و آنتی بادی‌ها احتمالاً روش سودمندتری در درمان سرطان نسبت به زمانی خواهد بود که سلول‌های توموری را به صورت توده‌ای مورد هدف داروها قرار دهیم. هنوز مشخص نشده است که چگونه اکثر انواع تومورها دارای سلول‌های بنیادیی هستند که اغلب این سلول‌ها با هم تفاوت می‌کنند.

نتایج حاصل از بررسی سلول‌های بنیادی سرطانی چند نکته مهم را روشن ساخته است. اول این که در یک تومور خاص الزاماً تمام سلول‌ها به هم شبیه نیستند حتی اگر از یک سلول مبدا واحد ایجاد شده باشند. ثانیاً، تعداد کمی از سلول‌ها ممکن است واقعاً خطرناک باشند و سوم این که، بسته به اینکه سلول‌ها در محیط اختصاصی برای خود قرار گیرند می‌توانند به طور آهسته یا سریع رشد کنند.

همان طور که سلول‌های بنیادی می‌توانند بر حسب شرایط محیط اطرافشان در وضعیتی باقی بمانند که تقسیم می‌شوند اما تمایز نمی‌یابند (شکل a ۴ - ۲۵). به طور مشابه، سلول‌های توموری بنیادی نیز بر حسب شرایط محیط اطرافشان رفتار می‌کنند. برخی از سلول‌های مجاور ممکن است موجب شود که سلول توموری یا سلول توموری بنیادی بیش از سایرین رشد کنند. شکل ۴ - ۲۵ نشاندهنده وابستگی سلول بنیادی عادی به یک آشیانه است (شکل a ۴ - ۲۵) و نیز چهار روش وجود دارد که در طی آنها سلول‌های سرطانی می‌توانند شروع به رشد کرده و توسعه یابند. تغییر در شرایط مطلوب سلول، به

1- Tumor stem cells 2- Transplantation

عنوان مثال به علت بروزجهش، می‌تواند منجر به ایجاد محدوده وسیعتری شود که در آن شرایط، سلول‌های بنیادی تکثیر یافته و سلول‌های جدید تولید می‌کنند (شکل b ۴ - ۲۵). در حالت بعدی، سلول‌های بنیادی سرطانی بعدی، دچار جهش شده و شرایط زنده ماندن و تکثیر خود را در محدوده‌ای تنظیم می‌کنند که نسبت به حالت نرمال اولیه تفاوت دارد (شکل c ۴ - ۲۵). در حالت دیگر، سلول‌های بنیادین از لحاظ رشد خودکفا شده و دیگر نیازی به پیام‌های حفاظتی حاصل از سلول‌های نگهدارنده ندارند (شکل ۴d - ۲۵). و مورد آخر که در آن سلول‌های اجدادی که در شرایط عادی قابلیت این را دارند که برای مدتی خودشان را بازیابی کنند، به طور نامشخصی جهش یافته و سبب می‌شود که به سلول‌های سرطانی دارای قابلیت بالای همانندسازی، تبدیل شوند (شکل e ۴ - ۲۵). در هر حالت، اکثر سلول‌هایی که تومور را تشکیل می‌دهند خودشان قابلیت تقسیم شدن یا تولید تومورهای جدید را ندارند.

ایده محیط کوچک تومور[1] به اهمیت ماتریکس خارج سلولی و یکی از رایج‌ترین محیط‌ها برای یک سلول سرطانی اشاره دارد: سلول‌های التهابی و تومورها اکثراً از نقاط آسیب دیده یا عفونی شده منشاء می‌گیرند. سلول‌های سیستم ایمنی به جایگاه آسیب دیده مهاجرت کرده و فاکتورهای رشد در آنجا تولید می‌شوند تا بتوانند جراحت را از بین برده و ماتریکس خارج سلولی دوباره بازسازی می‌شود. تمام این ویژگی‌های بافت‌های موضعی می‌توانند در ایجاد و رشد یک تومور شرکت کنند.

رشد تومور نیازمند تشکیل عروق خونی جدید است.

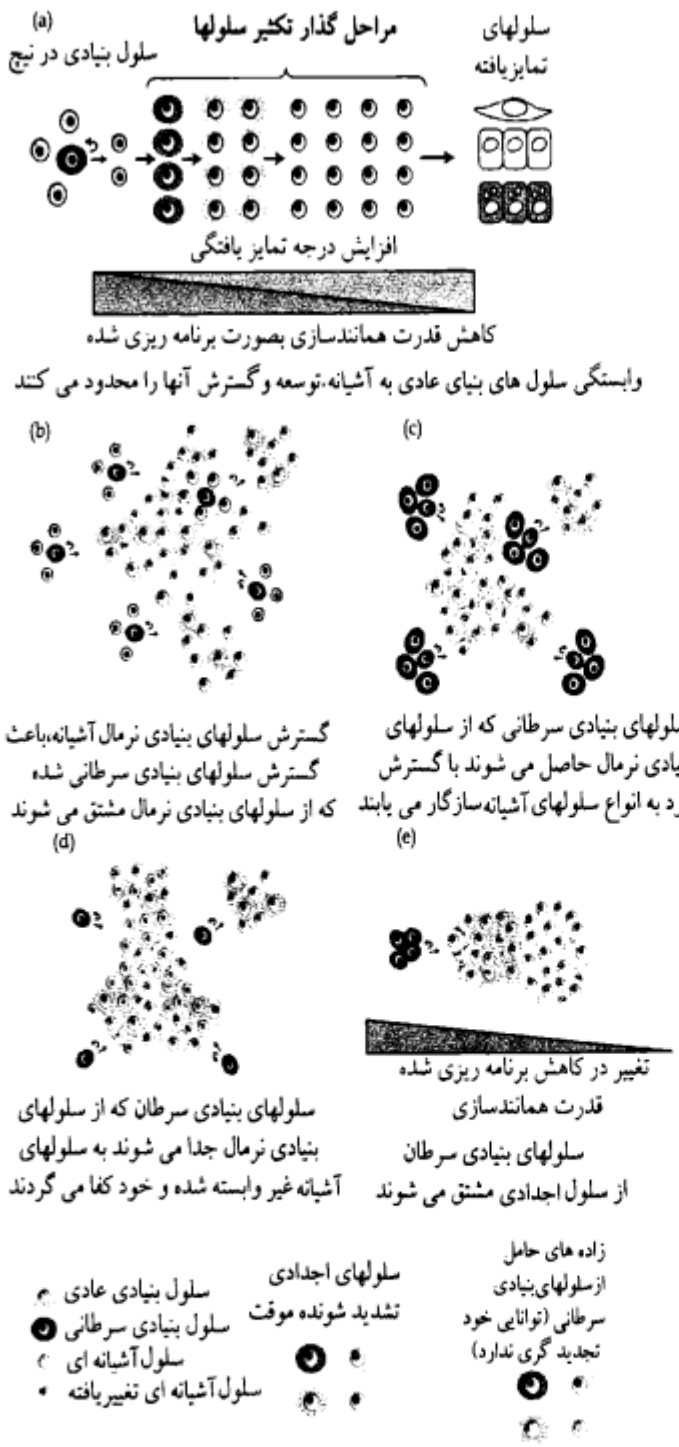
تومورها، چه اولیه یا ثانویه، به منظور رشد توده بزرگشان، نیازمند تشکیل عروق خونی جدید هستند. در صورت نبود رگ‌های تغذیه کننده آنها، تومور می‌تواند به شکل توده‌ای با حدود 10^6 سلول رشد کرده و یک توده کروی نامنظم با قطر ۲mm تشکیل دهد. در این وضعیت، تقسیم سلول‌ها روی سطح خارجی توده تومور به علت مرگ آنها در مرکز تومور به دلیل نبود منبع کافی تغذیه، به تعادل می‌رسد. چنین تومورهایی، به جز انواعی که هورمون ترشح می‌کنند سبب ایجاد مشکلات کمی می‌شوند. اما، اکثر تومورها تشکیل عروق خونی جدید را القا می‌کنند که این رگ‌ها به داخل تومور نفوذ کرده و آنها را تغذیه می‌کنند. این فرآیند **آنژیوژنز** نام دارد. این فرایند پیچیده نیازمند چندین مرحله مجزاست: تجزیه غشا پایه‌ای که مویرگ مجاورش را در بر گرفته است، مهاجرت سلول‌های آندوتلیال آستر کننده مویرگ به داخل تومور، تقسیم این سلول‌های اندوتلیال و تشکیل یک غشا پایه جدید در اطراف مویرگ جدید.

اکثر تومورها فاکتورهای رشدی را تولید می‌کنند که آنژیوژنز را تحریک می‌کنند؛ سایر تومورها، به طریقی سلول‌های سالم اطرافشان را تحریک کرده و آنها را وادار به سنتز و ترشح چنین فاکتورهایی می‌کنند. فاکتور رشد فیبروپلاست بازی (bFGF)، فاکتور رشد تغییر دهنده α (FGFα) و فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF)، که توسط اکثر تومورها ترشح می‌شوند، همگی خاصیت آنژیوژنیک دارند. عروق خونی جدید، تومور در حال رشد را تغذیه کرده و سبب افزایش اندازه آن می‌شوند که این امر باعث افزایش احتمال وقوع جهش‌های مضر خواهد شد. وجود یک رگ خونی در نزدیکی تومور، فرایند متاستاز را تسهیل خواهد نمود.

در انسان پنج ژن VEGF و سه ژن مربوطه به پروتئین گیرنده VEGF وجود دارد. بیان VEGF می‌تواند توسط هیپوکسی تحریک شود که شرایطی است که سلول‌ها دچار فقر اکسیژن می‌شوند و زمانی اتفاق می‌افتد که $[pO_2]<7mm\ Hg$ شود. گیرنده‌های VEGF، که تیروزین کیناز می‌باشند، سبب تنظیم جنبه‌های مختلف رشد رگ خونی از جمله حفظ بقاء سلول اندوتلیال (دیواره رگ خونی) و رشد آن، مهاجرت سلولی و نفوذ پذیری دیواره رگ می‌شوند.

پیام هیپوکسی توسط فاکتور محرک هیپوکسی (HIF-1) وساطت می‌شود که HIF-1، یک فاکتور رونویسی است که در شرایط کاهش اکسیژن فعال شده و سپس به یک ژن VEGF و حدود ۳۰ ژن دیگر اتصال یافته و رونویسی آنها را تحریک می‌کند و به این وسیله می‌تواند احتمال رشد تومور را به میزان زیادی افزایش دهد. در میان محصولات حاصل از بیان ژن‌هایی که رونویسی آنها توسط HIF-1 تحریک شده است، آنزیم‌های گلیکولیتیک از قبیل لاکتات دهیدروژناز وجود دارد. به این ترتیب HIF-1 به سلول‌های توموری این امکان را می‌دهد که با استفاده بیشتر از مسیر گلیکولیز نسبت به فسفریلاسیون اکسیداتیو به منظور تولید ATP، با شرایط کمبود اکسیژن، سازگار شوند. فعالیت HIF-1 توسط یک عامل حساس به میزان اکسیژن کنترل می‌شود که این حسگر دارای یک پیرولیل هیدروکسیلازی است که در حضور مقادیر نرمال O_2 فعال می‌شود و در شرایط کاهش O_2 غیر فعال می‌گردد. هیدروکسیلاسیون HIF-1 سبب یوبی کوئیتینه شدن و تجزیه فاکتور رونویسی شده، اما این فرایند در شرایط کاهش O_2 مسدود می‌شود.

1- Tumor microenviroment



◀ **شکل ۴ـ۲۵ (شکل رنگی) مبدأهای ممکن تولید سلول‌های بنیادی سرطانی.** برهمکنش میان سلول‌های بنیادی سالم و سلول‌های آشیانه حفاظتی. دربافت‌های سالم، سلول‌های آشیانه (سبزروشن) پیام‌هایی را تولید می‌کنند که به سلول‌های بنیادی عادی (آبی) این قابلیت را می‌دهند که بطور همزمان هم خودشان را دوباره تولید کنند و هم سلول‌هایی را ایجاد کنند که تکثیر و سپس تمایز می‌یابند (صورتی). این سلول‌های پیش‌ساز (صورتی، نارنجی، زرد) پیامی را از سلول‌های آشیانه دریافت نمی‌کنند، بنابراین بصورت سلول بنیادی باقی نمی‌مانند. هربار که سلول تقسیم می‌شود، ظرفیت تکثیر سلول‌های پیش ساز کاهش می‌یابد. تصاویر (b), (c), (d), (e) روش‌های مختلفی را نشان می‌دهند که در طی آنها مسیرهای محدود کننده حاصل از سلول‌های آشیانه که مانع گسترش سلول بنیادی می‌شود، مسدود شده و سلول‌های بنیادی عادی، توموری می‌شوند. (b) گسترش سلول بنیادی آشیانه (سبز کمرنگ) به سلول‌های بنیادین سرطانی (بنفش) که از سلول‌های بنیادی عادی ایجاد شده‌اند، این امکان را می‌دهد که به طور قابل توجهی گسترش یابند. افزایش میزان سلول‌های آشیانه احتمالاً به علت تغییرات ژنتیکی در آنها ایجاد شده است. (c) تغییرات سلول‌های بنیادی سرطانی (بنفش) آنها را قادر می‌سازد که با سلول‌های آشیانه (سبز تیره) جایگزین شده و آنها را برای تأمین پیامدهی به خود فراهم می‌کند. این مکانیسم می‌تواند باعث تهاجم به بافت‌های موضعی شود و یا امکان دارد رشد سلول‌های بنیادی سرطانی را در جایگاه‌های متاستاز تسهیل نماید. تومورهای تولید شده، مخلوطی از سلول‌های بنیادی سرطانی و غیرتوموری دودمانی هستند. (d) تغییرات ژنتیکی یا اپی ژنتیکی در سلول‌های بنیادی سرطانی، آنها را قادر می‌سازد که از سلول‌های آشیانه مستقل شده و تحت تاثیر پیام‌های خود تجدید شونده و خودمختار خودشان درآیند. تومورهای حاصله شامل سلول‌های بنیادی خود تجدید شونده و غیر توموری دودمانی هستند. (e) جهش‌ها ممکن است سبب شوند سلول‌های پیش ساز خاصیت خود تجدید شوندگی سلول‌های بنیادین را به دست آورند. این عدم کنترل رشد می‌تواند منجر به تشکیل تومور شود.

چندین پروتئین طبیعی مهار کننده آنژیوژنز (مثل آنژیوژنین و اندوستاتین) و آنتاگونیست‌های گیرنده VEGF به عنوان عوامل دارای قابلیت‌های درمانی فوق العاده مدنظر قرار گرفته‌اند. اگرچه رگهای خونی جدید به طور پیوسته در طی تکوین جنینی، تشکیل می‌شوند، اما در دوره بزرگسالی، به طور عادی این میزان به جز مواردی مثل پس از بروز جراحت و آسیب کمتر شده است. بنابراین مهارکنندگان اختصاصی آنژیوژنز، بر علیه انواع زیادی از تومورها مؤثر خواهند بود و می‌توانند اثرات جانبی هم از خود بجای

بگذارند. داروهای جدیدی که با توجه به این منطق سنتز می‌شوند، امیدهای جدیدی را ایجاد کرده‌اند. داروهای مهار کننده فعالیت تیروزین کینازی گیرنده VEGF مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. یکی از مواردی که اخیراً به تصویب رسیده است، استفاده از یک آنتی بادی منوکلونال برعلیه خود VEGF است که برعلیه سرطان کلون متاستازی استفاده می‌شود. یکی از مضرات این روش درمانی، ایجاد پاسخ ایمنی بر علیه آنتی بادی منوکلونال در بدن است که سبب از بین رفتن این آنتی بادی می‌شود. به منظور جلوگیری از بروز چنین واکنشی، تغییراتی را در آنتی بادی منوکلونال موشی به واسطه مهندسی ژنتیک اعمال کرده‌اند که سبب افزایش شباهت آن با توالی آنتی بادی منوکلونال انسانی شده است. آنتی بادی و سایر عوامل درمانی ضد سرطان‌های متاستازی، نتایج موفقیت‌آمیزی در افزایش مدت زمان پایداری دارو در بدن در حد فواصل ماهانه داشته است. امید بر این است که آرزوی ترکیب داروها برای تولید یک داروی جدید روز بروز به به واقعیت نزدیکتر شده و درمانها کاملتر گردند.

بروز جهش‌های خاصی سبب تبدیل سلول‌های کشت داده شده به سلول‌های توموری می‌شوند.

خصوصیات مربوط به ریخت‌شناسی و رشد سلول‌های توموری به طور واضح متفاوت از سلول‌های همتای سالم شان می‌باشد؛ برخی از این تفاوتها نیز در زمانی که سلول‌ها را کشت می‌دهیم، آشکار هستند. آن دسته از جهش‌هایی که سبب ایجاد چنین تفاوتهایی می‌شوند در نتیجه ایجاد یک سری تغییرات در یک دودمان از فیبروبلاستهای موشی کشت داده شده که سلول‌های 3T3 نامیده می‌شوند، بررسی و آزمایش شدند. این سلول‌ها تنها در شرایطی به طور عادی رشد می‌کنند که به سطح پلاستیکی یک دیش که در آن کشت داده شده‌اند بچسبند و در تراکم سلولی کمی در این وضعیت باقی بمانند. به دلیل اینکه رشد سلول‌های 3T3 به هنگام تماس با سایر سلول‌ها متوقف می‌شود، بنابراین در نهایت یک تک لایه از سلول‌های چسبیده به دیواره دیش را تولید می‌کنند که فرآیند تکثیر در آنها متوقف شده است و در فاز G_0 چرخه سلولی قرار گرفته‌اند (شکل ۵a - ۲۵).

زمانی که DNA مربوط به سلول‌های سرطان مثانه انسانی را به داخل سلول‌های 3T3 در محیط کشت وارد می‌کنیم حدود یک در میلیون از این سلول‌ها این قطعه ویژه از DNA اگزوژن را دریافت می‌کنند که سبب ایجاد تغییرات مشخصی در فنوتیپ آن می‌شود. زاده‌های حاصل از سلول مزبور، نسبت به سلول‌های سالم اطرافشان گردترند و چسبندگی کمتری به همدیگر و به دیش دارند و به این ترتیب یک دسته سه بُعدی از سلول‌هایی (یک فوکوس) را تشکیل می‌دهند که آنها را می‌توان به آسانی زیر میکروسکوپ تشخیص داد (شکل ۵b - ۲۵). چنین سلول‌هایی، زمانیکه سلول‌های سالم در فاز G_0 قرار دارند، به رشد خود ادامه می‌دهند و به این ترتیب دستخوش **تغییر شکل**[1] انکوژنیک می‌شوند. سلول‌های تغییر شکل یافته دارای ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های تومور بدخیم هستند که شامل تغییرات ریخت‌شناسی سلول، توانایی رشد به صورت نچسبیده به ماتریکس خارج سلولی، نیاز کاهش یافته آنها به فاکتورهای رشد، ترشح فعال کننده پلاسمینوژن، و فقدان میکروفیلامانتهای اکتین می‌باشد.

شکل ۶ - ۲۵ به طور مختصر نحوه تغییر شکل یافتن سلول‌های 3T3 حاوی DNA مربوط به سلول سرطانی مثانه انسان و کلون شدن این بخش اختصاصی DNA را که سبب ایجاد این تغییرات شده، نشان می‌دهد. یافتن یک قطعه کوچک DNA که دارای چنین قابلیتی باشد به آسانی امکان‌پذیر است؛ اما وقتی بیش از یک قطعه مورد نیاز باشد، آزمایش‌ها با مشکل مواجه خواهد شد. سرانجام دانشمندان نشان دادند که قطعات کلون شده، حاوی یک نوع جهش یافته از ژن‌های ras سلولی هستند، که در حالت عادی موقعیت ۱۲ این پروتئین یک گلیسین است و در حالت جهش یافته به جای آن یک والین می‌نشیند. این جهش یافته‌ها را به صورت ras^D نشان می‌دهند که «D» نشانه **بارز بودن**[2] است. این جهش از لحاظ ژنتیکی به صورت بارز است زیرا حتی اگر آلل دیگر مربوط به ras سالم باشد باز هم پروتئین، فعال است. **پروتئین Ras**[3] سالم که در اکثر مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی مشارکت دارد، توسط فاکتورهای رشد (فصل ۱۶) فعال شده و دارای دو فرم غیرفعال خاموش و متصل به GDP و فرم فعال، روشن و متصل به GTP می‌باشد. پروتئین Ras^D جهش یافته، GTP اتصال یافته را به کُندی هیدرولیز کرده و بنابراین GTP در جایگاه فعال آن تجمع یافته و سبب فرستادن پیامهای شروع کننده رشد به هسته می‌شود حتی در غیاب هورمون‌ها که در شرایط عادی برای فعال کردن اعمال پیام رسانی آن لازمند.

تولید و فعال سازی **مداوم**[4] پروتئین Ras^D، برای ایجاد تغییر شکل سلول‌های سالم موجود در یک محیط کشت اولیه (تازه) از فیبروبلاست‌های انسان، موش صحرایی، یا موش کافی نخواهد بود. برخلاف این سلول‌های موجود در یک محیط کشت اولیه، سلول‌های

1- Transformation
2- Dominant
3- Ras protein
4- Constitutive

3T3 کشت داده شده تحت تاثیر جهش‌های فقدان عملکرد ژن‌های p19ARF یا p53 که سبب تنظیم چرخه سلولی می‌شوند، قرار گرفته‌اند. اگر به چنین سلول‌هایی به طور دوره‌ای مواد مغذی برسانیم و سلول‌های اضافی را از محیط کشت برداریم (رقیق کنیم)، می‌توانند برای مدت نامحدودی رشد کنند، کاری که سلول‌های عادی نمی‌توانند انجام دهند (شکل ۳۱b - ۹ را ملاحظه کنید). این سلول‌های 3T3 نامیرا تنها تا زمانی که به طور پیوسته پروتئین Ras فعال یا سایر انکوپروتئین‌ها را تولید می‌کنند، می‌توانند به صورت سلول‌های توموری کاملاً شکفته تغییر کنند. به همین دلیل، ورود ژن ras^D به سلول‌ها سبب تغییر سلول‌های 3T3 و تبدیل آنها به سلول‌های توموری می‌شود. اما چنین اثری بر سلول‌های فیبروبلاست سالم که در محیط کشت اولیه قرار دارند ندارد.

ژن جهش یافته ras که در اکثر موارد در سرطان‌های کولون، مثانه، پانکراس و سایر سرطان‌های انسانی یافت می‌شود، در DNAی افراد سالم دیده نمی‌شود؛ بنابراین این جهش باید براثر جهش سوماتیک در یکی از سلول‌های پیش ساز سرطان ایجاد شده باشد. ژن‌هایی از قبیل ras^D که توانایی تغییر دادن سلول‌های موجود در محیط کشت یا القاء سرطان در حیوانات را دارند، تحت عنوان یک انکوژن خوانده می‌شوند. یک انکوژن از یک ژن سالم سلولی که پروتوانکوژن نام دارد منشاء می‌گیرد، مثل ras. انکوژن‌ها توسط ویروس‌هایی که سبب ایجاد سرطان در حیوانات می‌گردند حمل می‌شوند که این انکوژن‌ها اغلب از پروتوانکوژن‌هایی منشاء می‌گیرند که از ژنوم میزبان گرفته شده‌اند و به صورت انکوژن‌ها تغییر یافته‌اند. اولین کسی که به این یافته‌ها دست پیدا کرد، استارلینگ بود که دریافت این ویروس‌های خطرناک، ژن‌های حیوانات را برعلیه خودشان به کار می‌گیرند.

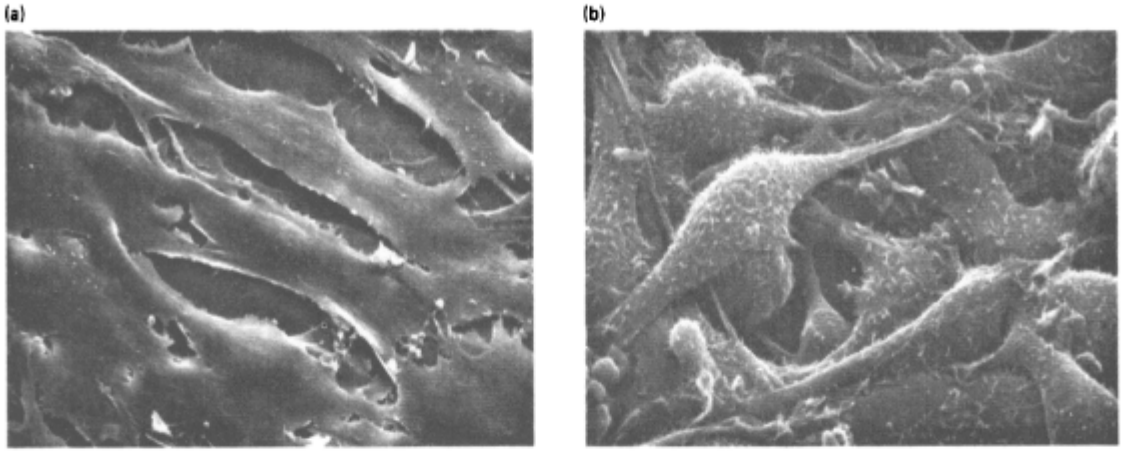
مدل القاء سرطان به صورت چندضربه‌ای (multi hit) توسط مدارک متعددی تایید شده است.

طبق آنچه که اخیراً ذکر شد و نتایجی که توسط تغییر انکوژنیک سلول‌های 3T3 حاصل شده است، می‌توان اظهار داشت که در اغلب موارد برای تبدیل یک سلول سالم بدنی به یک سلول سرطانی بدخیم، نیاز به ایجاد چندین ژن با هم است. با توجه به مدل multi-hit مراحل تکاملی سرطان‌ها (یا «بقای مناسب‌ترین‌ها») ناشی از فرایند انتخاب کلونی است، نه انتخاب حیوانات منحصر به فرد از میان یک جمعیت بزرگ. در این مدل، مراحلی مطرح می‌شود که امکان دارد در ایجاد سرطان دخیل باشد و یا نباشد. یک جهش در یک سلول، به احتمال زیاد در یک سلول بنیادی، بر سلول اثر گذاشته و رشد آن را به میزان ناچیزی افزایش می‌دهد. یکی از سلول‌های دختری حاصل از تقسیم سلول اولیه، دچار جهش ثانویه‌ای می‌شود که به زاده‌های آن، امکان رشد کنترل نشده و تشکیل یک تومور خوش خیم را می‌دهد. جهش سوم در سلول داخل این تومور، سبب رشد بیش از حد آن نسبت به سایر سلول‌ها شده که به فشارهای ناشی از محیط احاطه کننده تومور غلبه یافته و زاده‌های حاصل از آن یک توده سلولی را تولید می‌کنند که هر سلول آن دارای این سه جهش می‌باشد. وقوع یک جهش اضافی دیگر در یکی از این سلول‌ها، به زاده‌های آن اجازه ورود به داخل خون و ایجاد کلونی‌های دختری در سایر نقاط را می‌دهد که این امر نشانه‌ای از سرطان متاستازی است. این مدل دو پیش بینی را که براحتی قابل آزمایش هستند فراهم می‌آورد:

اول اینکه سلول‌های موجود در یک تومور دست‌کم باید چندین تغییر ژنتیکی رایج را دارا باشند. بررسیهای سیستماتیک سلول‌های جدا شده از تومورهای مجزای انسانی، این پیش گویی را تقویت می‌کند که تمام سلول‌های موجود در یک تومور، از یک سلول پیش ساز واحد منشاء گرفته‌اند. یادآوری می‌کنیم که در طی دوره زندگی جنینی یک انسان مونث، هر سلول یکی از دو کروموزوم X خود را غیر فعال می‌کند. جنس ماده از لحاظ ژنتیکی به صورت موزائیک است؛ یعنی در نیمی از سلول‌ها، یک کروموزوم X غیر فعال می‌شود و در بقیه سلول‌ها X دیگر غیر فعال شده است. اگر یک تومور، از یک پیش ساز واحد منشاء نگیرد، بنابراین در آن ترکیبی از سلول‌ها وجود دارد که در هر کدام یک X متفاوت غیر فعال شده است. در حقیقت سلول‌های مربوط به تومور در یک جنس ماده، همگی یک X غیر فعال یکسان دارند. تومورهای مختلف می‌توانند متشکل از سلول‌هایی باشند که در آنها یا X مادری و یا X پدری غیر فعال شده است.

ثانیاً، به این دلیل که بروز جهش‌هایی که به سرطان منجر می‌شوند نیاز به گذر چندین دهه دارد، بنابراین شیوع سرطان باید با افزایش سن، بیشتر شود. بررسیها نشان می‌دهد که در طی یک دوره مشخص از زندگی، نسبت بروز جهش به شیوع اکثر انواع سرطان یک میزان ثابت است. بنابراین نتیجه میگیریم که اگر برای تبدیل یک سلول سالم به یک سلول بدخیم، فقط بروز یک جهش لازم باشد، پس بروز سرطان مستقل از سن می‌باشد. حقیقت این است که برای ایجاد سلول‌های سرطانی بسیار خطرناک، نیاز به وقوع ۶ - ۵ حادثه یا جهش است. همانطور که داده‌های شکل ۷ - ۲۵ نشان می‌دهد، میزان بروز اکثر انواع سرطان‌های انسانی به طور مؤثری با افزایش سن افزایش می‌یابد.

بیشتر شواهد مستقیم در ارتباط با نیاز به بروز چندین جهش

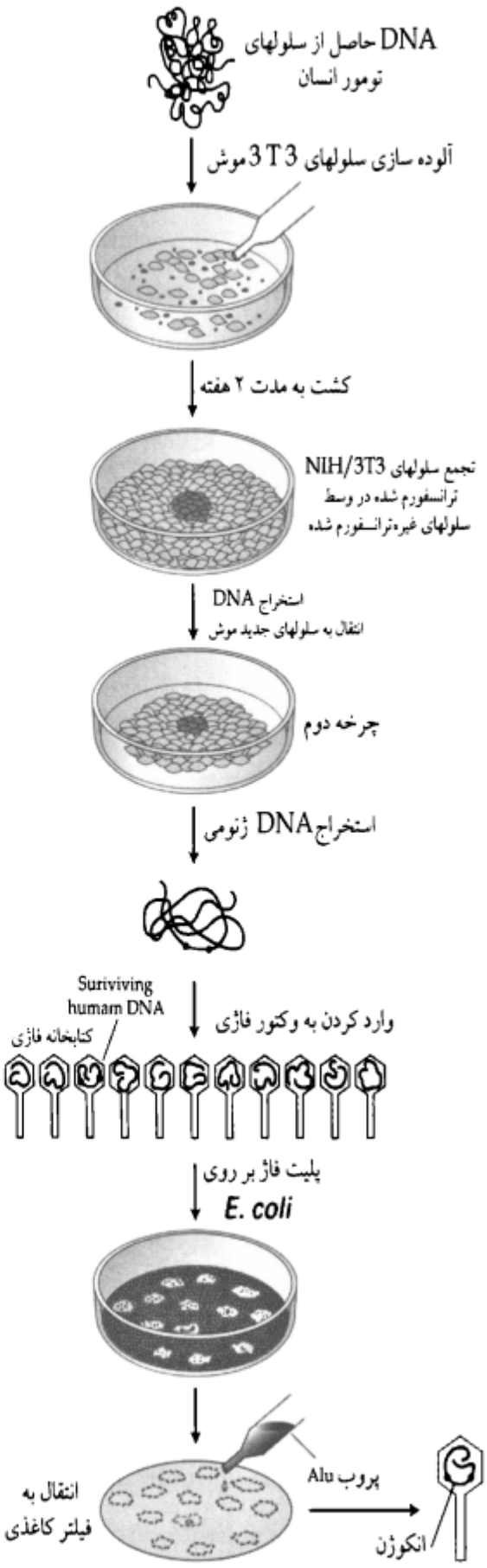


▲ **شکل تجربی ۵ - ۲۵ میکروگراف‌های الکترونی اسکن شده نشان دهنده تغییرات ساختاری و ریخت‌شناسی در بین سلول‌های 3T3 سالم و تغییر شکل یافته است.** (a) سلول‌های 3T3 سالم طویل اند و به طور تنگاتنگی در یک ردیف به طور منظم کنار هم فشرده شده‌اند. (b) سلول‌های 3T3 تغییر یافته توسط انکوژنی که به وسیله ویروس سارکومای راس کد می‌شود، مدوّرند و توسط رشته‌های مو مانند کوچک پوشیده شده و دارای برآمدگی‌های پیازی شکل‌اند. سلول‌های تغییر یافته‌ای که رشد کرده‌اند فاقد اتصالات پهلو به پهلو در سلول‌های سالمند و روی هم قرار گرفته‌اند. این سلول‌های تغییر شکل یافته ویژگی‌های مشابه با سلول‌های بدخیم دارند. تغییرات مشابهی هم در سلول‌های آلوده به DNA سرطانی انسان که حاوی‌انکوژن rasD است به چشم می‌خورد.

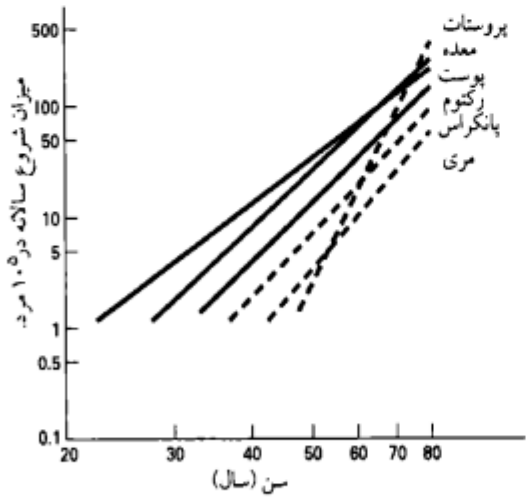
برای القاء سرطان، توسط مطالعه و بررسی موشهای ترانس‌ژنیک حاصل شده‌اند. ترکیبات متنوعی از انکوژن‌ها می‌توانند سبب ایجاد سرطان شوند. به عنوان مثال، موشهایی را که حامل اونکوژن بارز ras^{V12} جهش یافته (یک نوع ras^{D}) یا پروتوانکوژن c-myc هستند تحت کنترل یک **افزاینده**[1]/**پروموتر** اختصاصی برای سلول پستانی حاصل از یک رترو ویروس قرار می‌دهند. پروموتور تحت اثر سطح هورمونهای اندوژن و تنظیم کننده‌های مختص بافت تحریک شده و منجر به افزایش بیان c-myc یا ras^{V12} در بافت پستان می‌شود. بیان افزایش یافته c-myc، با تقلید از عمل جهش‌های انکوژنیک که پیش از این بررسی شدند و سبب افزایش رونویسی c-myc می‌شوند، پروتوانکوژن را به انکوژن تبدیل می‌گرداند. ژن تغییر یافته c-myc تنها پس از ۱۰۰ روز و در تعداد اندکی از موشها، سبب بروز سرطان می‌شود. به طور عمده تنها بخش کمی از سلول‌های پستانی که پروتئین Myc را به میزان زیادی تولید می‌کردند، تبدیل به سلول‌های بدخیم سرطانی شدند. به طور مشابه، تولید پروتئین Ras^{V12} جهش یافته به تنهایی سبب ایجاد تومورهایی در ابتدا می‌شود اما این روند بسیار کند است و ۵۰٪ اثر آن پس از ۱۵۰ روز ظاهر می‌شود. زمانی که ژن‌های تغییر یافته c-myc و ras^{V12} با هم در یک سلول ظهور یابند، سبب می‌شود که تمام سلول‌های پستانی هم ras^{V12} و هم Myc را تولید کرده و سبب ایجاد تومور با سرعتی بسیار بالا می‌شود و تمام حیوانات دچار سرطان می‌شوند (شکل ۸ - ۲۵). این آزمایش‌ها نشان دهنده **اثرات مضاعف**[2] ناشی از بروز چندین انکوژن با هم است. همچنین این‌آزمایش‌ها پیشنهاد می‌کنند که طول دوره تشکیل تومور، حتی در موش‌های ترانس ژنیک - دوتایی، ناشی از نیاز برای ایجاد جهش‌های بدنی اضافی است.

اثرات تعاونی مشابهی را نیز می‌توان در میان انکوژن‌های سلول‌های موجود در محیط‌کشت مشاهده نمود. به عنوان مثال، آلوده سازی فیبروبلاستهای سالم (فیبروبلاستهای 3T3 ای که به طور جزئی هم آلوده نشده‌اند) با c-myc یا ras^{D} فعال شده برای ایجاد تغییرات انکوژنیک، کافی نیست، در حالی که اگر این دو را با هم بکار ببریم، هر دو ژن برای ایجاد تغییر در سلول باهم مشارکت می‌کنند. مقادیر تنظیم نشده c-myc به تنهایی تکثیر را القاء می‌کند، اما همچنین سبب حساس شدن سلول نسبت به آپوپتوز می‌گردد و افزایش بیان ras^{D} فعال شده به تنهایی سلول‌ها را به مرحله‌ای وارد می‌کنند که در آن سلول‌ها دیگر تقسیم نمی‌شوند و این فرایند تحت عنوان **پیری**[3] خوانده می‌شود. زمانی که دو انکوژن در یک سلول بیان می‌شوند، پاسخهای سلولی منفی تعدیل شده و سلول‌ها تغییر

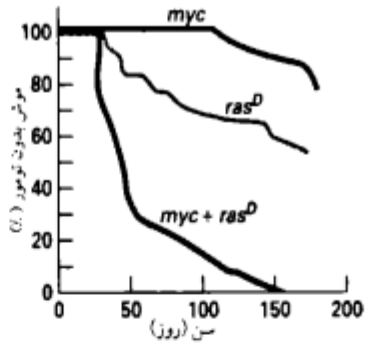
1- Enhancer
2- Synergistic effect
3- Senscence



▶ شکل تجربی ۶ - ۲۵. تغییر سلول‌های موش با DNA حاصل از سلول سرطانی انسان، امکان شناسایی و کلون کردن مولکولی انکوژن ras^D را فراهم می‌سازد. افزودن DNAی مربوط به سلول‌های سرطان مثانه انسانی به سلول‌های 3T3 کشت داده شده موشی، سبب می‌شود که حدود یک از میلیون سلول موجود در محیط کشت به صورت غیر عادی تقسیم شده و تشکیل یک فوکوس یا کلون از سلول‌های تغییر شکل یافته را دهد. برای کلون کردن انکوژن مسئول تغییر شکل، از این خاصیت استفاده می‌شود که اکثر ژن‌های انسانی دارای توالیهای تکراری DNA هستند که در مجاورت هم قرار گرفته و توالی‌های Alu نام دارند. DNA را از فوکوس اولیه سلول‌های تغییر یافته موشی جدا کرده و انکوژن را از DNAی خارجی به انسان توسط انتقال ثانویه به سلول‌های موشی جدا می‌کنند. DNAی خارجی، DNAی انسانی است که اثری روی تغییر سلولی ندارند اما فقط DNAی کامل از یک سلول موشی که به طور ثانویه آلوده شده است در داخل باکتریوفاژ λ کون می‌شود: تنها آن دسته از فاژهایی که DNAی انسانی را به دست آورده‌اند، با پروب Alu هیبریدمی‌شوند. فاژ هیبرید شده، باید دارای بخش یا تمام انکوژن تغییر دهنده باشد. نتایج قابل انتظار را می‌توان توسط نشان دادن اینکه DNAی فاژ می‌تواند سلول‌ها را تغییر دهد (اگر که انکوژن به طور کامل کلون شده باشد) یا اینکه قطعات کلون شده DNA همیشه در سلول‌های تغییر یافته توسط انتقال DNA از سلول سرطان مثانه که دهنده اولیه است، وجود دارد.



▲ شکل تجربی ۷-۲۵ شیوع سرطان‌های انسانی با افزایش سن، بیشتر می‌شود. افزایش شیوع سرطان و ارتباط آن با افزایش سن، در مدل چندضربه‌ای مطرح می‌گردد. این نمودار براساس لگاریتم شیوع سالانه در برابر لگاریتم سن ترسیم شده است.



▲ شکل تجربی ۸-۲۵ کینتیک بروز تومور در موش ماده حامل یکی یا هر دو ترانس ژن‌های انکوژنیک نشان می‌دهد که الگوی القای سرطان توسط جهش‌های چندگانه به صورت تعاونی است. هر کدام از ترانس ژن‌ها را توسط پروموتر مختص پستان در ویروس تومور پستان موش (MMTV) القا می‌کنیم. تحریکات هورمونی ناشی از حاملگی، پروموتر MMTV را فعال کرده و سبب افزایش بیان در ترانس ژن‌ها می‌شود. نمودار نشان دهنده مدت زمان ایجاد تومور در موشهایی است که ژن‌های تغییر یافته myc یا ras^D را حمل می‌کنند به همراه نمودار مربوط به نسل دو رگه حاصل از آمیزش موشهای حامل myc با حاملان rasD که دارای هر دو ژن تغییر یافته هستند. نتایج به طور آشکارا مشخص کننده اثرات تعاونی جهش‌های چندگانه بر میزان شیوع سرطان می‌باشند.

می‌یابند. از آنجایی که آزمایش‌ها ذکر شده ترکیبی از انکوژن‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند، این نیز امکان دارد که سرعت ایجاد سرطان یا تغییر سلول‌های کشت داده شده توسط بکارگیری همزمان یک تومور با از بین بردن یک ژن سرکوب کننده تومور، افزایش یابد.

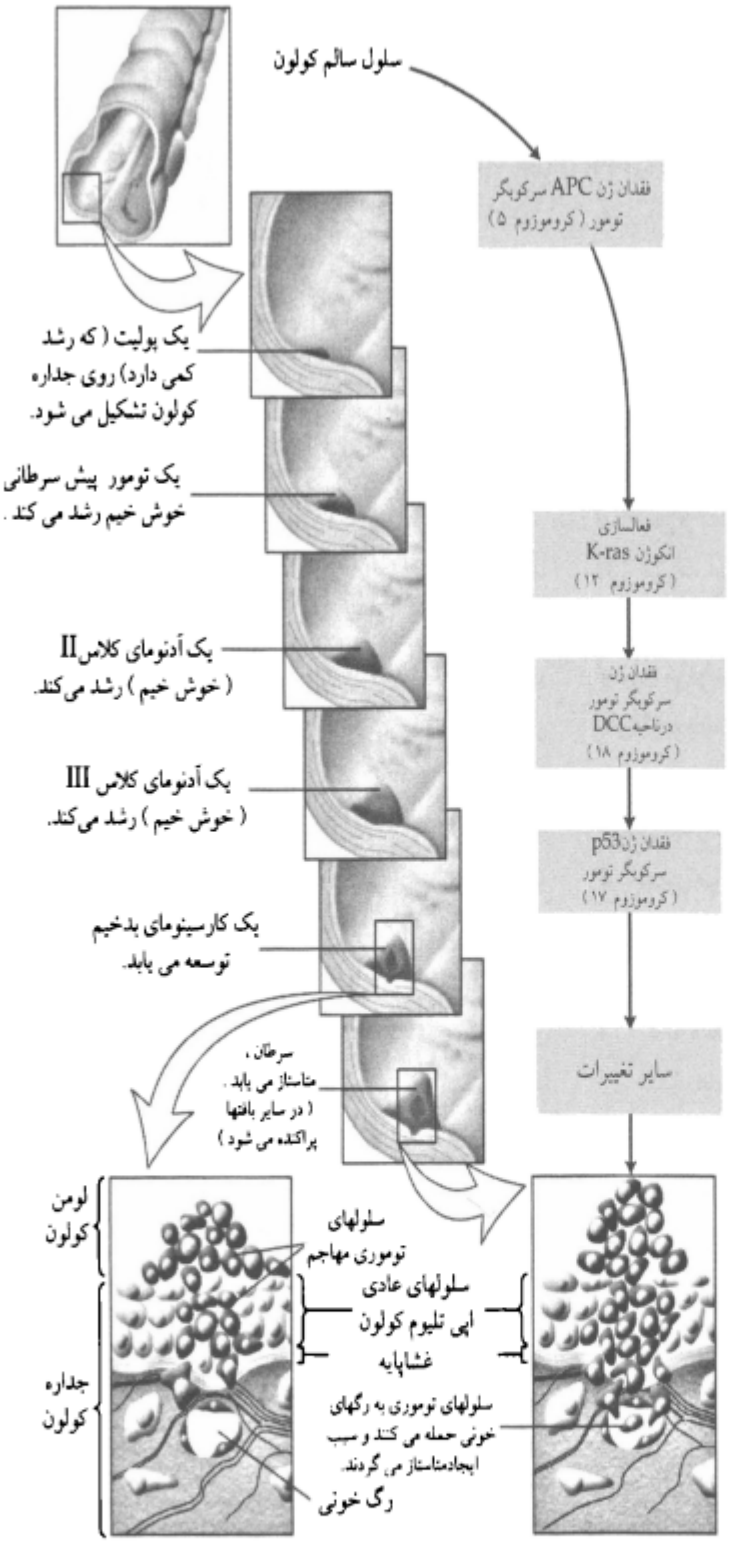
جهش‌های انکوژنیک متوالی را می‌توان در سرطان‌های کولون ردیابی نمود.

مطالعات صورت گرفته روی سرطان کولون، شواهد بیشماری را برای تعیین مدت زمان القاء سرطان در مدل چندضربه‌ای فراهم نموده است. جراحان زمانی که تومور تنها برای یک دوره زمانی قابل رؤیت می‌شود، می‌توانند نمونه‌های خالص بسیار نادری را استخراج کرده که تعیین دقیق زمان پیشروی سرطان را نمی‌توان به آسانی مشخص نمود. استثناء ای که در این زمینه وجود دارد، سرطان کولون است که شامل مراحل مجزایی است که هر مرحله دارای خصوصیات مورفولوژیکی قابل تشخیص از سایر مراحل است. این مراحل حد واسط (پولیپ‌ها، آدنوماهای خوش خیم و کارسینوماها) توسط یک جراح از هم مجزا شده و به او امکان تشخیص جهش‌هایی راکه در هر مرحله مورفولوژیکی رخ می‌دهند فراهم می‌کند. مطالعات بیشماری نشان می‌دهند که سرطان کولون حاصل یک دسته از جهش‌هایی است که عموماً طبق یک نظم تعریف شده اتفاق می‌افتند و سبب تقویت مدل چندضربه‌ای می‌شود (شکل ۹ - ۲۵).

به طور تغییرناپذیر، اولین مرحله در ایجاد کارسینومای کولون شامل از بین رفتن عملکرد ژن APC (adenomatous polyposis coli) می‌باشد که سبب ایجاد پولیپ‌هایی (رشد **پیش سرطان‌ها**[1]) روی دیواره داخلی کولون می‌شود. همانطورکه شکل ۹ - ۲۵ نشان می‌دهد در اکثر سرطان‌های کولون و نه همه آنها، تمام جهش‌های بعدی ایجاد می‌شود و یا اینکه آنها را طبق یک نظم خاص به دست می‌آورند. بنابراین ترکیبات مختلف جهش‌ها ممکن است باعث ایجاد یک فنوتیپ مشترک شوند. اکثر سلول‌های موجود در یک پولیپ حاوی یک یا دو جهش یکسان در ژن APC هستند که سبب فقدان یا کاهش فعالیت آن می‌شوند؛ بنابراین آنها کلون‌های سلولی هستند که جهش اولیه در آنها اتفاق افتاده است. APC یک ژن سرکوبگر تومور است و برای ایجاد پولیپ‌ها لازم است که هر دو آلل ژن APC دچار یک جهش غیر فعال کننده شوند زیرا سلول‌های سالم که دارای APC تیپ وحشی هستند، پروتئین APC را در مقادیر مناسب بیان می‌کنند تا به طور عادی به فعالیت بپردازد. همانند اکثر ژن‌های سرکوب کننده تومور، APC پروتئینی راکد می‌کند که سبب مهار پیش روی چرخه سلولی در انواع خاصی از سلول‌ها می‌شود. پروتئین APC توسط مهار مسیر انتقال پیام Wnt (فصل ۱۶) مانع از فعال شدن بیان پروتوانکوژن‌هایی از جمله ژن c-myc می‌شوند. عدم حضور پروتئین APC عملکردی، منجر به تولید نامناسب Myc (یک فاکتور رونویسی که بیان اکثر ژن‌های مورد نیاز برای گذر از فاز G_1 به فاز S چرخه سلولی را تحریک می‌کند) می‌شود. سلول‌هایی که دارای جهش‌های APC به صورت هموزیگوت هستند، در سرعت‌هایی بالاتر از حالت عادی تکثیر یافته و پولیپها را تشکیل می‌دهند.

اگر یکی از سلول‌های موجود در پولیپ، دچار جهش‌های دیگری شوند، این بار یک جهش فعال کننده ژن ras زاده‌های حاصل از آن حتی به صورت غیر کنترل شده‌تری تقسیم شده و یک آدنومای بزرگتر را تشکیل می‌دهند (شکل ۹ - ۲۵). جهش‌هایی که سبب از بین رفتن یک ناحیه ویژه از کروموزوم می‌شوند (ژن مربوطه هنوز شناسایی نشده است)، به دنبال غیر فعال سازی ژن p53 سبب کاهش تدریجی تنظیم نرمال و در نتیجه ایجاد یک کارسینومای بدخیم می‌شوند. از آنجائیکه چهار ضربه لیست شده در اینجا،

1- Precancerous



◀ **شکل ۹-۲۵ نحوه رشد و متاساز سرطان کلورکتال انسان و اساس ژنتیکی آن.** بروز یک جهش در ژن APC سرکوب‌کننده تومور در یک سلول اپی تلیال واحد، سبب تقسیم سلول می‌شود که اگرچه سلول‌های مجاور آن تقسیم نمی‌شوند، اما یک توده از سلول‌های تومورى خوش خیم یا پولیپ را تشکیل می‌دهد. جهش‌های بعدی، منجر به بیان پیوسته پروتئین Ras فعال و از بین رفتن دو ژن سرکوب کننده تومور (یک ژن موجود روی کروموزم ۱۸ که هنوز مشخص نشده و p53) می‌گردد که باعث ایجاد یک سلول بدخیم که حاصل هر چهار جهش است می‌شود. فقدان ژن سرکوبگر تومور روی کروموزم ۱۸ ناشی از حذف منطقه‌ای از کروموزم است که دارای ژن DCC (بخش حذف شده در سرطان کلورکتال) می‌باشد. هنوز مشخص نیست که این ژن خاص آیا واقعاً با سرطان ارتباط دارد یا نه، اما گاهی اوقات از لحاظ عملکردی شباهت زیادی با سرکوب کننده‌های تومور دارد. این سلول‌ها به تقسیم خود ادامه داده و زاده‌های آنها به غشا پایه که بافتها را احاطه می‌کند، هجوم می‌برند. برخی از سلول‌های تومورى از محل خود جدا شده و به داخل رگ خونی رفته و از آنجا به سایر نقاط بدن می‌روند. جهش‌های اضافی به سلول‌های تومورى این امکان را می‌دهند که از رگ‌های خونی خارج شده و در نقاط دور از مبداء شروع تکثیر کنند؛ بیماری که چنین تومورى دارد، یک بیمار سرطانی است.

قسمتهای مهم تصویر هستند، بنابراین ممکن است فرایندهای ژنتیکی دیگری نیز دخیل باشند.

حدود نیمی از تومورهای انسانی دارای جهش‌هایی در ژن سرکوبگر تومور p53 هستند که یک عامل کلیدی تنظیم کننده رونویسی مسئول پاسخ به استرس راکد می‌کند. فعالیت p53 سبب می‌شود که چرخه سلولی در شرایط استرس متوقف شده و یا سلول‌هادچار آپوپتوز شوند. یک مرحلهٔ حیاتی در کنترل چرخهٔ سلولی کنترل نقطه G_1 است که از ورود سلول‌هایی که DNA آنها آسیب

دیده است به فاز S جلوگیری می‌کند (شکل ۳۵ - ۲۰، 4a). پروتئین p53 یک حسگر کنترل کننده نقطه G_1 است که سلول‌های دارای DNA آسیب دیده را در G_1 متوقف می‌کند. این توقف می‌تواند به طور موقتی، سبب تصحیح آسیب‌های وارده به سلول شود و یا به طور دائمی سبب پیری سلول گردد. پروتئین p53 دارای چندین عمل است و اینکه کدامیک از اعمال آن مرتبط با فعالیت سرکوب کنندگی تومور در آن است، هنوز نامشخص باقی مانده است. به عنوان مثال، یک پروتئین p53 جهش یافته که قادر به فعال‌سازی رونویسی نیست، می‌تواند تشکیل تومور را مهار کند. در حقیقت تمام جهش‌های p53، توانایی آن را برای اتصال به قطعات اختصاصی DNA از بین برده و سبب فعال‌سازی بیان ژن می‌شوند.

DNAی حاصل از کارسینوماهای مختلف کولون انسان، عموماً حاوی جهش‌هایی در هر چهار ژن (جهش‌های کاهش عملکرد در سرکوبگرهای توموری APC و p53، ژن‌هایی که تا کنون مبهم مانده‌اند و یک جهش فعال کننده (به دست آورنده عملکرد) در انکوژن بارز K-ras (ژنی از خانواده ژن‌های ras) هستند که نشان می‌دهد برای ایجاد سرطان نیاز به وقع جهش‌های چندگانه در سلول است. به نظر می‌رسد که برخی از این جهش‌ها سبب افزایش میزان رشد در مراحل اولیه توسعه تومور می‌شود در حالیکه سایر جهش‌ها مراحل پایانی را راه اندازی می‌کنند که این مراحل شامل تهاجم و متاستاز است که برای ایجاد فنوتیپ بدخیم لازمند. تعدادی از جهش‌های مورد نیاز برای پیشروی سرطان کولون ممکن است در ابتدا حیرت‌انگیز به نظر برسند زیرا ظاهراً به صورت یک مانع مؤثر در ایجاد سرطان عمل می‌کنند. ژنومها، تحت تاثیر تهاجمات پیوسته‌ای قرار می‌گیرد. حدسیات اخیر نشان می‌دهند که پولیپهایی که به صورت انفرادی[1] ظاهر می‌شوند، حدود ۱۱۰۰۰ تغییر ژنتیکی در هر سلول دارند که به احتمال بسیار زیاد تنها تعداد کمی از آنها با پدیده سرطانزایی مرتبطند. ناپایداری ژنتیکی، نشانه‌ای از سلول‌های سرطانی است.

کارسینومای کولون، مثال جالبی از مدل چندضربه‌ای برای سرطان است. روشی که این مدل در بروز سرطان به کار می‌گیرد به تازگی کشف شده است اما چیزی که واضح است این است که انواع متفاوت سرطان برای ایجاد، نیاز به بروز چندین جهش دارند.

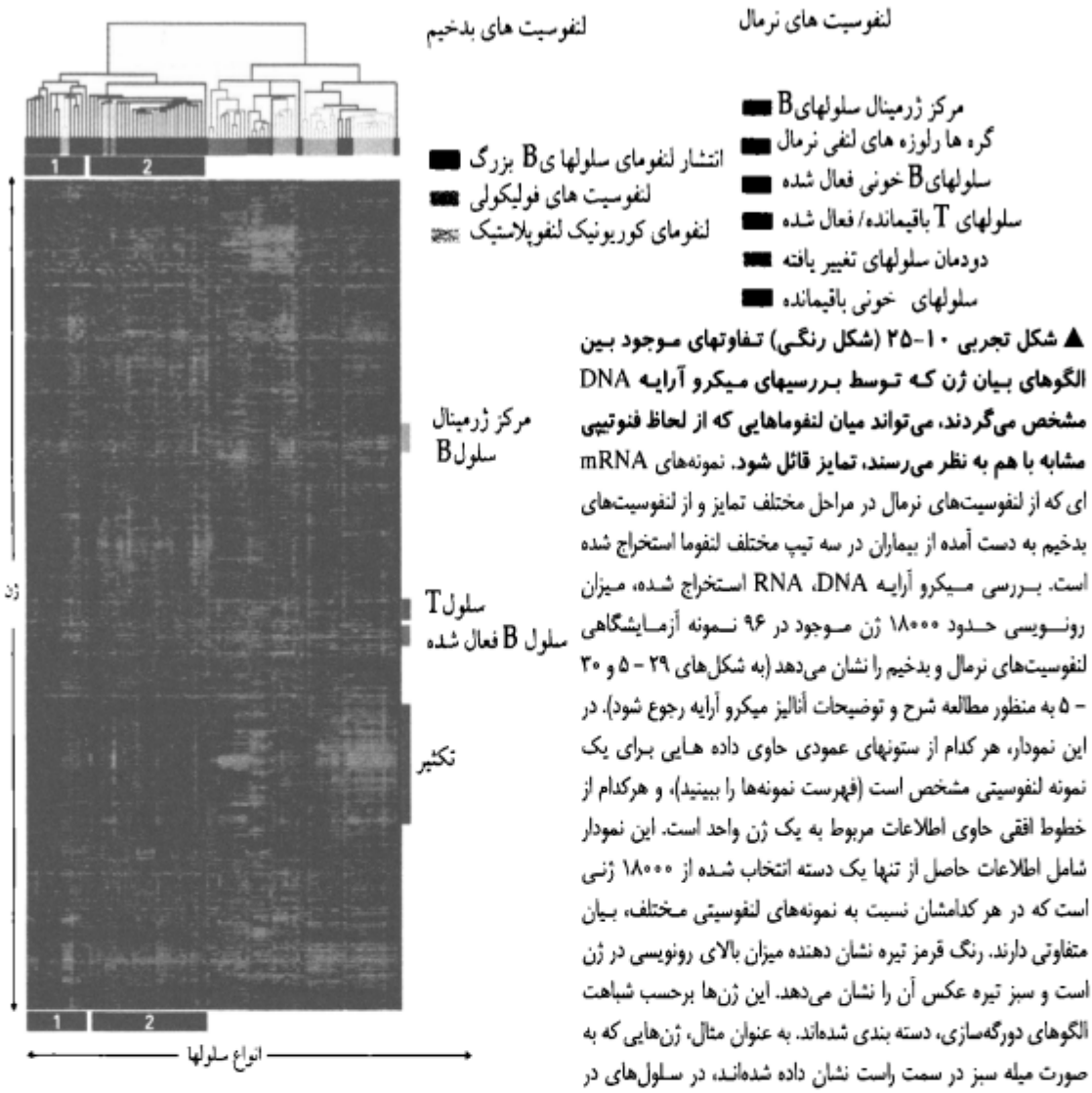
استفاده از میکرو آرایه DNA به منظور بررسی الگوهای بیان، تفاوت‌های جزئی میان سلول‌های سرطانی را آشکار نموده است.

خصوصیات مختص سلول‌های توموری و سالم به واسطه رنگ‌آمیزی و بررسی‌های میکروسکوپی این سلول‌ها تعیین گردید. اکثر تومورها را می‌توان در داخل یک محدوده معین توسط بررسی ویژگی‌های بافتی آنها شناسایی نمود. بنابراین بررسی سلول‌ها به تنهایی، محتوای اطلاعاتی ما را کاهش می‌دهد و نیاز به روش‌های بهتری می‌باشد که بتوان توسط آنها هم پدیده سرطانزایی را بهتر درک کرد و هم تصمیمات درست و منطقی را در ارتباط با پیش بینی وجود تومور و مداوای آن اتخاذ نمود.

مطالعات ژنتیکی می‌توانند جهش‌های شروع کننده و دسته‌ای از جهش‌ها را که سبب تغییر شکل سلول‌های سالم به سلول‌های توموری می‌شوند شناسایی کنند. که در مورد سرطان کولون انجام شده است. پس از آنکه این وقایع اتفاق افتادند، سلول‌های توموری تحت تاثیر تغییرات آبشاری که سبب ایجاد ارتباط میان وقایع شروع و پیامهایی که از خارج می‌آیند، قرار می‌گیرند. در نتیجه، سلول‌های توموری می‌توانند نسبت به همدیگر تفاوت‌های بسیاری داشته باشند حتی اگر به واسطه یک یا چند جهش شروع کننده یکسان، ایجاد شده باشند. اگرچه این تغییرات در ظاهر سلول‌ها نمایان نمی‌شوند، اما می‌توان آنها را توسط بررسی الگوهای بیان ژن در سلول‌ها مشخص کرد. بررسی میکرو آرایه DNA می‌تواند به طور همزمان، بیان دهها هزار ژن را بررسی نموده و سبب می‌شود که بتوانیم فنوتیپهای پیچیده را در قالب ژنتیک مولکولی تعریف کنیم (به شکل ۲۹ - ۵ و ۳۰ - ۵ به منظور شرح این تکنیک‌ها رجوع شود).

تکنیک‌های به کار گرفته شده در تکنولوژی میکرو آرایه DNA این امکان را فراهم نموده است که ویژگی‌های تومورها را با آزمایش‌ها بسیار دقیقتری بررسی نمائیم. این موضوع که تومورهای اولیه را اغلب می‌توان توسط الگوی بیان ژن شان از تومورهای متاستازی تمایز داد، چندان حیرت آور نیست. به طور هیجان انگیزی، دسته‌ای از تومورهای اولیه جامد کشف شده‌اند که دارای ویژگی‌هایی هستند که شاخص تومورهای متاستازی می‌باشند که احتمالاً به وسیله آنها شناسایی تومورهای اولیه‌ای که به احتمال بیشتری متاستازی می‌شوند امکان‌پذیر خواهد شد. این امر همچنین سبب می‌شود که حداقل در برخی از انواع تومورها، بتوان وقایعی را که سبب هدایت یک تومور اولیه به یک تومور متاستازی می‌شود را شناسایی نمود. این فرضیه را می‌توان از روشی که در آن ضرورت وجود یک زیر دسته از سلول‌های کمیاب در داخل تومور اولیه که برای متاستازی شدن لازم است تا دچار جهش‌های بیشتر شوند، تمییز داد.

1- Sporadic



▲ **شکل تجربی ۱۰-۲۵ (شکل رنگی) تفاوتهای موجود بین الگوهای بیان ژن که توسط بررسیهای میکرو آرایه DNA مشخص می‌گردند، می‌تواند میان لنفوماهایی که از لحاظ فنوتیپی مشابه با هم به نظر می‌رسند، تمایز قائل شود.** نمونه‌های mRNA ای که از لنفوسیت‌های نرمال در مراحل مختلف تمایز و از لنفوسیت‌های بدخیم به دست آمده از بیماران در سه تیپ مختلف لنفوما استخراج شده است. بررسی میکرو آرایه DNA، RNA استخراج شده، میزان رونویسی حدود ۱۸۰۰۰ ژن موجود در ۹۶ نمونه آزمایشگاهی لنفوسیت‌های نرمال و بدخیم را نشان می‌دهد (به شکل‌های ۲۹ - ۵ و ۳۰ - ۵ به منظور مطالعه شرح و توضیحات آنالیز میکرو آرایه رجوع شود). در این نمودار، هر کدام از ستونهای عمودی حاوی داده هایی برای یک نمونه لنفوسیتی مشخص است (فهرست نمونه‌ها را ببینید)، و هرکدام از خطوط افقی حاوی اطلاعات مربوط به یک ژن واحد است. این نمودار شامل اطلاعات حاصل از تنها یک دسته انتخاب شده از ۱۸۰۰۰ ژنی است که در هر کدامشان نسبت به نمونه‌های لنفوسیتی مختلف، بیان متفاوتی دارند. رنگ قرمز تیره نشان دهنده میزان بالای رونویسی در ژن است و سبز تیره عکس آن را نشان می‌دهد. این ژن‌ها برحسب شباهت الگوهای دورگه‌سازی، دسته بندی شده‌اند. به عنوان مثال، ژن‌هایی که به صورت میله سبز در سمت راست نشان داده شده‌اند، در سلول‌های در حال تکثیر از جمله سلول‌های تغییر یافته در محیط کشت (میله صورتی دربالا) یا سلول‌های لنفومای سلول B بزرگ منتشر شده (میله آبی پررنگ در بالا)، فعال هستند. ژن‌هایی که توسط میله‌های قرمز و آبی در سمت راست نشان داده شده‌اند، به ترتیب در سلول‌های T و سلول‌های B فعالند. ژن‌هایی که توسط میله‌های قرمز و آبی در سمت راست نشان داده شده‌اند، به ترتیب نمونه‌های مختلف سلولی در بالای نمودار نیز برحسب الگوهای بیان مشابه گروه‌بندی شده‌اند. نتایج حاصل از این دندروگرام[1] (نمونه‌های آبی تیره) را می‌توان در دو گروه (میله‌های سیاه ۱ و ۲) دسته بندی کرد. یک گروه از آنها کاملاً مشابه لنفوسیتهای B تمایز نیافته موجود در مراکز ژرمینال (نمونه‌های نارنجی) است و بقیه مشابه سلول‌های B تمایز یافته‌تر هستند (نمونه‌های خاکستری).

اخیراً تکنیک بررسی میکرو آرایه را برای مطالعه انتشار سلول‌های B لنفومای بزرگ (بیماری که به واسطه وجود مقادیر فراوان و غیر عادی لنفوسیت‌های B بزرگ در خارج از گره‌های لنفی، تشخیص داده می‌شود) به کار گرفته‌اند. هر کدام از بیماران دارای نشانه‌های متفاوتی نسبت به سایرین هستند، به همین دلیل گمان برده می‌شود که این بیماری به صورت چندگانه باشد. بررسی میکرو آرایه لنفومای حاصل از بیماران مختلف، دو گروه از آنها را که‌توسط الگوهای بیان ژن از هم متمایز می‌شوند مشخص نموده است (شکل ۱۰ - ۲۵). هیچ نشانه مورفولوژیکی یا قابل رؤیتی وجود ندارد که بتوان این دو نوع تومور را توسط آنها از هم تشخیص داد. برحسب تعریفی که توسط داده‌های حاصل از میکرو آرایه به دست آمده است تیپ I و تیپ II را از هم مشخص می‌کنیم که بیماران دارای تومورهای تیپ I، طول عمر بیشتری نسبت به سایر تیپ‌ها دارند. لنفوماهایی که بیان ژن در آنها مشابه لنفوسیت‌های B در

1- Dendrogram

مراحل اولیه تمایز است را می‌توان بهتر پیش بینی کرد. لنفوماهایی که بیان ژن در آنها شباهت بیشتری به لنفوسیت‌های B تمایز یافته دارد را به سختی می‌توان پیش بینی نمود. انجام بررسی‌های مشابه روی الگوهای بیان ژن در سایر تومورها، احتمالاً سبب بهینه شدن دسته بندی‌ها و تشخیص آنها شده و سبب می‌شود که تصمیمات آگاهانه‌ای در مورد روشهای درمانی اتخاذ کنیم و همچنین بینش ما را در مورد خصوصیات سلول‌های توموری وسعت می‌دهد.

نکات کلیدی بخش ۱-۲۵

سلول‌های توموری و منشاء سرطان

■ سرطان یک تغییر اساسی در رفتار سلول است که بسیاری از جنبه‌های بیولوژی سلول را در برمی گیرد. بسیاری از سلول‌های بدن می‌توانند به سلول‌های توموری بدخیم (سرطان) تبدیل می‌شوند.

■ سلول‌های سرطانی می‌توانند در غیاب حداقل برخی از فاکتورهای محرک رشد مورد نیاز برای تکثیر سلول‌های طبیعی رشد کنند و به پیامهایی که به صورت طبیعی مرگ سلولی (آپوپتوز) را برنامه‌ریزی می‌کنند مقاوم هستند.

■ بسیاری از جهش‌های انکوژنیک در سلول‌های سوماتیک روی می‌دهند و در DNAی سلول‌های زایا حمل نمی‌شوند.

■ گاهی اوقات سلول‌های سرطانی به بافتهای اطراف حمله برده، اغلب غشاهای پایه اطراف را که به عنوان موانعی در بین بافتهاست از بین برده و در بدن حرکت کرده و در یک مکان ثانویه قرار می‌گیرند که به این پدیده متاستاز می‌گویند. تومورهای متاستازی معمولاً پروتئازها را ترشح می‌کند که ماتریکس خارج سلولی احاطه کننده آنها را تخریب می‌کند (شکل ۳-۲۵).

■ سلول‌های سرطانی ممکن است از سلول‌های بنیادی و گاهی اوقات از سلول‌های تکثیرشونده بوجود آیند. سلول‌های سرطانی بسیار شبیه سلول‌های پیش‌ساز والد هستند تا سلول‌های متمایز یافته بالغ.

■ هر دو تومورهای اولیه ثانویه به آنژیوژنز (تشکیل عروق خونی جدید) برای رشد توده خود نیاز دارند.

■ سلول‌های کشت داده شده مشخصی که با DNAی سلول توموری ترانسفکت شده‌اند متحمل تغییر شکل می‌شوند (شکل ۶-۲۵ را ملاحظه کنید). بعضی از سلول‌های تغییر شکل یافته شده در بعضی از ویژگیها به سلول‌های توموری مشترک هستند.

■ مدل چند ضربه‌ای که مشخص می‌کند که جهش‌های متعددی برای وقوع سرطان لازم است با هوموزنی ژنتیکی سلول‌های یک تومور، مشاهده افزایش و نوع سرطان‌های انسانی با افزایش سن و اثرات مشارکتی ترانس ژن‌های انکوژنی و جهش‌های ژن‌های سرکوب کننده تومور در تشکیل تومور در موش مشخص شده است.

■ سرطان کولون با مراحل مورفولوژیکی مشخص که معمولاً همراه با جهش هایی در ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و پروتوانکوژن‌های می‌باشد رشد و توسعه می‌یابد (شکل ۹-۲۵ را ملاحظه کنید).

■ آنالیز میکروآرایه DNA می‌تواند تفاوتهای بیان ژن در بین انواع سلول‌های توموری که با روشهای سنتی قابل تشخیص نبوده‌اند را آشکار کند. برخی از سلول‌های توموری در برخی مراحل رشد به انواعی از سلول‌های طبیعی مرتبط بوده که بر اساس مشابهت‌های یافت شده در الگوهای بیان آنها می‌باشد.

■ در سلول‌های توموری، مجموعه‌ای از سلول‌ها می‌تواند با ویژگیهای بیان ژنی مجزا از هم تفکیک داده شوند. این تفاوتها ممکن است جداسازی سلول‌های بنیادی تومورهای خطرناک را از کل سلول‌ها مهیا سازد.

۲-۲۵ مبنای ژنتیکی سرطان

همانگونه که ذکر شد، جهش‌ها را در سه دسته ژنی دسته بندی می‌کنیم، پروتوانکوژن‌ها (مثل ras)، ژن‌های سرکوب کننده تومور (مثل APC) و ژن‌های کارتاکر که نقش مهمی در القاء سرطان ایفا می‌کنند. این ژن‌ها اکثراً پروتئین‌هایی راکد می‌کنند که در کنترل رشد و تکثیر سلول دخالت دارند (شکل ۱۱ - ۲۵). به طور کلی، تمامی تومورهای انسانی دچار جهش‌های غیر فعال کننده در ژن‌هایی هستند که محصولات آنها در حالت عادی در نقاط کنترلی مختلف چرخه سلولی عمل کرده و سبب توقف آن در زمانی می‌شوند که مرحله قبلی به صورت کنترل نشده رخ داده و یا DNA آسیب دیده باشد. به عنوان مثال، اکثر سرطان‌ها دارای جهش‌های غیر فعال کننده در ژن‌هایی که یک یا چند پروتئین راکد می‌کنند هستند که این پروتئین‌ها در حالت عادی چرخه سلولی را در مرحله G_1 متوقف می‌سازند و یا جهش‌های فعال کننده در ژن‌هایی که پروتئین‌های حاصل از آنها سلول را وادار به ورود به چرخه سلولی می‌کند. به علاوه، یک Ras که به طور مداوم فعال است یا سایر پروتئین‌های موجود در مسیر انتقال پیام که به صورت فعال هستند، در انواعی از تومورهای انسانی دیده شده‌اند که دارای منشاء متفاوتی هستند. بنابراین

بدخیمی و فرایندهای پیچیده کنترل کننده چرخه سلولی که در فصل ۲۰ شرح داده شدند، دو روی متفاوت یک سکه هستند. در طی سلسله حوادثی که منجر به رشد یک تومور می‌گردند، انکوژن‌ها با جهش‌های سرکوب کننده تومور در کنار هم قرار می‌گیرند تا یک طیف کامل از خصوصیات سلول توموری که شرح آن در بخش قبلی صورت گرفت، به دست آید (شکل ۹ - ۲۵).

در این بخش، به شرح انواع کلی جهش‌هایی که انکوژنیک هستند می‌پردازیم و خواهیم دید که چگونه ویروس‌های خاصی می‌توانند سبب بروز سرطان شوند. همچنین توضیح می‌دهیم که چرا برخی از جهش‌های ارثی، سبب افزایش ریسک ابتلا به سرطان می‌شوند و ارتباط میان سرطان و ژن‌های مهم در حال توسعه را به تفصیل خواهیم گفت.

جهش‌های اهداء عملکرد، پروتوانکوژن‌ها را به انکوژن‌ها تبدیل می‌کنند.

یادآوری می‌کنیم که انکوژن، ژنی است که پروتئین کد شونده توسط آن قادر به تغییر شکل سلول‌های موجود در محیط کشت اغلب در ترکیب با سایر تغییرات سلولی و یا در زمان ایجاد سرطان در یک حیوان می‌گردد. در میان اکثر انکوژن‌های شناخته شده، تعدادی از آنها از ژن‌های نرمال سلولی مشتق می‌شوند (مثل پروتوانکوژن‌ها) که نوع وحشی آن محصولاتی تولید می‌کند که سبب شروع تکثیر سلولی و یا ایجاد سایر ویژگی‌های مهم سرطان می‌شوند. به عنوان مثال، ژن ras که قبلاً شرح دادیم، پروتوانکوژنی است که یک پروتئین انتقال دهنده پیام داخل سلولی راکد می‌کند و ژن ras^D جهش یافته که از ras مشتق می‌شود یک انکوژن بوده و پروتئینی راکد می‌کند که سبب تولید یک پیام شروع کننده رشد کنترل نشده یا افزایش یافته می‌گردد. سایر پروتوانکوژن‌ها، مولکولهای پیام شروع کننده رشد و گیرنده‌های آنها، پروتئین‌های ضد آپوپتوز (بقاء دهنده سلول) و برخی از فاکتورهای رونویسی راکد می‌کنند. تغییر یا فعال‌سازی یک پروتوانکوژن به یک انکوژن، عموماً ناشی از یک **جهش اهداء عملکردی**[1] می‌باشد.

دست کم چهار مکانیسم سبب ایجاد انکوژن‌ها از پروتوانکوژن‌های مورد نظر می‌شوند:

۱. جهش نقطه‌ای[2] (مثل تغییر یک جفت باز) در یک پروتوانکوژن که سبب ایجاد یک محصول پروتئینی با فعالیت بالا یا با فعالیت همیشگی می‌شود.

۲. تبادل کروموزمی[3] سبب ادغام دو ژن و تولید یک ژن دورگه می‌شود که پروتئین **کایمریک**[4] راکد می‌کنند. این پروتئین از لحاظ فعالیت مشابه با پروتئین‌های والد نیست و فعالیت آن اغلب همیشگی است.

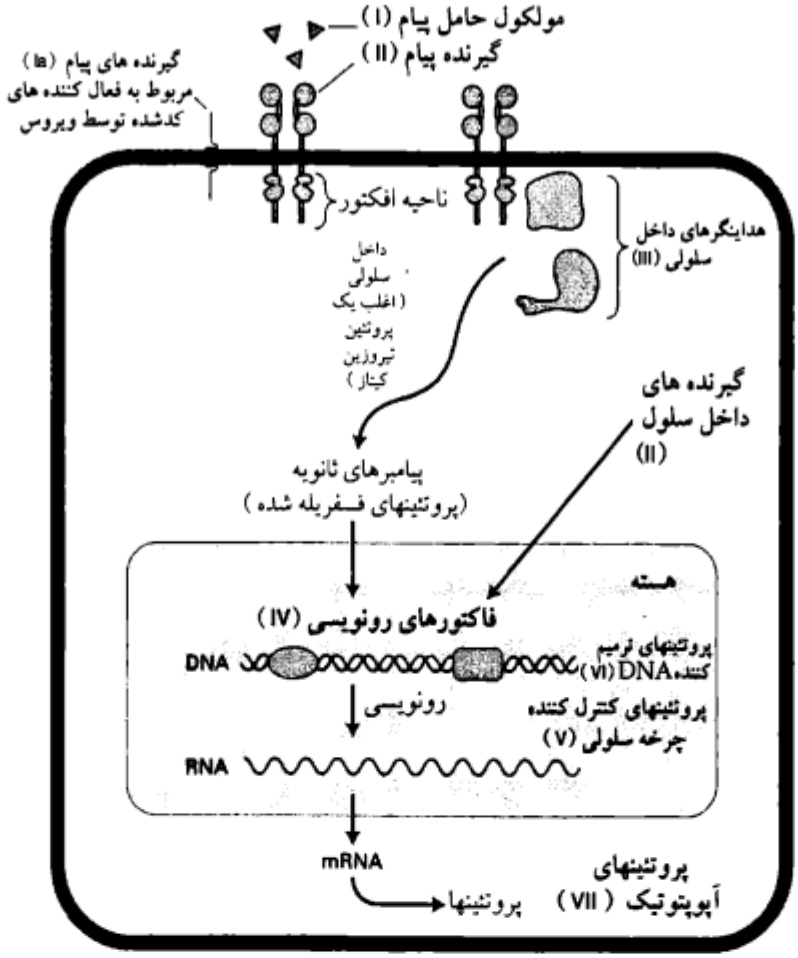
۳. تبادل کروموزمی که باعث می‌شود یک ژن تنظیم کننده رشد، تحت تاثیر یک پروموتر متفاوت قرار گرفته و بیان آن به صورت نامناسب صورت گیرد.

۴. تزاید[5] (مثل همانند سازی غیر عادی DNA) یک قطعه از DNA که حاوی یک پروتو انکوژن می‌باشد، به این ترتیب کپی‌های ژن مولد تومور افزایش یافته و منجر به افزایش تولید پروتئین کد شونده توسط آنها می‌گردد.

انکوژنی که توسط یکی از دو مکانیسم اول ایجاد شده است، انکوپروتئینی راکد می‌کند که با پروتئین‌های نرمالی که توسط پروتوانکوژن مربوطه کد شده است، تفاوت دارد. برعکس، دو مکانیسم دیگر انکوژن‌هایی را ایجاد می‌کنند که پروتئین‌های حاصل از آنها با پروتئین‌های نرمال مشابهند و اثر انکوژنیک آنها به واسطه تولید محصولشان در مقادیر بیش از حالت طبیعی و یا تولید آن در جایی از سلول که در حالت عادی در آنجا تولید نمی‌شود، بروز می‌کند. تزاید موضعی DNA برای تولید بیش از ۱۰۰ کپی در یک ناحیه از آن (معمولاً ناحیه‌ای که دارای هزاران کیلوباز است) یک تغییر ژنتیکی شایع است که در اکثر تومورها دیده می‌شود. در حالت عادی، چنین حوادثی توسط سلول جبران شده و یا اینکه چرخه سلولی در محل نقطه کنترلی خود متوقف می‌شود. بنابراین بروز چنین آسیبهایی در تومورها، اشاره به نقص ترمیم DNA (کارتاکر) در برخی از انواع آنها دارد. این بی نظمی‌ها ممکن است به دو صورت بروز کند: ممکن است قطعات DNA همانندسازی شده به صورت سربه دم در یک جایگاه واحد بر روی یک کروموزم آرایش یابند و یا ممکن است به صورت ساختارهای کوچک شبیه کروموزم کوتاه که بهم متصل نیستند دیده شود. این ساختارهای تشکیل شده منجر به ایجاد نواحی رنگ‌آمیزی شده مشابه بهم (HSR) می‌گردد که توسط میکروسکوپ نوری در محل تزاید دیده می‌شوند. مورد اخیر سبب ایجاد «نسخه‌های» اضافی کروموزمی می‌شود که از کروموزمهای نرمالی که در مقاطع کروموزمی رنگ‌آمیزی می‌شوند متفاوتند و به راحتی مجزا می‌گردند (شکل ۱۲ - ۲۵).

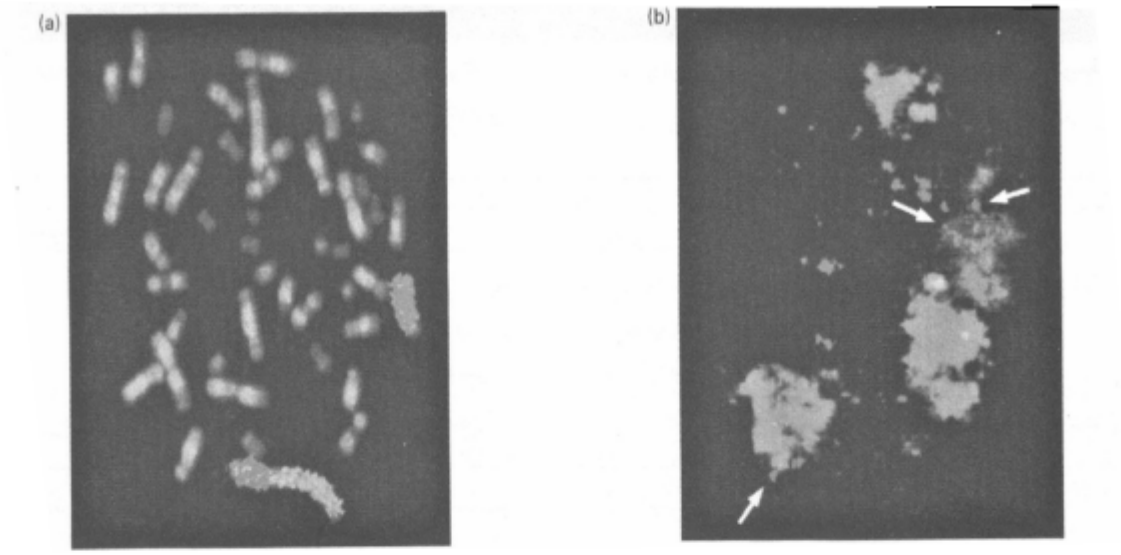
تزاید ژنی ممکن است در تعداد کمی از ژن‌ها از قبیل ژن N - myc و DDX1 که در مجاورت آن قرار داشته و در

1- Gain-of-function mutation
2- Point mutation
3- Chromososmal translocation
4- Chimeric
5- Amplification



▲ **شکل ۱۱-۲۵ هفت نوع از پروتئین‌هایی که در فرایند کنترل رشد سلولی و تکثیر آن مشارکت دارند.** سرطان می‌تواند در نتیجه بیان اشکال جهش یافته این پروتئین‌ها ایجاد شود. جهش‌ها، ساختار یا بیان پروتئین هایی را که در حالت عادی رشد سلول را شروع می‌کنند تغییر می‌دهند که این امر غالباً در اثر فعالیت بالای انکوژن‌های فعال ایجاد می‌گردد. اکثراً و نه تمامی مولکولهای پیام خارج سلولی (I)، گیرنده‌های پیام (II)، پروتئین‌های هدایتگر پیام (III) و فاکتورهای رونویسی (IV) در این دسته قرار می‌گیرند. پروتئین‌های کنترل کننده چرخه سلولی (V) که سبب مهار تکثیر سلولی می‌شود و پروتئین‌های ترمیم‌کننده DNA (VI) توسط ژن‌های سرکوبگر تومور، کد می‌شوند. جهش‌هایی که در این ژن‌ها اتفاق می‌افتد به طور برگشتی سبب افزایش این احتمال می‌شود که سلول‌های جهش یافته توموری شوند و یا اینکه جهش‌ها در سایر کلاسها نیز رخ دهد. پروتئین‌های آپوپتوتیک (VII) شامل سرکوبگرهای توموری که آپوپتوز را شروع می‌کنند به همراه انکوپروتئین‌هایی هستند که سبب بقاء سلول می‌شوند. پروتئین‌های کد شونده توسط ویروس که گیرنده‌های پیام (Ia) را فعال می‌کنند، نیز می‌توانند سرطان را القا کنند.

نوروبلاستوما تزاید می‌یابند یا در یک ناحیه از کروموزم که حاوی ژن‌های زیادی است، اتفاق می‌افتد. تشخیص اینکه چه ژن‌هایی تزاید یافته‌اند، مشکل است و این اولین مرحله در تشخیص ژن‌هایی است که سبب ایجاد تومور شده‌اند. میکروآرایه DNA یک ابزار قدرتمند برای پی بردن به نواحی تزاید یافته در کروموزمها هستند. پیش از آنکه به مبحث بیان ژن نگاهی بیندازیم، کاربرد میکروآرایه را که در این فصل و فصل ۱۵ شرح دادیم بیان نمودیم که در این آزمایش‌ها به بررسی و جستجوی توالی‌هایی از DNA که به طور غیر عادی میزانشان زیاد است، می‌پردازیم. DNAی ژنومی مربوط به سلول‌های سرطانی که به عنوان آرایه‌های پروب استفاده می‌شود، شامل قطعات DNAی ژنومی است و نقاط مربوط به هیبرید آن با DNAی تزاید یافته در سلول‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های کنترل پررنگ‌تر است. در میان ژن‌های تزایدیافته، بهترین گزینه برای اینکه بتوان آنرا به خوبی آشکارسازی نمود، اندازه گیری بیان ژن است. یک دودمان از سلول‌های کارسینوهای پستان که دارای چهار ناحیه کروموزمی تزاید یافته است را به عنوان مدلی برای بررسی ژن‌های تزاید یافته انتخاب کردند و سطوح بیان این ژن‌ها را نیز توسط زیر آرایه مطالعه کردند. از حدود پنجاه ژنی که به عنوان ژن‌های تزاید یابنده در



▲ **شکل تجربی ۱۲-۲۵ (شکل رنگی) تزایدهای DNA در کروموزمهای رنگ‌آمیزی شده به دو صورت در زیر میکروسکوپ نوری دیده می‌شود.** (a) نواحی رنگ‌آمیزی شده مشابه هم (HSRs) در یک کروموزم انسانی حاصل از سلول نروبلاستوما. تمام کروموزمها با رنگ آبی رنگ‌آمیزی شده‌اند، بنابراین همه آنها قابل رؤیت هستند. توالی‌های اختصاصی DNA که از قبل مشخص شده‌اند در دورگه سازی فلورسانت در محل (FISH) به کار گرفته می‌شوند که در آن کلون‌های DNA که با مواد فلورسانت نشاندار شده‌اند با DNA دناتوره شده در کروموزمها، دورگه می‌گردد. کروموزم جفت ۴ (قرمز) توسط دورگه شدن با یک کلون بزرگ DNA که حاوی انکوژن N - myc است، در in situ نشاندار شده است. پس از رنگ‌آمیزی توالیهای غنی از HSR، روی یکی از کروموزمهای جفت ۴ یک HSR (سبز) رؤیت شد. (b) بخشهای نورانی که در هسته یک سلول نوروبلاستومای انسانی دیده می‌شوند مربوط به کروموزمهایی هستند که کروموزمهای دو نسخه‌ای نام دارند. ساختارهای سبز و آبی رنگ، کروموزمهای نرمال هستند و نقطه‌های کوچک قرمز که به تعداد زیاد دیده می‌شوند، کروموزمهای دو نسخه‌ای می‌باشند. پیکانها کروموزمهای دو نسخه‌ای که در سطح یا در داخل کروموزمهای نرمال قرار دارند را نشان می‌دهند.

نظر گرفته شده بودند، تنها در پنج تای آنها میزان بیان، افزایش یافته بود. این پنج ژن، بهترین مواردی بودند که می‌توانستند بصورت انکوژن‌های جدید دربیایند، درحالیکه ژن‌های تزاید یابنده‌ای که بیان آنها افزایش نیافته است، با احتمال کمتری در رشد تومور مشارکت دارند.

همانگونه که آزمایش‌ها نشان دادند جهش‌های اهداء عملکرد که پروتوانکوژن‌ها را به انکوژن‌ها تبدیل می‌کنند از لحاظ ژنتیکی غالب هستند یعنی بروز جهش تنها در یکی از دو آلل آن، برای القاء سرطان کفایت می‌کند. جدول ۱ - ۲۵ کلاسهای متفاوت ژن‌های مرتبط با سرطان را با هم مقایسه کرده است.

ویروس‌های مولد سرطان، دارای انکوژن‌ها یا پروتوانکوژن‌های سلولی فعال هستند.

مطالعات اولیه‌ای که توسط **پیتون راس**[1] در ۱۹۱۱ شروع شد، منجر به کشف اولیه ویروس‌هایی شد که زمانی که به داخل یک حیوان میزبان مناسب تزریق می‌شوند می‌توانستند سبب ایجاد سرطان شوند. چندین سال بعد، زیست شناسان ملکولی نشان دادند که ویروس سارکومای راس (RSV)، **رتروویروسی**[2] است که RNAی ژنومی آن بصورت معکوس به یک DNA رونویسی می‌شود که این DNA به داخل ژنوم سلول میزبان راه می‌یابد (شکل ۴۹ - ۴). علاوه بر ژن‌های «نرمال» موجود در تمام رتروویروس‌ها، ویروس‌های تغییر دهنده انکوژنیک مثل RSV حاوی یک انکوژن هستند. در مورد RSV، ژن v-src، انکوژن مربوط به آن است. مطالعات بعدی روی اشکال جهش یافته RSV، نشان داد که تنها یک ژن v-src و نه سایر ژن‌های ویروسی، برای القاء سرطان مورد نیازند.

در اواخر دهه ۱۹۷۰، دانشمندان به طور حیرت انگیزی به کشف سلول‌های نرمال از جوجه‌ها و سایر گونه‌هایی پرداختند که در آنها یک ژن بسیار مرتبط با ژن RSV v-src وجود دارد. این ژن نرمال سلولی، پروتوانکوژنی است که اغلب توسط پسوند «c» (c-Src)، از ژن ویروسی متمایز می‌شود. RSV و سایر ویروس‌هایی که سبب تغییر شکل می‌گردند بنظر می‌رسد که توسط دخول یا انتقال یک

1- Peyton Rous 2- Retrovirus

جدول ۱-۲۵. کلاس‌های ژنی که در مراحل سرطان نقش ایفا می‌کنند

ژن‌ها	ژن‌های با فعالیت نرمال	مثال‌هایی از فراورده‌های ژنی	اثر جهش	خصوصیات ژنتیکی ژن جهش یافته	منشاء جهش‌ها توسط جهش نقطه‌ای
پروتو انکوژن‌ها	راه‌اندازی فرایندهای بقاء و یا تکثیر سلولی	پروتئین‌های ضد ـ آپوپتوز، اجزای مسیرهای پیام‌رسانی و هدایت پیام که سبب تکثیر می‌شوند، فاکتورهای رونویسی	جهش‌های اهداء عملکرد که سبب تکثیر یا بقاء سلول به صورت تنظیم نشده می‌گردند.	جهش‌ها از لحاظ ژنتیکی اغلب بارز هستند.	تبادل کروموزومی ایجاد می‌شوند.
ژن‌های سرکوبگر تومور	مهار فرآیندهای ابقاء یا تکثیر سلولی	پروتئین‌های شروع کننده آپوپتوز، مهارکننده‌های چرخه سلولی، پروتئین‌های کنترل کننده نقاط کنترلی که DNA کروموزومی آسیب دیده را تشخیص می‌دهد. اجزاء مسیر پیام‌رسانی که مانع تکثیر سلولی می‌شوند.	جهش‌های فقدان عملکرد سبب تکثیر و بقا تنظیم نشده سلول می‌گردد.	جهش‌ها از لحاظ ژنتیکی مغلوبند.	توسط حذف، جهش نقطه‌ای و متیلاسیون ایجاد می‌گردد.
ژن‌های کار تاکر	ترمیم یا جلوگیری از آسیب DNA	آنزیم‌های ترمیم کننده DNA	جهش‌های فقدان عملکرد که سبب تجمع این جهش‌ها می‌گردند.	جهش‌ها از لحاظ ژنتیکی مغلوبند.	توسط حذف، جهش نقطه‌ای و متیلاسیون ایجاد می‌گردد.

پروتوانکوژن سلول بداخل ژنومشان، ایجاد شده‌اند. بروز جهش بعدی در ژن، منتقل شده، سبب تغییر آن به یک انکوژن با فعالیت زیاد می‌گردد که می‌تواند حتی در حضور پروتوانکوژن نرمال c-Src، سبب القاء تغییرات سلولی گردید. چنین ویروس‌هایی، را **رتروویروس‌های منتقل‌کننده**[1] می‌نامند زیرا ژنوم آنها حاوی یک انکوژن مشتق شده از یک پروتوانکوژن سلولی منتقل شده می‌باشد.

به این دلیل که ژنوم RSV منتقل‌کننده، یک انکوژن v-src مهم را حمل می‌کند سبب القاء تومورها در طی چند روز می‌شود. برعکس، اکثر رتروویروس‌های انکوژنی، سرطان را تنها پس از یک دوره ماهانه یا سالانه، القا می‌کنند. ژنومهای مربوط به این رتروویروس‌های با فعالیت آهسته، که قدرت تغییر دهی ضعیفی دارند، از آن دسته از ویروس‌های منتقل‌کننده در یک جنبه مهم تفاوت دارند: آنها فاقد یک انکوژن هستند. تمام انواعی که بصورت آهسته عمل می‌کنند، یا «دوره کمون طولانی دارند»، رتروویروس‌هایی هستند که بنظر می‌رسد توسط دخول بدرون DNA سلول میزبان در حوالی یک پروتوانکوژن سلولی، سرطان را القاء کرده و بیان آن ژن را افزایش می‌دهند. توالیهای تکراری بلند در انتهای کروموزم (LTR) موجود در DNAی رتروویروسی کامل شده می‌تواند به صورت یک افزاینده یا یک پروموتر برای یک ژن سلولی که در مجاورت آن قرار دارد عمل کرده و سبب تحریک رونویسی آن شود. بعنوان مثال، در سلول‌هایی که توسط ویروس avian leukosis (ALV) توموری شده‌اند، DNA رتروویروسی در مجاورت ژن c-myc دخول کرده است. این سلول‌ها پروتئین c-Myc را به میزان زیادی تولید می‌کنند؛ همانطور که اخیراً ذکر کردیم افزایش تولید پروتئین c-Myc سبب تکثیر غیر عادی و سریع سلول‌ها می‌گردد. ویروس‌های با فعالیت آهسته به دو دلیل آهسته عمل می‌کنند: دخول آنها در مجاورت یک پروتوانکوژن سلولی (مثل c-myc) بصورت اتفاقی و نادر صورت می‌گیرد و جهش‌های اضافی قبل از واضح شدن کامل تومور، اتفاق می‌افتند.

در جمعیت‌های پرندگان و موشها، رتروویروس‌های با فعالیت آهسته شایعتر از رتروویروس‌های حاوی انکوژن‌ها از جمله ویروس ساکومای راس هستند. بنابراین، فعالیت دخول پروتوانکوژن، احتمالاً

1- Transducing retroviruses

مهمترین مکانیسمی است که توسط این رتروویروس‌ها صورت گرفته و منجر به سرطان می‌شود. اگرچه تنها رتروویروس شناخته شده‌ای که سبب ایجاد تومورهای انسانی می‌شود، ویروس لوکمیا/لنفومای سلول T انسانی (HTLV) است، که در مطالعات صورت گرفته روی رتروویروس‌ها به عنوان مدلی برای سرطان انسانی، هم در کشف انکوژن‌های سلولی و هم در شناخت ویروس‌هایی که بطور مصنوعی ساخته شده است بکار می‌رود که این عوامل در مراحل بعدی، سبب تسریع در شناخت ویروس HIV که مسبب AIDS است می‌گردد.

تعداد کمی از ویروس‌های DNAدار انکوژن هم هستند. برخلاف اکثر ویروس‌های DNAدار که سلول‌های حیوانی را عفونی می‌کنند (فصل ۴)، ویروس‌های انکوژن، DNAی خود را در داخل ژنوم سلول میزبان وارد می‌کنند. DNAی ویروسی حاوی یک یا چند انکوژن است که اغلب سبب تغییر شکل سلول‌های آلوده می‌شوند. بعنوان مثال، اکثر زگیلها و سایر تومورهای خوش خیم سلول‌های اپیتلیال توسط پاپیلوویروس‌های DNA دار انسانی (HPV) ایجاد می‌گردند. یک نمونه از نتایج عفونت با HPV که از لحاظ بالینی بسیار شدید و حاد است، سرطان سرویکس می‌باشد که سومین نوع سرطان رایج در زنان پس از سرطان ریه و پستان است. انکوپروتئین‌های HPV را در اواخر این بخش مورد بحث قرار خواهیم داد. پاپ اسمیر[1] که برای نمونه‌گیری از بافت سرویکس و تشخیص امکان وجود سرطان استفاده می‌شود، بنظر می‌رسد که سرعت مرگ و میر را حدود ۷۰ درصد کاهش داده است. علی رغم اینکه هزاران نفر هر ساله بر اثر سرطان سرویکس جان خود را از دست می‌دهند، ولی توانسته‌اند توسط انجام تست‌های غربالگری از تعدادی از این مرگ و میرها جلوگیری کنند. خوشبختانه، همهٔ عفونت‌های HPV به سرطان منجر نمی‌شوند. برخلاف انکوژن‌های رتروویروسی، که از ژن‌های سالم سلولی منشا می‌گیرند و به جز آنکه به ویروس امکان تکثیر آن به صورت تومور را می‌دهند هیچ عملکرد دیگری ندارند. انکوژن‌های شناخته شده DNAی ویروس‌ها، جزو قسمت‌های مکمل ژنوم ویروسی بوده و برای همانندسازی ویروس مورد نیازند. برطبق آنچه اخیراً ذکر گردید، انکوپروتئین‌هایی که حاصل بیان شدن DNAی ویروسی کامل شده در سلول‌های عفونی است، توسط روش‌های مختلفی سبب تحریک رشد و تکثیر سلول می‌شود.

جهش‌های فقدان عملکرد در ژن‌های سرکوبگر ـ تومور، سبب تبدیل آنها به انکوژن می‌شود.

ژن‌های سرکوبگر ـ تومور، اغلب پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که توسط یک یا چند مسیر، سبب مهار تکثیر سلول می‌گردد. بروز جهش‌های فقدان عملکرد[2]، در یک یا چند عدد از این «**موانع**»[3] سبب گسترش اکثر سرطان‌ها می‌شوند. دسته‌های پروتئینی مهمی که توسط ژن‌های سرکوبگر تومور کد می‌شوند شامل این پنج دسته است:

۱ـ پروتئین‌های داخل سلولی که سبب تنظیم یا مهار پیشروی یک مرحله خاص از چرخه سلولی می‌شوند (مثل p16 و Rb برای G_1)

۲ـ گیرنده‌ها یا هدایت کننده‌های پیام برای هورمون‌های ترشح شونده یا پیام‌های مربوط به تکامل، سبب مهار تکثیر سلولی می‌شوند (مثل TGFβ، گیرنده هجهوگ)

۳ـ پروتئین‌های کنترل کننده نقاط کنترلی که در زمان آسیب دیدن DNA یا غیرعادی بودن کروموزوم، چرخه سلولی را متوقف می‌کنند (مثل p53).

۴ـ پروتئین‌هایی که آپوپتوز را راه‌اندازی می‌کنند.

۵ـ آنزیم‌هایی که در فرایند ترمیم DNA شرکت کرده و توسط ژن‌های کارتاکر، کد می‌شوند.

از آنجایی که اغلب وجود یک کپی از ژن سرکوبگر تومور برای کنترل تکثیر سلولی کفایت می‌کند، برای شروع توسعه تومور، هر دو آلل یک ژن سرکوبگر تومور، لازم است که از بین برود و یا غیرفعال گردد. بنابراین اکثر جهش‌های فقدان عملکرد در ژن‌های سرکوبگر تومور از لحاظ ژنتیکی به صورت **مغلوب**[4] هستند (جدول ۱ـ۲۵). در این زمینه «مغلوب» به معنای اینست که حتی یک ژن، حدود نیمی از مقادیر طبیعی فراورده پروتئینی را تولید کند که مانع از تشکیل تومور خواهد شد. در برخی از ژن‌ها، نیمی از مقادیر فرآورده، کافی نبوده که در این موارد، کاهش فقط یکی از دو ژن می‌تواند منجر به سرطان شود. این نوع ژن‌ها ناکامی از لحاظ هاپلو[5] هستند (زمانیکه حتی یک کپی از ژن سبب بروز فنوتیپ نهایی شود، این نوع جهش را جهش غالب گویند). دو فرایند وجود دارد که توسط آنها ژن‌های سرطانی می‌توانند غالب گردند: (۱) فقدان یک کپی از یک ژن سرکوبگر تومور، سبب می‌شود که محصولات نتوانند فرایند رشد را به طور کافی کنترل کنند و (۲) فعال‌سازی یک ژن یا پروتئینی که حتی

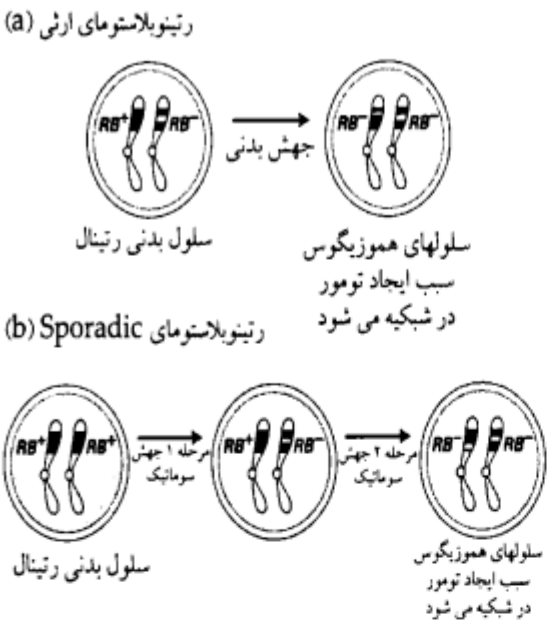
1- Popsmear
2- Loss-of-function mutation
3- Brakes
4- Recessive
5- Haplo-insufficient

در غیاب یک آلل نرمال مثل یک انکوژن غالب سبب رشد می‌گردد (همان طور که در بخش قبلی توضیح دادیم). در اکثر سرطان‌ها، ژن‌های سرکوبگر تومور دچار جهش‌های حذفی یا نقطه‌ای می‌شود که مانع تولید پروتئین می‌شود و یا منجر به تولید یک پروتئین غیرعملکردی می‌گردد. مکانیسم دیگر برای غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر تومور، متیلاسیون ریشه‌های سیتوزین در پروموتر یا سایر عناصر کنترلی است که سبب مهار رونویسی آنها خواهد شد. چنین متیلاسیون‌هایی اغلب در نواحیی از DNA که رونویسی نمی‌شوند به چشم می‌خورد (فصل ۷).

بروز جهش‌های توارثی در ژن‌های سرکوبگر ـ تومور، خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهند.

افرادی که دچار جهش‌های وراثتی در ژن‌های سرکوبگر توموری خود هستند دارای استعداد ارثی برای ابتلا به انواع خاصی از سرطان‌ها هستند. چنین افرادی در اغلب موارد یک جهش در یک آلل از ژن در سلول‌های لایه زایای خود به ارث برده‌اند. جهش سوماتیک آلل دوم، پیشروری تومور را تسهیل می‌کند. یک مورد کلاسیک در این ارتباط، رتینوبلاستوماست که به علت فقدان عملکرد RB می‌باشد. RB اولین ژن سرکوبگر ـ توموری بود که شناخته شد. همانطور که اخیراً ذکر گردید، پروتئین کد شونده توسط RB، به تنظیم چرخه سلولی کمک می‌کند.

رتینوبلاستومای ارثی در مقابل رتینوبلاستومای انفرادی کودکانی که مبتلا به رتینوبلاستومای ارثی هستند، یک کپی معیوب از ژن RB را به ارث می‌برند که گاهی اوقات به صورت یک حذف کوچک بر روی یکی از کپی‌های کروموزوم ۱۳ است. در این کودکان چندین تومور شبکیه در مراحل اولیه زندگی گسترش می‌یابد که عموماً هر دو چشم را در بر می‌گیرد. حذف یا جهش یک ژن RB سالم بر روی یک کروموزوم دیگر یک مرحله ضروری در تشکیل تومور محسوب می‌شود که سبب ایجاد سلولی می‌شود که پروتئین RB عملکردی تولید نمی‌کند (شکل ۱۳ـ۲۵). افرادی که دارای رتینوبلاستومای انفرادی هستند، برخلاف نوع قبلی، دو آلل RB سالم به ارث می‌برند که هر کدام تحت اثر یک جهش بدنی فقدان عملکرد در یک سلول شبکیه قرار می‌گیرند. به دلیل از بین رفتن دو کپی از ژن RB، که احتمال آن نسبت به از بین رفتن یک کپی به مراتب کمتر است، این فرم رتینوبلاستوما نادر است و اغلب تنها روی یک چشم اثر می‌گذارد. بنابراین، جهش RB در اکثر سرطان‌ها وجود دارد که در این حالت رتینوبلاستومای توارثی در حدود ۱۰۰ مورد سرطان در هر سال در آمریکا را باعث می‌شود و حدود ۱۰۰۰۰۰ مورد دیگر سرطان در هر سال مربوط به جهش‌های RB در زمان قبل از لقاح می‌باشد.



▲ **شکل ۱۳ـ۲۵ نقش بروز جهش‌های بدنی خودبخودی در رتینوبلاستوما.** این بیماری به واسطه وجود تومورهای رتینال که از سلول‌های حامل دو آلل جهش یافته RB^- به وجود می‌آیند، مشخص می‌گردد. (a) در رتینوبلاستومای ارثی (خانوادگی)، یک فرزند یک آلل سالم RB^+ را از یک والد و یک آلل RB^- جهش یافته را از والد دیگر به ارث می‌برد. یک جهش ساده در سلول رتینال بدنی هتروزیگوت که سبب غیرفعال شدن آلل سالم می‌شود منجر به تولید سلولی می‌شود که فاقد عملکرد ژن Rb است که دارای دو جهش می‌باشد. (b) در رتینوبلاستومای انفرادی، یک فرزند، دو آلل سالم RB^+ را به ارث می‌برد. دو جهش سوماتیک مجزا در یک سلول رتینال خاص یا در زاده‌های حاصل از آن سبب ایجاد یک سلول هموزیگوت RB^-/RB^+ می‌گردد.

اگر تومورهای شبکیه پیش از آن که به صورت بدخیم در آیند، حذف شوند، کودکانی که مبتلا به رتینوبلاستومای توارثی هستند می‌توانند اغلب تا مرحله بزرگسالی زنده مانده و دارای فرزند شوند. به این دلیل که سلول‌های زایای آنها، حاوی یک آلل RB نرمال و یک آلل جهش یافته است، در این افراد به طور مساوی، یک آلل جهش یافته به نیمی از کودکانشان و آلل سالم به نیمی دیگر می‌رسد. کودکانی که آلل سالم را به ارث می‌برند در صورتی که والد دیگرشان دارای دو آلل RB سالم باشد، سالم خواهند بود و به این ترتیب آنهایی که یک آلل جهش یافته را به ارث می‌برند، به طور مشابه با والد بیمار، احتمال ابتلا به تومورهای شبکیه در آنها بالاست حتی اگر یک آلل RB سالم از والد دیگرشان که سالم است، به ارث برده باشند. بنابراین استعداد توسعه رتینوبلاستوما به صورت یک صفت غالب به ارث

می‌رسد. وجود یک کپی جهش یافته برای پیش‌بینی توسعه سرطان در یک فرد، کافی است. به طور خلاصه، اکثر تومورهای انسانی (نه فقط تومورهای شبکیه) حاوی آلل‌های RB جهش یافته یا جهش‌هایی هستند که روی سایر اجزاء همان مسیر اثر می‌گذارند و اکثر این‌ها به علت بروز جهش‌های سوماتیک ایجاد می‌شوند.

اشکال توارثی سرطان کولون و پستان. به طور مشابه می‌توان امکان ابتلا به سایر سرطان‌ها را که مرتبط با جهش‌های توارثی در سایر ژن‌های سرکوبگر تومور هستند از لحاظ ارثی پیش‌بینی کرد. به عنوان مثال، افرادی که یک جهش در یکی از آلل‌های APC سلول‌های رده زایا را به ارث می‌برند، احتمال ابتلا به هزاران پولیپ روده‌ای پیش‌سرطانی را می‌یابند (شکل ۹ـ۲۵). از آنجایی که احتمال زیادی وجود دارد که یک یا چند نوع از این پولیپ‌ها به صورت بدخیم پیش‌روی کنند، بنابراین در چنین افرادی ریسک توسعه سرطان کولون قبل از سن ۵۰ سالگی به میزان زیادی افزایش می‌یابد. تست غربالگری افراد به منظور وجود پولیپ توسط کولونوسکوپی یک روش مناسب برای افراد ۵۰ ساله یا پیرتر است، حتی هنگامی که هیچ جهش APC شناخته شده‌ای در آنها وجود نداشته باشد. به طور مشابه، در زنانی که یک آلل جهش یافته BRCA-1، یک ژن سرکوبگر تومور دیگر، را به ارث می‌برند، ۶۰ درصد احتمال ابتلا به سرطان پستان در سن ۵۰ سالگی وجود دارد در حالی که در آنهایی که دو آلل سالم BRCA-1 را به ارث برده‌اند، ۲ درصد احتمال وجود دارد. جهش‌های هتروزیگوت BRCA-1 همچنین سبب افزایش ریسک ابتلا به سرطان رحم از ۲ درصد به ۴۰ـ۱۵ درصد می‌شود. پروتئین BRCA-1 در فرایند ترمیم آن دسته از آسیب‌های DNA که توسط تشعشعات ایجاد می‌شوند نقش دارد که احتمالاً ممکن است عملکردهای دیگری هم داشته باشد. در زنانی که به طور ارثی دچار سرطان پستان هستند فقدان آلل دوم BRCA-1 به همراه سایر جهش‌ها، برای بدخیم شدن یک سلول سالم مجرای غدد پستانی لازم است. با این حال، BRCA-1 در فرم انفرادی اغلب دچار جهش نمی‌شود و سرطان پستان به صورت غیرارثی می‌باشد.

کاهش هتروزیگوسیتی به طور واضح، ما استعداد ابتلا به سرطان را توسط کسب یک آلل آسیب دیده مربوط به یک ژن سرکوبگر تومور از یکی از والدینمان، به ارث می‌بریم، بنابراین ما در مورد آن جهش به صورت هتروزیگوت هستیم. این جهش‌ها در حالت عادی، معمولاً سرطان ایجاد نمی‌کنند، تا زمانی که آلل نرمال باقی مانده مانع ایجاد اختلال در رشد می‌شود، که در این صورت سرطان مغلوب است. فقدان یا غیرفعال شدن آلل نرمال در مراحل بعدی در یک سلول بدنی، منجر به کاهش هتروزیگوسیتی[1] (LOH) می‌شود که اغلب منجر به گسترش یک سرطان می‌شود. یک مکانیسم معمول برای LOH شامل عدم تفکیک کروموزوم‌ها در طی میتوز است که این کروموزوم‌ها حامل ژن سرکوبگر تومور هستند (شکل ۱۴a ـ۲۵). این فرایند همچنین تحت عنوان ناگسستگی[2] خوانده می‌شود که به علت نقص در نقطه کنترل کننده آرایش دوک میتوزی رخ می‌دهد که در حالت عادی مانع از ایجاد دوک میتوزی غیرعادی در مرحله متافاز سلولی در حین انجام میتوز می‌شود (شکل ۳۲ـ۲۰، ❷ را ملاحظه کنید). مکانیسم ممکن دیگر برای LOH، نوترکیبی میتوزی میان یک کروماتید حامل آلل تیپ وحشی و یک کروماتید همولوگ آن که حاصل آلل جهش یافته است می‌باشد. همان گونه که شکل ۱۴b ـ۲۵ نشان می‌دهد، تفکیک بعدی کروموزوم‌ها می‌تواند منجر به ایجاد سلول دختری شود که برای آلل سرکوبگر تومور جهش یافته به صورت هموزیگوت می‌باشد. مکانیسم سوم شامل حذف یا جهش کپی سالم ژن سرکوبگر تومور است. وجود یک حذف می‌تواند ناحیه وسیعی از کروموزوم را در بر گیرد که در این مورد نیاز نیست که یک حذف به طور دقیق فقط ژن سرکوبگر تومور را شامل شود.

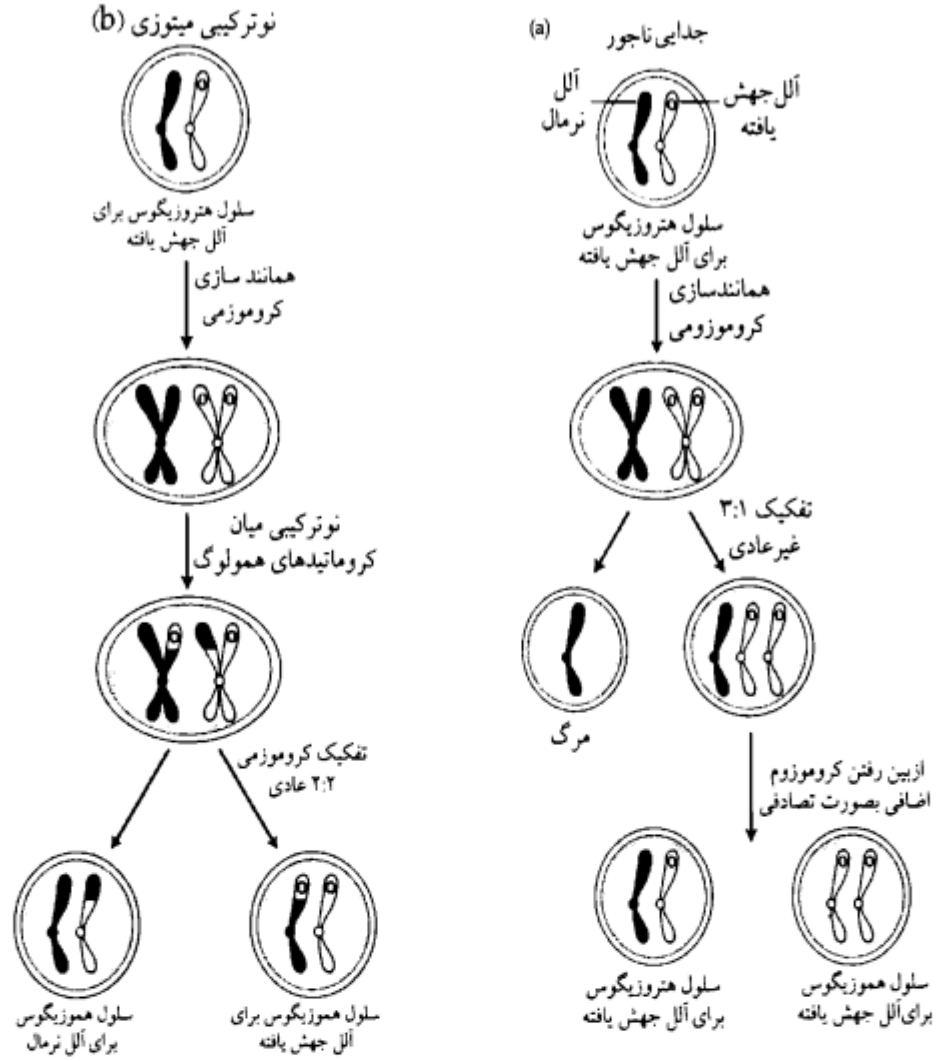
میزان تخمین‌ها با هم متفاوت است، اما سرطان‌های ارثی، از جمله سرطان‌هایی که در نتیجه آن بخشی که مربوط به گونه ارثی یک ژن حاصل می‌شوند، به نظر می‌رسد که حدود ۱۰ درصد سرطان‌های ارثی را شامل گردد. کارهای صورت گرفته بر روی ژن‌های انسانی، نشان دهنده احتمال افزایش این درصد است. یادآوری این نکته مهم است که جهش ارثی در لایه زایا، به تنهایی برای گسترش سرطان کافی نیست. در تمام موارد، نه تنها باید یک آلل سرکوبگر تومور سالم به طور ارثی از بین برود یا غیرفعال شود، بلکه جهش‌هایی که سایر ژن‌ها را نیز درگیر می‌کنند هم برای توسعه سرطان ضرورند. بنابراین فردی که دارای یک جهش در ژن سرکوبگر تومور مغلوب است می‌تواند به طور استثنایی نسبت به عوامل جهش‌زای محیطی از قبیل تشعشعات حساس گردد.

انحراف در مسیرهای پیام‌رسانی کنترل‌کننده تکامل، با اکثر سرطان‌ها ارتباط دارند.

- در طی دوره تکاملی عادی، پیام‌های ترشح شده از قبیل Wnt، TGFβ و هجهوگ (Hh) به طور متناوب سبب هدایت سلول‌ها به

1- Loss of hetrozygousity

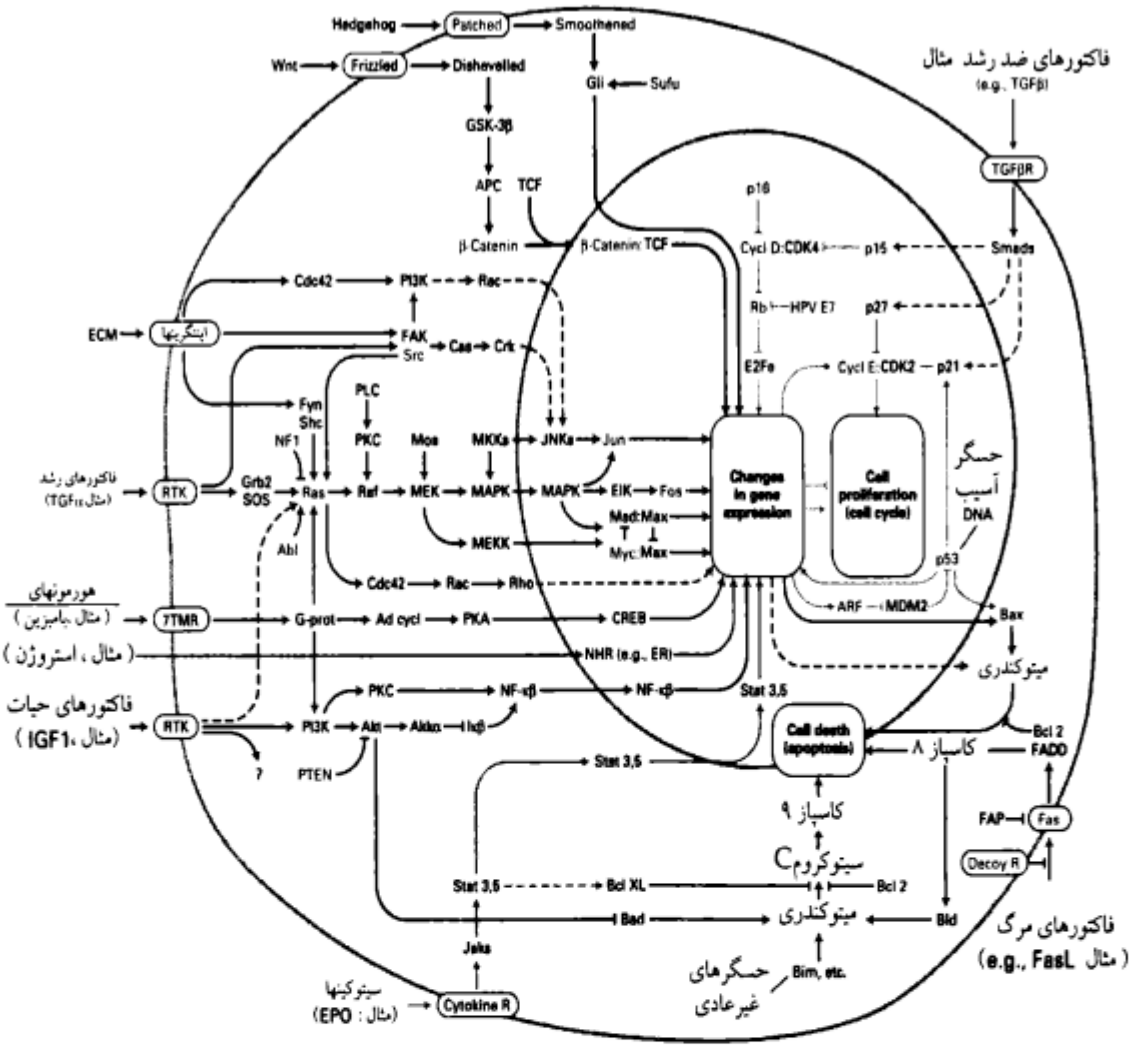
2- Nondisjunction



▲ **شکل ۱۴ـ۲۵ دو مکانیسم برای کاهش هتروزیگوسیتی (LOH) در ژن‌های سرکوبگر ـ تومور.** سلولی که حاوی یک آلل سالم و یک آلل جهش یافته مربوط به یک ژن سرکوبگر تومور است اغلب دارای فنوتیپ سالم است. (a) اگر تشکیل دوک میتوزی دچار نقص گردد، کروموزوم‌های جفت شده حامل آلل‌های سالم و جهش یافته ممکن است با نسبت انحرافی ۳:۱ از هم تفکیک شوند. سلول دختری که سه کروموزوم از یک نوع را به دست می‌آورد اغلب یکی از آنها را از دست داده و تبدیل به یک سلول عادی با شماره کروموزومی 2n می‌گردد. گاهی اوقات، سلول حاصله حاوی یک آلل سالم و یک آلل جهش یافته است اما برخی مواقع هم برای آلل جهش یافته به صورت هموزیگوت خواهد شد. نکته اینجاست که چنین آنیوپلوئیدی (با محتوای کروموزومی غیرعادی) عموماً به دلیل تولید سلول‌های تمایز نیافته که در ساختارهای بسیار پیچیده یک موجود زنده توسعه می‌یابد، سبب آسیب یا مرگ می‌شود. اما اغلب می‌تواند در کلون‌های سلولی با ایجاد سازگاری، اعمال آن سلول‌ها را محدود کند. (b) نوترکیبی میتوزی میان یک کروموزوم از تیپ وحشی و یک آلل جهش یافته که در نتیجه تفکیک کروموزوم‌ها رخ می‌دهد، سلولی را ایجاد می‌کند که حاوی دو نسخه از یک آلل جهش یافته است.

سمت مقاصد تکاملی اختصاصی‌شان می‌شود که ممکن است سبب میتوز سریع در آنها گردد. چنین پیام‌هایی باید تنظیم شود تا رشد در محدوده زمانی و مکانی مناسب و درستی صورت گیرد. از میان مکانیسم‌های موجود برای کنترل نمودن اثرات تکاملی قدرتمند پیام‌ها، می‌توان به آنتاگونیست‌های درون سلولی قابل القا، مسدودکننده‌های گیرنده‌ها و پیام‌های رقابت کننده با هم را نام برد (فصل ۲۲). جهش‌هایی که مانع چنین مکانیسم‌های متوقف کننده فعالیت سلولی می‌شوند احتمالاً انکوژنیک شده و سبب رشد نامناسب یا سرطانی می‌شوند.

پیام رسانی Hh، که به طور مکرر در طی تکامل برای کنترل مقاصد تعیین شده سلول به کار گرفته می‌شود، یک مثال خوب از یک مسیر پیام‌رسانی است که در القاء سرطان نقش دارد. در پوست و مخچه، یکی از پروتئین‌های Hh انسانی (Sonic hedgehog)، تقسیم سلول را توسط اتصال به یک پروتئین غشائی بنام



▲ **شکل ۱۵ـ۲۵ (شکل رنگی) چرخه‌های سلولی که توسط جهش‌های مولد سرطان، تحت تأثیر قرار می‌گیرند.** کنترل رشد و چرخه سلول، در قلب سرطان که تحت تأثیر اکثر انواع پیام‌ها قرار می‌گیرد و برآیند کل این پیامهاست که، سلول توسط آن تصمیم می‌گیرد که آیا تقسیم شود یا به تقسیم خود ادامه دهد. مسیرهای تکاملی به سلول‌ها هویتی می‌بخشند که این هویت به آنها این امکان را می‌دهد که یا تکثیر شوند و یا نشوند. ژن‌هایی که در طی سرطان‌ها جهش می‌یابند با قرمز نشان داده شده‌اند. مسیرهایی که در ایجاد سرطان نقش کمتری دارند با خطوط منقطع نشان داده شده‌اند.

Patched-1 (Ptc1) و غیرفعال‌سازی آن، تحریک می‌کند (شکل ۱۶ـ۳۴ را ملاحظه کنید). جهش‌های فقدان عملکرد در ptcl به سلول اجازه تکثیر در غیاب یک پیام Hh را می‌دهد و بنابراین ptcl یک ژن سرکوبگر توموری است. افرادی که یک کپی واحد از ptcl را به ارث می‌برند دارای استعداد ابتلا به سرطان پوست و مغز هستند که می‌تواند زمانی اتفاق افتد که آلل دیگرش هم آسیب ببیند. سایر افراد نیز می‌توانند به این بیماری‌ها دچار شوند، اگر جهش فقدان عملکرد در هر دو کپی از این ژن صورت گیرد. بنابراین هم حالت خانوادگی (ارثی) و هم انفرادی (غیرارثی) نیز همانطور که در مورد رتینوبلاستوما دیدیم، برای این بیماری هم وجود دارد. جهش‌هایی که در سایر ژن‌های موجود در مسیر پیام‌رسانی Hh صورت می‌گیرد نیز با سرطان ارتباط دارند.

تعدادی از جهش‌های اینچنینی، انکوژن‌ها را طوری تغییر می‌دهند که سبب روشن شدن ژن‌های هدف Hh به طور نامناسبی می‌شوند. بقیه موارد شامل جهش‌های مغلوبی هستند که بر تنظیم کننده‌های منفی شبیه ptcl اثر می‌کنند. همان طور که در مورد سایر ژن‌های سرکوبگر تومور دیده می‌شود، فقدان کامل عملکرد ptcl، منجر به مرگ در مراحل اولیه جنینی می‌شود به این دلیل که این ژن برای تکامل مورد نیاز است که این امر تنها در مورد سلول‌های توموری که به صورت هموزیگوت ptcl/ptcl هستند دیده می‌شود.

اکثر مسیرهای پیام‌رسانی که در سایر فصول شرح داده شدند، نقش اساسی در کنترل تکامل جنینی و تکثیر سلول در بافت‌های بالغ

ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر، جهش‌هایی که بر اجزاء موجود در اکثر این مسیرهای پیام‌رسانی اثر می‌گذارد به نوعی به سرطان ارتباط داده شده‌اند (شکل ۱۵ـ۲۵). در واقع، زمانی که یک ژن در مسیر تکاملی به یک نوع سرطان انسانی مرتبط می‌شود، فهم این مسیر از مدل‌های موجودات زنده مثل کرمها و موشها حاصل می‌شود که باعث تمرکز تحقیقات بر روی ژن‌های لازم دیگر در سایر انواع سرطان‌ها می‌گردد.

به عنوان مثال، APC اولین ژن حیاتی که در مسیر ایجاد سرطان کولون جهش می‌یابد، هم اکنون به عنوان بخشی از مسیر پیام‌رسانی Wnt شناخته شده است (فصل ۱۶) که منجر به کشف مشارکت جهش‌های βـ کاتنین در سرطان کولون شده. بروز جهش در ژن‌های تکاملی مهارکننده تومور، تشکیل تومور را در بافت‌هایی که در حالت عادی سبب توقف رشد سلول می‌شوند شروع می‌کند. بنابراین جهش‌های صورت گرفته بر روی ژن سرکوبگر تومور در بافت‌هایی که در آنها نقش اولیه تنظیم کننده‌های تکاملی، کنترل مقاصد سلولی (انواعی از سلول‌ها که تکامل می‌یابند) و نه تقسیم سلولی است سبب ایجاد سرطان نمی‌شود. بروز جهش‌ها در پروتوانکوژن‌های تکاملی می‌تواند تشکیل تومور را در بافت‌هایی که یک ژن در حالت عادی تکثیر سلولی را شروع می‌کند یا در سایر بافت‌هایی که در آنجا ژن به صورت غیرعادی فعال می‌شود، شروع می‌کند.

نکات کلیدی بخش ۲-۲۵

اساس ژنتیکی سرطان

- جهش‌های غالب عملکردی در پروتوانکوژن‌ها و جهش‌های با فقدان عملکرد در ژن‌های سرکوب کننده تومور، سرطانزا هستند.
- پروتئین‌های کدشده توسط پروتوانکوژن‌ها پروتئین‌های پیام‌رسان محرک رشد و گیرنده‌های آنها، پروتئین‌های انتقال پیام فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های آپوتپوزی هستند (شکل ۱۱-۲۵ را ملاحظه کنید).
- فعال شدن جهش در یکی از دو آلل پروتوانکوژن آن‌ها را به انکوژن تبدیل می‌کند. این امر می‌تواند توسط جهش تکثیر ژنی، جابجایی ژنی و بیان بالا صورت گیرد.
- اولین ژن سرکوب کننده تومور شناخته شده یعنی RB در رتینوبلاستوما و سایر انواع تومورها دچار جهش شده است ؛ برخی از اجزای مسیر RB در بسیاری یا همه تومورها دچار تغییر می‌شود.
- به ارث بردن یک جهش انفرادی در آلل RB احتمال ایجاد انواع سرطان را مثل سایر ژن‌های سرکوب‌کنندهٔ تومور (مثل APC و BRCA-1) بالا می‌برد.
- در تولید هتروزیگوت‌های انفرادی برای یک ژن سرکوب کننده تومور، یک سلول سوماتیک می‌تواند توسط نوترکیبی میتوزی، جدایی بدکروموزوم‌ها، جهش خاموش ژن یا حذف دچار کاهش هتروزیگوتی (LOH) شوند (شکل ۱۴-۲۵ را ملاحظه کنید).
- جهش در ژن‌های کارتاکر از لحاظ ژنتیکی مغلوب است و حتی وجود یک نسخه عملکردی برای جلوگیری از صدمات جدی به DNA معمولاً کافی است.
- بسیاری از ژن‌های تنظیم‌کننده رشد و نمو طبیعی پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در مسیرهای پیام‌رسانی متنوعی عمل می‌کنند (شکل ۱۵-۲۵ را ملاحظه کنید). نقش طبیعی آنها در تنظیم زمان و مکان وقوع رشد انعکاسی از ویژگیهای تومورهایی است که آنها به هنگام جهش پیداکردن ژن‌ها بوجود می‌آیند.

۲۵ـ۳ بروز جهش‌های انکوژنیک در پروتئین‌های شروع کننده رشد

ژن‌های کد کننده دسته‌های پروتئین‌های تنظیم کننده سلول، در شکل ۱۱ـ۲۵ نشان داده شده است که تحت عنوان پروتوانکوژن‌ها یا ژن‌های سرکوبگر تومور شناخته می‌شوند. در این بخش ما با جزئیات بیشتری به شرح این می‌پردازیم که چگونه جهش‌هایی که سبب فعالیت پایدار و تنظیم نشده پروتئین‌های خاص و یا تولید مقادیر بیشتری از این پروتئین‌ها می‌شوند، تکثیر و تغییر شکل سلول‌ها را راه‌اندازی کرده و سبب ایجاد سرطان می‌گردند. در هر مورد، خواهیم دید که چگونه یک سلول کمیاب که تحت تأثیر یک نوع بسیار اختصاصی از یک جهش قرار می‌گیرد، به گونه‌ای تغییر می‌کند که تکثیر آن به صورت کنترل نشده در می‌آید.

گیرنده‌های انکوژنیک می‌توانند در غیاب فاکتورهای رشد اضافی، تکثیر سلولی را راه‌اندازی کنند.

افزایش فعالیت یک پروتئین پیام‌رسان شروع‌کننده رشد در اثر بروز تغییراتی در پروتئین، به نظر می‌رسد یک مکانیسم بسیار محتمل برای سرطان است، اما در واقع بروز این امر خیلی نادر است.

تنها یکی از این انکوژن‌ها که به صورت طبیعی اتفاق می‌افتد، sis است که تاکنون کشف شده است. انکوژن sis، یک شکل تغییریافته از فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) را کد می‌کند که می‌تواند به طور غیرعادی تکثیر سلول‌هایی که در حالت عادی گیرنده PDGF را بیان می‌کنند تحریک کند. یک مورد شایع‌تر اینست که سلول‌ها شروع به تولید یک فاکتور رشد تغییر نیافته می‌کنند که روی سلول‌های مولد خود اثر می‌کند. این نوع تحریک، **تحریک اتوکرین** نام دارد.

برعکس، انکوژن‌های کدکننده گیرنده‌های سطح سلولی که پیام‌های شروع کننده رشد را هدایت می‌کنند، با هفت نوع سرطان ارتباط دارند. گیرنده‌های مربوط به اکثر چنین فاکتورهای رشدی دارای فعالیت تیروزین کینازی ذاتی در دُمین‌های سیتوزولی خود هستند که این فعالیت تا زمانی که تحریک نشده است به صورت ساکن باقی می‌ماند. اتصال لیگاند به دُمین‌های خارجی این **گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTKs)** منجر به دیمریزاسیون و فعال شدن عملکرد آنها می‌شود و باعث راه‌اندازی یک مسیر انتقال پیام داخل سلولی می‌شود که سرانجام منجر به تکثیر سلول می‌شود.

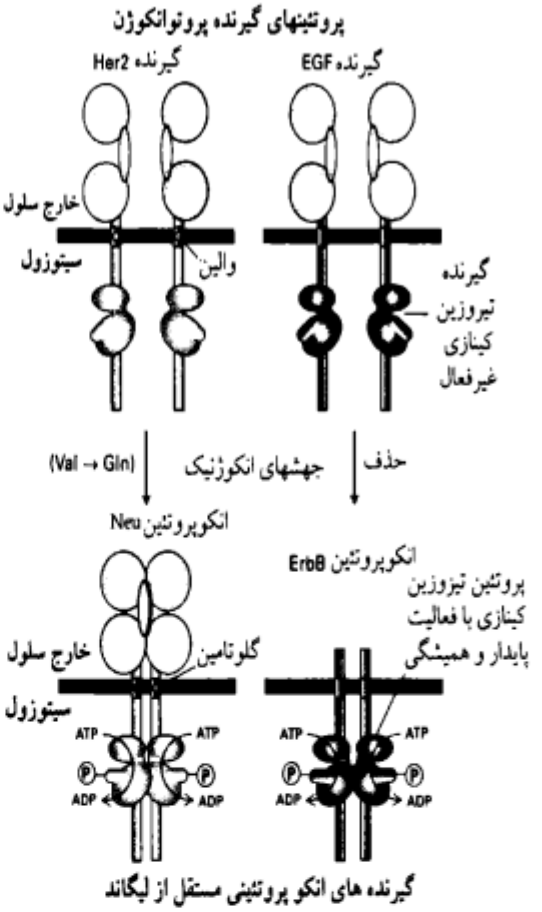
در برخی موارد، یک جهش نقطه‌ای، RTK نرمال را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که یکبار دیمریزه شده و به طور ثابت و همیشگی حتی در غیاب لیگاند هم فعال می‌ماند. به عنوان مثال، یک جهش نقطه‌ای واحد، گیرنده EGF_2 نرمال انسانی (Her_2) را به گونه‌ای تغییر می‌دهد که تبدیل به انکوپروتئین Neu («neu» برای نقش اولیه شناخته شده آن در نوروبلاستوما) می‌شود که شروع کننده سرطان‌های ویژه‌ای در موش است (شکل ۱۶ـ۲۵، چپ). به طور مشابه، تومورهای انسانی که نئوپلازی تیپ ۲ اندوکرین چندگانه نام دارد تولید یک گیرنده مربوط به فاکتور نروتروپیک مشتق شده از سلول‌های گلیایی (GDNF) می‌کند که وقتی دیمر می‌شوند به طور همیشگی فعال می‌مانند و در اثر یک جهش نقطه‌ای در دُمین خارج سلولی این پروتئین ایجاد می‌شود. گیرنده GDNF یک پروتئین تیروزین کیناز است که وقتی به فرم دارای فعالیت همیشگی در بیاید، سبب فسفریله شدن افراطی پروتئین‌های هدف در پائین دست خود می‌شود. در سایر موارد، حذف مقدار زیادی از دُمین اتصال به لیگاند خارج سلولی، سبب تولید یک گیرنده انکوژنیک که به طور همیشگی فعال است می‌شود. به عنوان مثال، حذف دُمین خارج سلولی گیرنده EGF نرمال (شکل ۲۵، راست) آن را تبدیل به انکوپروتئین دیمری ErbB می‌کند (انکوپروتئینی از ویروس اریتروبلاستوز، که یک گونه ویروسی ژن تغییر یافته آن اولین بار شناسایی شد).

جهش‌هایی که منجر به تولید بیش از حد یک RTK نرمال می‌شوند همچنین می‌توانند انکوژنیک باشند. به عنوان مثال، در اکثر سرطان‌های پستان انسان، گیرنده Her2 نرمال به میزان زیادی تولید می‌شود، در نتیجه سلول‌ها حتی در حضور مقادیر بسیار کم EGF و هورمون‌های مرتبط و غلظت‌های بسیار پائین‌تر از آنچه که برای تحریک تکثیر سلول‌های سالم لازم است، نیز تحریک شده و تکثیر می‌یابند (فصل ۱۶ را ملاحظه کنید).

مکانیسم دیگر برای ایجاد یک گیرنده انکوژن توسط بررسی انکوژن trk انسانی روشن شده است که از یک کارسینومای کولون استخراج گردید. این انکوژن، یک پروتئین کایمریک را کد می‌کند که در نتیجه یک تبادل کروموزومی و جایگزین شدن توالی‌های کدکننده اکثر دُمین‌های خارج سلولی گیرنده trk نرمال با توالی‌های کدکننده اسیدهای آمینه N- ترمینال قطعه تروپومیوزین غیرماهیچه‌ای ایجاد گردیده است (شکل ۱۷ـ۲۵). قطعه ترجمه شده تروپومیوزین می‌تواند دیمریزاسیون گیرنده trk کایمریک را به واسطه تشکیل یک ساختار مارپیچ مارپیچی شده وساطت کند و در نتیجه منجر به فعال شدن دُمین‌های کینازی آن در غیاب لیگاند شود. پروتئین Trk طبیعی یک گیرنده سطح سلولی تیروزین کینازی است که به یک فاکتور رشد عصبی متصل می‌شود (فصل ۲۱). برعکس، انکوپروتئین TrK که به طور پایدار فعالیت می‌کند، تا زمانی که توالی نشانه N- ترمینال آن که سبب قرارگیری آن در غشا شده است حذف نشده، این پروتئین در داخل سیتوزل باقی می‌ماند.

فعال کننده‌های ویروسی گیرندگان فاکتور رشد به عنوان انکوپروتئین عمل می‌کنند

ویروس‌هایی که سبب سرطان می‌شوند، احتمال می‌رود که سبب افزایش تولید ویروس از سلول‌های سرطانی آلوده شده می‌شوند. به عنوان مثال، یک رتروویروس که ویروس تشکیل دهنده فوکوس طحال (SFFV) نام دارد سبب القاء اریترولوکمیا (یک تومور مربوط به پیش‌سازهای اریتروئیدی) در موش‌های بالغ می‌شود که این عمل را توسط ایجاد یک پیام توسعه یافتگی نرمال انجام می‌دهند. تکثیر، بقا و تمایز پیش‌سازهای اریتروئیدی به سلول‌های قرمز بالغ به طور کامل نیازمند اریتروپوئیتین (Epo) و گیرنده مخصوص به Epo است (شکل ۶ـ۱۶). یک گلیکوپروتئین پوشاننده SFFV جهش یافته که gp55 نام دارد، مسئول ایجاد اثرات انکوژنیک ویروس است. اگر چه gp55 نمی‌تواند همانند یک پروتئین پوششی رتروویروس عادی در فرایندهای جوانه‌زنی و ایجاد عفونت



▲ **شکل ۱۶ـ۲۵ اثرات جهش‌های انکوژنیک در پروتوانکوژن هایی که گیرنده‌های سطح سلولی را کد می‌کنند.** چپ: یک جهش که سبب تغییر یافتن یک اسید آمینه منفرد (والین به گلوتامین) در ناحیه گذرنده از غشای گیرنده Her2 می‌شود، باعث دیمریزاسیون گیرنده، حتی در غیاب لیگاند نرمال وابسته به EGF می‌شود و انکوپروتئین Neu را به صورت کینازی با فعالیت همیشگی تبدیل می‌کند. راست: یک حذف که در اثر از بین رفتن دُمین خارج سلولی اتصال به لیگاند در گیرنده EGF می‌شود، به دلایل ناشناخته فعالیت کینازی از انکوپروتئین ErbB را برای همیشه فعال می‌کند.

ویروسی عمل کند، اما برای قابلیت اتصال و فعال کردن گیرنده‌های Epo در سلول‌های مشابه، مورد نیاز است (شکل ۱۸ـ۲۵). به واسطه تحریک نامناسب و پیوسته تکثیر پیش‌سازهای اریتروئیدی، gp55 تشکیل تعداد زیادی از اریتروسیت‌ها را تحریک می‌کند. کلون‌های بدخیم پیش‌سازهای اریتروئیدی، چند هفته پس از عفونت با SFFV و ایجاد جهش‌های بیشتر در این سلول‌هایی که به طور غیرعادی تکثیر می‌یابند، بروز می‌کند.

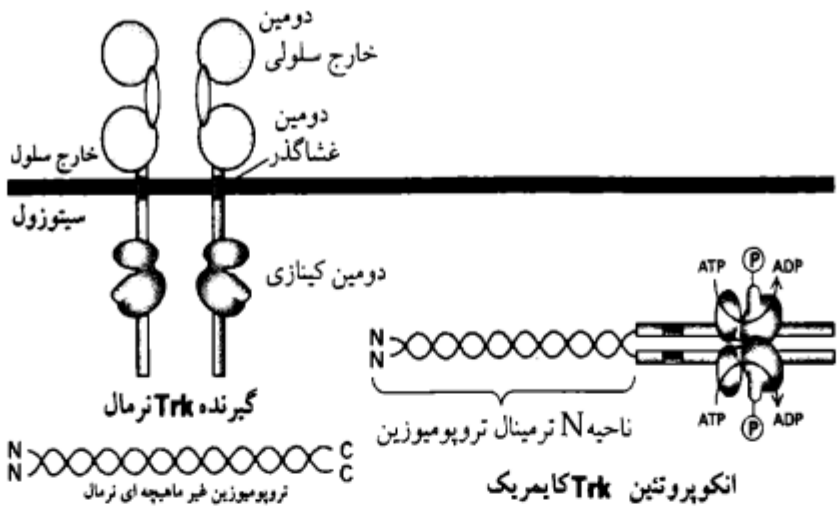
مثال دیگر از این پدیده، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) است که DNAی ویروس به طور جنسی انتقال می‌یابد و سبب ایجاد سرطان سرویکس و زگیل‌های تناسلی می‌گردد. یک پروتئین ویروس پاپیلوماکه با E5 نشان داده می‌شود و حاوی تنها ۴۴ اسیدآمینه است، در عرض غشای پلاسمایی پل می‌زند و تشکیل یک دیمر یا تریمر می‌دهد. هر پلی‌پپتید E5 می‌تواند یک کمپلکس پایدار با یک گیرنده اندوژن برای PDGF را تشکیل بدهد و بنابراین دو یا تعداد بیشتری از گیرنده‌های PDGF را با هم مجتمع می‌کند که در عرض غشای پلاسمایی پل زده‌اند. این کمپلکس، دیمریزاسیون گیرنده به واسطه هورمون را تقلید کرده و موجب تقویت فعال‌سازی گیرنده و سرانجام تغییر شکل سلول می‌شود. همانگونه که قبلاً دیدیم، ژنوم HPV همچنین چندین پروتئین دیگر را کد می‌کند که سبب مهار ژن‌های سرکوبگر تومور شده و نهایتاً در تغییر شکل سلول شرکت دارند. اخیراً یک واکسن علیه پروتئین L1 کپسید HPV شناخته شده است که سبب حفاظت انسان در مقابل سرطان سرویکس، دست کم در برخی از انواع ویروس‌ها می‌شود.

اکثر انکوژن‌ها پروتئین‌های هدایت‌کننده پیام را که به طور همیشگی فعال‌اند کد می‌کنند.

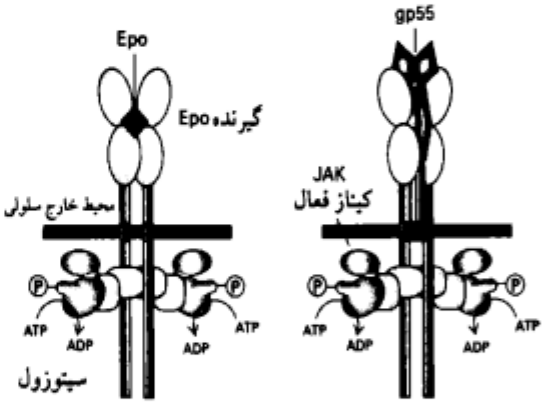
تعداد زیادی از انکوژن‌ها از پروتوانکوژن‌هایی مشتق می‌شوند که سبب کدشدن پروتئین‌ها می‌گردند که در هدایت پیام‌ها از یک گیرنده فعال شده به هدف سلولی، کمک می‌کنند. ما به شرح چندین مثال از چنین انکوژن‌هایی می‌پردازیم که هر کدام در تعداد زیادی از انواع سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند.

ترکیبات موجود در مسیر Ras. از میان انکوژن‌های موجود در این دسته که به خوبی مطالعه شده‌اند، ژن ras را می‌توان نام برد که اولین انکوژن غیرویروسی شناخته شده است. تنها یکی از چندین تغییر در پروتئین Ras می‌تواند منجر به فعالیت کنترل نشده و بارز آن گردد. مخصوصاً اگر یک جهش نقطه‌ای که سبب جایگزینی هر اسید آمینه با گلایسین در موقعیت ۱۲ توالی Ras می‌شود، سبب تبدیل پروتئین نرمال به یک انکوپروتئین با فعالیت همیشگی می‌شود. این نمونه از جهش، سبب کاهش فعالیت GTPآزی پروتئین شده و بنابراین Ras را در وضعیت فعال که به صورت وضعیت متصل به GTP است نگه می‌دارد. انکوپروتئین Ras که به صورت همیشگی فعال شده است در اکثر انواع سرطان‌های انسانی دیده می‌شود که این سرطان‌ها شامل سرطان مثانه، کولون، غدد پستان، پوست، و کارسینوماهای ریه، نوروبلاستوماها و لوکمیاها است.

همانطور که در فصل ۱۶ دیدیم، Ras یک ترکیب کلیدی در



▲ **شکل ۱۷ـ۲۵ دُمین‌های ساختاری تروپومیوزین نرمال، گیرنده Trk نرمال، و انکوپروتئین Trk کایمریک.** تبادل کروموزومی در نتیجه جابجایی اکثر دُمین‌های خارج سلولی پروتئین Trk انسانی نرمال، یک گیرنده تیروزین کینازی، با دومین N- ترمینال تروپومیوزین غیرماهیچه‌ای ایجاد می‌کند. به علت دیمریزاسیون قطعه تروپومیوزین، فعالیت کینازی انکوپروتئین Trk به طور پایدار و همیشگی در می‌آید. برخلاف Trk نرمال که در غشا پلاسمایی قرار دارد، انکوپروتئین Trk در سیتوزل یافت می‌شود.



▲ **شکل ۱۸ـ۲۵ فعال‌سازی گیرنده اریتروپوئیتین (Epo) توسط لیگاند طبیعی Epo یا یک انکوپروتئین ویروسی.** اتصال Epo سبب دیمریزه شدن گیرنده و القاء تشکیل اریتروسیت‌ها از سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی می‌شود. در حالت عادی سرطان‌ها زمانی ایجاد می‌شوند که سلول‌های پیش‌ساز توسط ویروس تشکیل دهنده فوکوس طحال آلوده شوند که این ویروس باعث ایجاد گیرنده Epo و gp55 ویروسی شده که هر دو در غشای پلاسمایی واقع می‌شوند. دُمین‌های غشاگذر gp55 دیمری، به طور اختصاصی به گیرنده Epo متصل شده و سبب دیمریزاسیون و فعال‌سازی گیرنده در غیاب Epo می‌شوند.

هدایت پیام‌ها از گیرنده‌های فعال شده به یک آبشار پروتئین کینازی است. در قسمت اول این مسیر، یک پیام از RTK فعال شده به وسیله دو پروتئین آداپتور به Ras انتقال می‌یابد و سبب تبدیل آن به فرم فعال متصل به GTP می‌شود (شکل ۲۰ـ۱۶). در قسمت دوم مسیر، Ras فعال شده، پیام را توسط دو پروتئین کیناز حد واسطه به MAP کیناز انتقال می‌دهد. سپس MAP کیناز فعال شده تعدادی از فاکتورهای پروتئینی را فسفریله کرده که این فاکتورها سنتز پروتئین‌های مهم دخیل در چرخه سلولی و پروتئین‌های اختصاصی برای تمایز یافتگی سلول را القاء می‌کنند (شکل ۲۵ـ۱۶). جهش‌های فعال کننده Ras، بخش اول این مسیر را میانبر زده و در اثر اتصال لیگاند به گیرنده غیرضروری سبب فعال شدن بی‌حد و مرز آن می‌شوند. انکوژن‌های کدکننده سایر ترکیبات تغییر یافته مسیر RTK/Ras/MAP کینازها نیز شناخته شده‌اند.

فعال شدن مداوم Ras نیز می‌تواند در اثر یک جهش فقدان عملکرد به صورت مغلوب در یک پروتئین تسریع کننده فعالیت GTP آزی (GAP) ایجاد گردد. عملکرد GAP نرمال، سرعت بخشیدن به هیدرولیز GDP و تبدیل Ras متصل به GTP فعال به Ras متصل به GAP غیرفعال است (شکل ۳۲ـ۳). فقدان GAP منجر به تقویت پروتئین‌های هدایت کننده پیام در پائین دست فعالیت Ras می‌شود. به عنوان مثال، نوروفیبروماتوز (یک تومور خوش‌خیم در سلول‌های غلافی احاطه کننده اعصاب) به علت فقدان هر دو آلل NF1 ایجاد می‌شود که یک پروتئین تیپ GAP، Ras را کد می‌کند. اشخاص مبتلا به نوروفیبروماتوز، یک آلل NF1 جهش یافته واحد را به ارث می‌برند. وقوع جهش سوماتیک بعدی در آلل دیگر منجر به تشکیل نوروفیبروماتوز می‌شود. بنابراین NF1،

همانند RB، یک ژن سرکوبگر تومور است که به صورت یک صفت اتوزومال غالب به ارث می‌رسد.

پروتئین Src کیناز. چندین انکوژن، پروتئین کینازهای سیتوزلی را کد می‌کنند که در حالت عادی پیام‌ها را در مسیرهای مختلف پیام‌رسانی داخل سلولی، هدایت می‌کنند. در حقیقت اولین انکوژنی که کشف شد، v-src از رتروویروس سارکومای راس بود که یک پروتئین تیروزین کیناز با فعالیت همیشگی را کد می‌کنند. دست کم هشت پروتوانکوژن در پستانداران، یک خانواده از پروتئین کینازهای غیرگیرنده‌ای مرتبط با پروتئین v-Src را کد می‌کنند. به غیر از این دُمین کاتالیتیک، این کینازها حاوی دُمین‌های برهمکنش پروتئین ـ پروتئین SH2 و SH3 هستند. فعالیت کینازی Src سلولی و پروتئین‌های مرتبط، در حالت عادی توسط فسفریلاسیون ریشه تیروزین در موقعیت ۵۲۷ غیرفعال می‌شود که این تیروزین، ریشه ششم از انتهای C- ترمینال است (شکل ۲۵ـ۱۹a,b). هیدرولیز فسفوتیروزین ۵۲۷ توسط یک آنزیم فسفاتاز ویژه، در حالت عادی سبب فعال شدن c-src می‌شود. تیروزین ۵۲۷ اغلب در انکوپروتئین‌های Src که دارای فعالیت کینازی مداوم هستند دچار تغییر شده و یا حذف می‌شود. بنابراین آنها برای فعال شدن نیازی به فسفاتاز ندارند (شکل ۲۵ـ۱۹b).

پروتئین کیناز Abl. یک انکوژن دیگر که یک پروتئین کیناز غیرگیرنده‌ای سیتوزلی را کد می‌کند، توسط یک تبادل کروموزومی که سبب اتصال یک قسمت از ژن c-abl می‌شود ایجاد می‌گردد که این ژن یک پروتئین کیناز را به همراه بخشی از ژن bcr که عملکرد آن هنوز ناشناخته است کد می‌کند (شکل ۲۵ـ۲۰a). یک ادغام بعدی سبب ایجاد یک پروتئین هیبرید می‌شود که این قسمت اضافی دارای ویژگی‌های خطرناکی است. پروتئین c-Ab1 نرمال، سبب شروع شاخه‌سازی فیلامان‌های اکتین و گسترش فرایندهای سلولی می‌گردد که احتمالاً عملکرد اولیه آن کنترل اسکلت سلولی و شکل سلول است. انکوپروتئین‌های کایمریک که توسط انکوژن bcr-abl کد می‌شوند، یک تترامر را تشکیل می‌دهند که سبب فعالیت کینازی Abl به صورت تنظیم نشده و مداوم می‌شود (شکل ۲۵ـ۲۰b). (این امر مشابه دیمریزاسیون و فعال‌سازی انکوپروتئین Trk کایمریک است که در شکل ۲۵ـ۱۷ نشان داده شده است). Brc-Abl می‌تواند سبب فسفریلاسیون و فعال‌سازی اکثر پروتئین‌های موجود در مسیر هدایت پیام در داخل سلول گردد و دست کم تعدادی از این پروتئین‌ها جزو سوبستراهای نرمال Abl نیستند. به عنوان مثال Bcr-Abl می‌تواند سبب فعال‌سازی JAK2 کیناز و فاکتور رونویسی STAT5 شود که در حالت عادی توسط اتصال فاکتورهای رشد (مثل اریتروپوئیتین) به گیرنده‌های سطح سلول فعال می‌گردند (شکل ۱۲ـ۱۶). همچنین Bcr-Abl می‌تواند یک جایگاه لنگراندازی برای پروتئین‌های انتقال دهنده پیام را ایجاد کند که این عمل را توسط قطعه Bcr انجام می‌دهد و به این ترتیب به طور بالقوه سبب تحریک مسیر هدایت پیام می‌شود.

تبادل کروموزومی که باعث تشکیل Bcr-Abl می‌شود، سبب بروز مشخصات مربوط به کروموزم فیلادلفیا می‌شود که در ۱۹۶۰ کشف شد (شکل ۲۵ـ۲۰a). اگر چنین تبادلی در یک سلول هماتوپوئیتیک موجود در مغز استخوان رخ دهد، فعالیت انکوژن Bcr-Abl کایمریک سبب شروع فاز اولیه لوکمیای میلوژنز مزمن انسانی (CML) می‌شود که مشخصه بارز آن افزایش تعداد سلول‌های سفید خونی است. بروز جهش ثانویه که سبب فقدان عملکرد در یک سلول حامل Bcr-Abl (مثل RB یا P53) می‌شود منجر به لوکمیای حاد می‌شود که اغلب سبب مرگ بیماران می‌گردد. تبادل کروموزومی CML تنها اولین بخش از یک سری مجزا و طویل است که اصطلاحاً «امضا» نام دارد و تبادل کروموزومی را به اشکال ویژه لوکمیا مرتبط می‌کند (شکل ۲۵ـ۲۱). اکثر اتصالات ژنی شامل ژن‌های کدکننده تنظیم کنندگان رونویسی است، خصوصاً تنظیم کنندگان رونویسی مربوط به ژن‌های Hox (فصل ۲۲). هر کدام از این موارد موجود، به عنوان فرصتی برای مطالعه و درک بیماری‌ها در مراحل اولیه تشخیص و درمان‌های جدید است. در مورد CML، مرحله دوم درمان تاکنون به طور موفقی پیش رفته است.

پس از انجام تحقیقات و بررسی‌های پرزحمت، یک مهارکننده کیناز Abl که **ایماتینیب**[1] (گلیویک)[2] نام دارد، به عنوان یک درمان ممکن برای CML در اوایل دهه ۱۹۹۰، معرفی شد. ایماتینیب، که به طور مستقیم به جایگاه فعال کیناز Abl اتصال یافته و فعالیت کینازی آن را مهار می‌کند، به عنوان یک عامل بسیار کشنده برای سلول‌های CML عمل می‌کند در حالی که بر سلول‌های سالم اثری ندارد (شکل ۲۵ـ۲۰c). پس از انجام بررسی‌های بالینی، مشخص شد که ایماتینیب، علی‌رغم داشتن برخی اثرات جانبی، یک درمان بسیار مؤثر برای CML است و در سال ۲۰۰۱ توسط FDA تصویب گردید و به عنوان اولین داروی سرطانی که به یک پروتئین هدایت کننده پیام منحصر به سلول‌های توموری هدف‌گیری می‌کند، شناخته شد. ایماتینیب چندین پروتئین

1- Imatinib 2- Gleevec

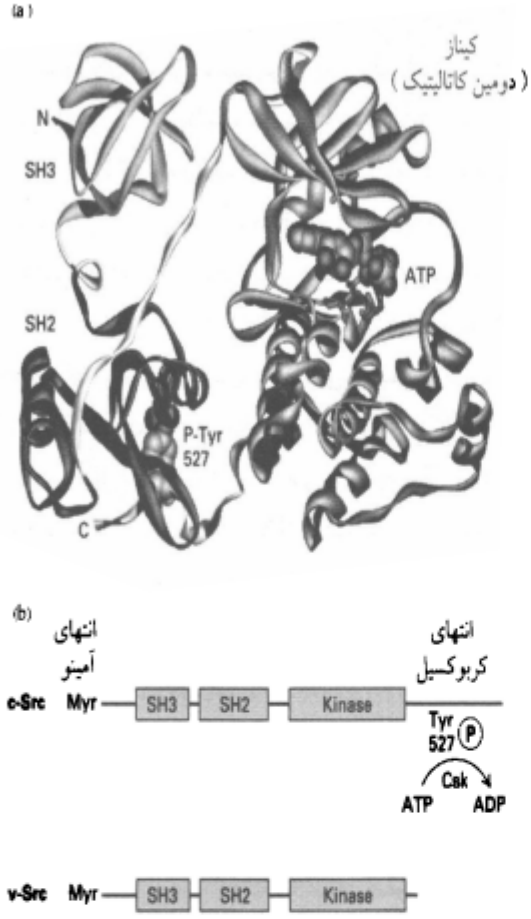
کیناز دیگر را هم مهار می‌کند که این کینازها در سرطان‌های مختلف شناسایی شده‌اند و به عنوان یک درمان موفق برای این بیماری‌ها شامل اشکال مختلف تومورهای دستگاه گوارش نیز به کار رفت. حدود ۹۶ تیروزین کیناز در ژنوم انسانی کد می‌شود، بنابراین داروهای مرتبط با ایماتینیب اغلب در کنترل فعالیت‌های تمام این پروتئین‌ها، سودمند خواهد بود. یک بحث در حال پیشرفت اینست که سلول‌های توموری می‌توانند نسبت به ایماتینیب و سایر داروهای اینچنینی مقاوم شده و نیازمند ساخت داروهای متفاوت از آنها هستیم.

تولید نامناسب فاکتورهای رونویسی هسته‌ای می‌تواند تغییر شکل سلول‌ها را تحریک کند.

جهش‌های انکوژنیکی که سبب ایجاد انکوژن‌ها یا بروز آسیب به ژن‌های سرکوبگر تومورزا می‌شوند در نهایت باعث ایجاد تغییراتی در بیان ژن خواهند شد. از لحاظ آزمایشگاهی این امر می‌تواند توسط مقایسه مقادیر متفاوت mRNAهای تولید شده در سلول‌های نرمال در مقابل سلول‌های توموری، اندازه‌گیری گردد. همانطور که در ابتدا ذکر کردیم، می‌توان هم اکنون چنین تفاوت‌هایی را در بیان هزاران ژن به وسیله میکروآرایهٔ DNA اندازه‌گیری نمود (شکل ۱۰ـ۲۵).

از آنجائی که اکثر اثرات مستقیم روی بیان ژن، به وسیله فاکتورهای رونویسی انجام می‌شود، این تعجب‌آور نیست که بگوئیم اکثر انکوژن‌ها، فاکتورهای رونویسی راکد می‌کنند. دو مثال از این امر، jun و fos هستند که در ابتدا در رتروویروس‌های تغییر دهنده شناسایی شدند و بعداً در برخی از سرطان‌های انسانی مشاهده شد که اینها به میزان زیادی بیان می‌گردند. پروتوانکوژن‌های c-jun و c-fos، پروتئین‌هایی راکد می‌کنند که گاهی اوقات سبب تشکیل یک فاکتور رونویسی هترودیمری شده Abl می‌شود که به یک توالی یافت شده در پروموتورها و افزاینده‌های اکثر ژن‌ها متصل می‌گردد (شکل ۲۹ـ۷ و فصل ۱۶ را ملاحظه کنید). هم jun و هم fos می‌توانند به طور مستقل از فاکتورهای رونویسی هم عمل کنند. این دو می‌توانند به صورت انکوپروتئین‌هایی عمل کنند که سبب فعال‌سازی ژن‌های کلیدی در رونویسی شده که این ژن‌ها پروتئین‌های شروع کننده رشد را کد می‌کنند و یا توسط مهار رونویسی ژن‌های سرکوب کننده رشد عمل می‌کنند.

اکثر پروتئین‌های پروتوانکوژن هسته‌ای زمانی تولید می‌شوند که سلول‌های سالم برای رشد تحریک می‌شوند که در آن هنگام نقش مستقیم آنها در کنترل رشد هویدا می‌گردد. به عنوان مثال



▲ **شکل ۱۹ـ۲۵ ساختمان تیروزین کینازهای Src و فعال‌سازی آنها توسط یک جهش انکوژنی.** (a) ساختمان سه بعدی Hck، یکی از چندین کیناز Src در پستانداران. اتصال فسفوتیروزین ۵۲۷ (P-Tyr527) به دُمین SH2 سبب القاء تغییرات کنفورماسیونی در SH3 و دُمین‌های کیناز شده و با تغییر شکل جایگاه فعال کیناز، آن را از لحاظ کاتالیتیک غیرفعال می‌کند. فعالیت کینازی پروتئین‌های Src سلولی در حالت عادی توسط برداشت فسفات از روی تیروزین ۵۲۷ فعال می‌شود. (b) ساختمان دُمین c-Src و v-Src. فسفریلاسیون تیروزین ۵۲۷ توسط Csk، تیروزین کیناز سلولی دیگر، سبب غیرفعال شدن فعالیت کینازی Src می‌شود. انکوپروتئین تغییریافته v-Src که توسط ویروس سارکومای راس کد می‌شود، سبب حذف ۱۸ اسید آمینه موجود در C- ترمینال که تیروزین ۵۲۷ را نیز شامل می‌شود می‌گردد و سبب فعال شدن پایدار و همیشگی آن می‌شود.

استفاده از PDGF بر سلول‌های 3T3 ثابت، سبب القاء افزایشی در حدود ۵۰ بار در تولید c-Fos و c-Myc می‌شود که محصولات عادی انکوپروتئین‌های fos و myc هستند.

در ابتدا یک افزایش گذرا در میزان Fos، به چشم می‌خورد و سپس یک افزایش درازمدت در مقدار c-Myc ایجاد می‌شود (شکل ۲۲ـ۲۵). مقادیر هر دو پروتئین پس از چند ساعت کاهش می‌یابد که این عمل توسط یک مکانیسم تنظیمی که ممکن است در سلول‌های نرمال صورت گیرد به پیشگیری از سرطان کمک می‌کند. همان گونه که در فصل ۲۰ شرح داده شد، c-Fos و c-Myc رونویسی ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی را تحریک می‌کنند که پیشروی فاز G_1 چرخه سلول و گذر از G_1 به S را راه‌اندازی می‌کنند. در تومورها، اشکال انکوژنیک این فاکتورها یا سایر فاکتورهای رونویسی در مقادیر بسیار بالا و تنظیم نشده به طور مکرر بیان می‌شوند.

در سلول‌های سالم، mRNAهای مربوط به c-Fos و c-Myc و پروتئین‌هایی که توسط این mRNAها کد می‌شوند، ماهیتی ناپایدار دارند که این امر منجر به تجزیه سریع آنها پس از تحریک ژنشان می‌شود. برخی از تغییراتی که موجب تبدیل c-Fos از یک ژن سالم به یک انکوژن می‌شود در نتیجه حذف برخی از توالی‌های ژنی است که سبب می‌شود mRNAی مربوط به Fos و پروتئین آن عمر کوتاه‌تری داشته باشند. تبدیل پروتوانکوژن c-myc به یک انکوژن می‌تواند به وسیله مکانیسم‌های متفاوتی به وقوع بپیوندد. در سلول‌های تومور انسانی که تحت عنوان **لنفومای بورکیت**[1] شناخته می‌شوند، ژن c-myc به جایگاهی در نزدیکی ژن مربوط به زنجیره سنگین آنتی بادی منتقل می‌شود که در حالت عادی، در سلول‌های سفید خونی مولد آنتی‌بادی، به صورت فعالانه رونویسی می‌شود (شکل ۲۳ـ۲۵). انتقال c-myc یک انحراف نادر در پدید بازآرایی DNA نرمال است که در طی بلوغ سلول‌های مولد آنتی‌بادی رخ می‌دهد. ژن انتقال یافته myc، هم اکنون توسط افزاینده‌های ژن آنتی بادی تنظیم می‌شود که این ژن‌ها به صورت پیوسته بیان شده و سبب سرطانی شدن سلول می‌گردند. تزاید موضعی یک قطعه از DNA حاوی ژن myc که در چندین تومور انسانی رخ می‌دهد، نیز می‌تواند سبب تولید زیاد و نامناسب پروتئین، myc سالم، از طریقی دیگر شود.

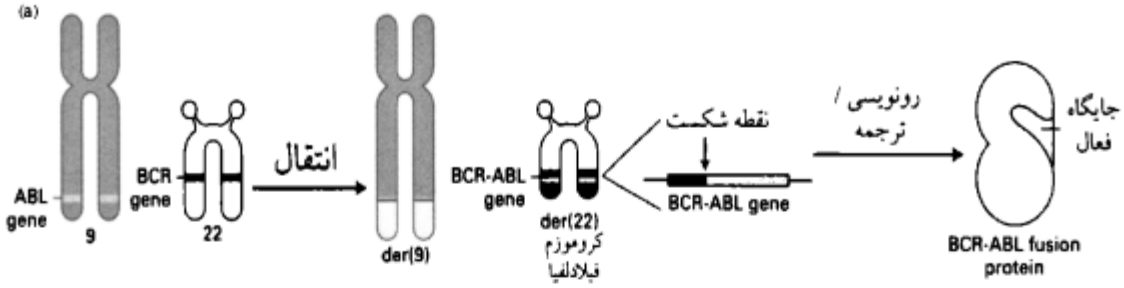
ژن c-myc یک پروتئین زیپ هلیکس ـ لوپ ـ هلیکس بازی را کد می‌کند که به عنوان بخشی از یک دسته از پروتئین‌های برهمکنش کننده‌ای عمل می‌کنند که می‌توانند به صورت دستجات متفاوت دیمریزه شده و به DNA اتصال یابند و به صورت متعاون رونویسی ژن‌های هدف را تنظیم کنند. سایر اعضا این دسته پروتئینی شامل Mad، Max و Mnt است. Max می‌تواند با Myc، Mad و Mnt به صورت هترودیمر در آید. دیمرهای Myc-Max ژن‌هایی را تنظیم می‌کنند که سبب تنظیم تکثیر سلولی همانند سیکلین‌ها می‌شوند. پروتئین‌های Mad، پروتئین‌های Myc را مهار کرده و منجر به بهره‌بردن از پروتئین‌های Mad یا داروهای تحریک‌کنندهٔ پروتئین‌های Mad در جهتی می‌شوند که فعالیت زیاد Myc که سبب ایجاد تومور می‌شود را مهار می‌کند. کمپلکس های پروتئین Myc توسط بازیابی کمپلکس‌های تغییردهنده کروماتین که حاوی استیل ترانسفرازهای هیستونی (که اغلب رونویسی را تحریک می‌کنند، فصل ۶) که به سمت ژن‌های Myc هدف‌گیری می‌کند می‌تواند بر رونویسی اثر بگذارد. همه این پروتئین‌ها با هم یک شبکه تنظیمی را تشکیل می‌دهند که به منظور کنترل تکثیر سلولی از اتصالات پروتئین ـ پروتئین، ایجاد تغییر در اتصال به DNA و تنظیم رونویسی بهره می‌برند. بیولوژی سلولی مولکولی به چگونگی درمان سرطان کمک می‌کند.

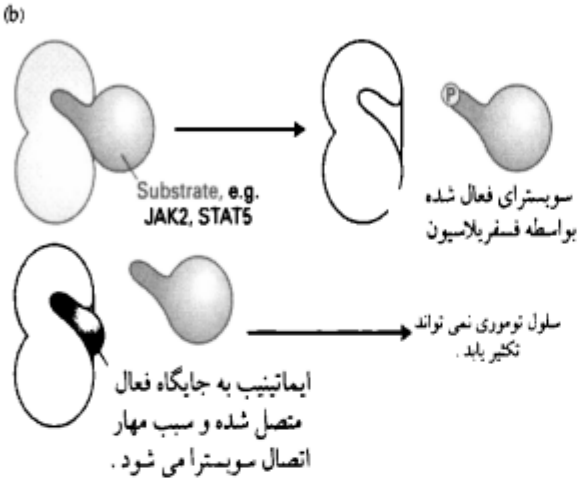
زیست‌شناسی سلولی و مولکولی به چگونگی درمان سرطان کمک می‌کند

داستان ایماتینیب که جلوتر شرح دادیم نشان می‌دهد که چگونه ژنتیک (کشف کروموزوم‌های فیلادلفیا و انکوژن‌های مهمی که ایجاد می‌کند) به همراه علم بیوشیمی (کشف فعالیت مولکولی پروتئین Abl) توانستند درمان‌های جدید و مؤثری را ایجاد کنند. به طور کلی، هر تفاوت میان سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال، مجالی را برای کشف یک داروی جدید یا درمانی که تنها سلول‌های سرطانی را بکشد و یا حداقل رشد کنترل نشده آنها را متوقف بکند، ایجاد می‌کند. بنابراین، علم بیولوژی سلولی ملکولی تومورها یک علم مهمی است که توسط محققان بهره‌برداری شد تا درمان‌های ضدسرطانی که به طور دقیق‌تری فقط سلول‌های سرطانی را هدف‌گیری می‌کنند، توسعه یابند.

سرطان پستان یک مثال خوب از این مطلب است که چگونه تکنیک‌های زیست‌شناسی سلولی ملکولی توانستند بر هر دو جنبه درمانی و مسکّن بودن داروها و درمان‌های به کار گرفته شده، اثر بگذارند. از آنجایی که نرخ بروز سرطان ریه در راستای افزایش میزان زنان سیگاری پیشرفت می‌کند بنابراین سرطان پستان که یکی از سرطان‌های بسیار کشنده برای زنان محسوب می‌شده به عنوان دومین علت بسیار مهم مرگ زنان سرطانی باقی مانده است. علت سرطان پستان هنوز ناشناخته است، اما میزان آن در

1- Burkitt's lymphoma

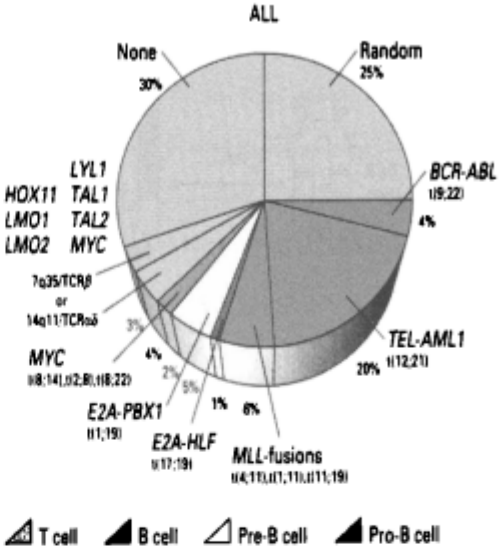


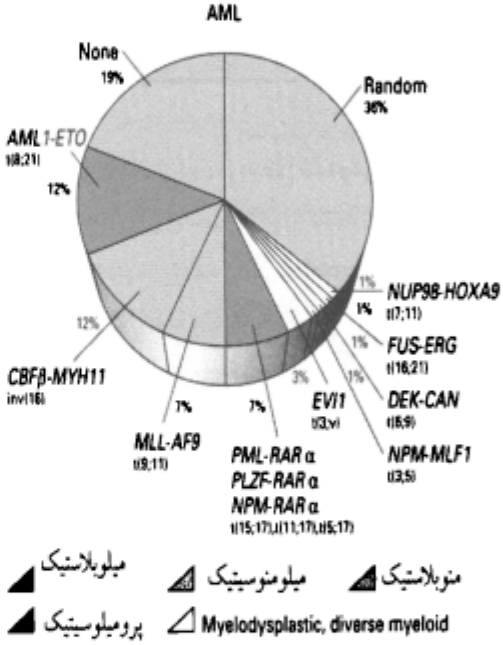


▲ **شکل ۲۰ـ۲۵ پروتئین کیناز Bcr-Abl.** (a) کروموزوم فیلادلفیا از یک تبادل میان سرهای کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ ایجاد می‌کند و پروتئین ادغامی انکوژنیک به وسیله تبادلات کروموزم فیلادلفیا تشکیل می‌شود. (b) پروتئین ادغامی Bcr-Abl یک کیناز با فعالیت همیشگی است که پروتئین‌های موجود در مسیر انتقال پیام را فسفریله می‌کند. ایماتینیب به جایگاه فعال Bcr-Abl متصل شده و و فعالیت کینازی آن را مهار می‌کند. (c) ایماتینیب به جایگاه فعال Bcr-Abl متصل می‌گردد.

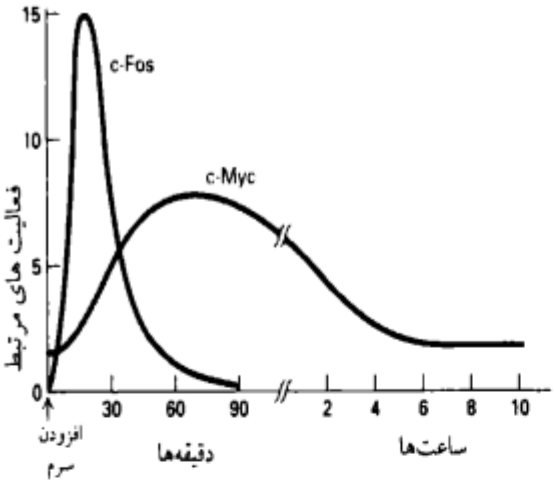
صورت بروز برخی جهش‌های خاص، افزایش می‌یابد. سرطان‌های پستان اغلب‌در طی معاینات ماموگرام‌معمول (اشعه X) شناسایی می‌شوند. به طور معمول یک بیوپسی حدود ۱ـ۲cm توده بافتی برای انجام بررسی‌های تشخیصی گرفته شده و با آنتی‌بادی‌هایی که توسط آنها میزان بالای گیرنده استروژن یا پروژسترون را در صورت وجود مشخص می‌کنند، آزمایش می‌گردند. این گیرنده‌های استروئیدی قابلیت تحریک رشد تومور را دارند و گاهی اوقات در سلول‌های سرطان سینه در مقادیر زیاد بیان می‌شوند. اگر یکی از این گیرنده‌ها وجود داشته باشند، از وجود آنها در درمان استفاده می‌شود. یک دارویی که تاموکسیفن نام دارد و مهارکنندهٔ گیرنده استروژن است برای محروم کردن سلول‌های توموری از هورمون محرک رشد استفاده می‌شود. نمونه بیوپسی را همچنین به منظور بررسی تزاید پروتوانکوژن HER2/NEU که همان طور که قبلاً دیدیم، گیرندهٔ EGF2 را کد می‌کند، آزمایش می‌کنند. یک آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی برای Her2، به عنوان یک درمان جدید، موفق و بسیار برجسته برای زیردسته‌ای از سرطان‌های پستان که Her2 را تولید می‌کنند به کار گرفته می‌شود. آنتی‌بادی Her2 در داخل خون تزریق می‌شود و پس از شناسایی Her2 و ورود آن به داخل سلول، به طور انتخابی سلول‌های سرطانی را می‌کشد بدون آن که هیچ اثر جانبی روی سلول‌های پستان نرمال (و سایر سلول‌ها) که مقادیر مناسب Her2 را تولید می‌کنند، داشته باشد.

سرطان پستان به کمک ادغام روش‌های جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی درمان می‌شود. قدم اول جراحی و برش (برداشت) تومور و آزمایش گره‌های لنفی برای بررسی وجود تومور متاستازی

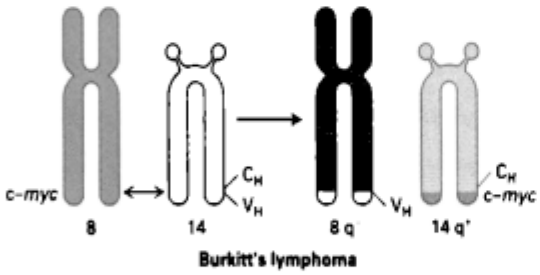




▲ **شکل ۲۱ـ۲۵ (شکل رنگی) تبادلات کروموزومی که تشکیل انکوژن داده و سبب بروز لوکمیای حاد می‌شوند.** به غیر از Bcr-Abl، پروتئین‌های ادغامی جزو فاکتورهای رونویسی هستند. ALL = لوکمیای لنفوسیت حاد؛ ALL = لوکمیای میلوسیت حاد. اندازهٔ قطعات کروی شکل نشان‌دهنده درصد موارد بیماری است که به علت بازآرایی‌های کروموزومی ایجاد شده‌اند. «اتفاقی» اشاره به ایجاد شکست‌های کروموزومی دارد که بر ژن‌هایی که تاکنون شناسایی نشده‌اند اثر می‌گذارد و «None» اشاره به مواردی دارد که در آنها بازآرایی‌های ژنی مشاهده نشده است. پائین هر شکل دسته‌ای از کدهای رنگی آورده شده است که نشان دهنده کلاس‌های اصلی متفاوت با هم در لوکمیاهاست.



▲ **شکل تجربی ۲۲ـ۲۵ اضافه کردن سرم به محیط کشت حاوی سلول‌های 3T3 ثابت شده، یک افزایش محسوسی را در فعالیت دو محصول حاصل از پروتوانکوژن‌ها که شامل c-Fos و c-Myc است ایجاد می‌کند.** سرم حاوی فاکتورهای شبه فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) است که رشد سلول‌های ثابت را تحریک می‌کند. یکی از شایع‌ترین اثرات فاکتورهای رشد، القا بیان c-Fos و c-Myc است که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که جزو فاکتورهای رونویسی‌اند.



▲ **شکل ۲۳ـ۲۵ تبادلات کروموزومی در لنفومای بورکیت.** در نتیجه تبادل میان کروموزوم‌های شماره ۸ و ۱۴، ژن c-myc در مجاورت ژن مربوط به قطعه زنجیره سنگین (C_H) آنتی بادی قرار می‌گیرد که منجر به افزایش تولید فاکتور رونویسی Myc در لنفوسیت‌ها و بنابراین رشد آنها در لنفوما می‌شود.

است که به عنوان یک فاکتور مشخص کننده تومور محسوب می‌شود. درمان بعدی شامل ۶ هفته رادیودرمانی و ۸ هفته شیمی درمانی است که در طی آن سه نوع متفاوت از عوامل نیز استفاده می‌گردد. این درمان‌های سخت برای کشتن سلول‌های سرطانی در حال تقسیم طرح‌ریزی شده‌اند، در هر حال این درمان‌ها باعث اثرات جانبی می‌شوند که شامل مهار تولید سلول خونی، ریزش موها، تهوع و

اختلالات عصبی است. به منظور کمک به این بیماران، به آنها فاکتور رشد G-CSF (فصل ۱۶) تزریق می‌شود تا به تشکیل نوتروفیل (یک نوع سلول خونی سفید که عفونت‌های باکتریایی و قارچی را از بین می‌برد) و اریتروپوئیتین (Epo فصل ۱۶) کمک کند و به وسیله اریتروپوئیتین، تشکیل سلول قرمز خون تحریک گردد. علی‌رغم تمام این درمان‌ها، میانگین زنان (۶۰ ساله تومور ۲cmای، یک گره لنفی مثبت) دارای ۴۰ـ۳۰ درصد ریسک، می‌تواند توسط داروهای مهارکننده هورمون از قبیل تاموکسیفن که داده‌های مولکولی حاصله نشان می‌دهند که گیرنده هورمونی آن بر روی سلول‌های سرطانی وجود دارد به میزان ۱۵ـ۱۰ درصد کاهش یابد. بقاء سلول‌ها به واسطه به کارگیری درمان‌های دیگر استفاده از آنتی بادی‌های بر ضد انکوپروتئین Her2/Neu حدود ۱۰ـ۵ درصد دیگر کاهش می‌یابد. بنابراین زیست‌شناسی مولکولی یک اثر فوق‌العاده روی میزان زنده‌ماندن افراد مبتلا به سرطان پستان دارد که به نظر می‌رسد هنوز خیلی کمتر از آن چیزی است که انتظار داریم.

در آینده استفاده از داروهایی که برای اشعه‌درمانی و شیمی درمانی و حتی جراحی لازمند اساساً کاهش خواهد یافت و بنابراین سمیت و آسیب‌های جنبی ناشی از آنها هم کاهش می‌یابد. پیشرفت علم زیست‌شناسی سلولی مولکولی سرطان این امکان را به وجود آورده است که داروهایی که تجویز می‌شوند در درجه اول مؤثرتر و دارای ضرر کمتری هستند و ثانیاً با ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های مربوط به یک سرطان منحصر به فرد سازگاری دارد. در درمان تومور پستان می‌توان تقریباً پیشرفت‌هایی را در این راستا مشاهده نمود.

نکات کلیدی بخش ۳-۲۵

جهش‌های انکوژنیک در پروتئین‌های محرک رشد

■ جهش‌ها یا جابه‌جایی کروموزومی که باعث می‌شود RTKهای مربوط به فاکتورهای رشد در غیاب لیگاندهای طبیعی شان دیمریزه شده و منجر به فعالیت پیوسته گیرنده می‌شوند (اشکال ۱۶-۲۵ و ۱۷-۲۵ را ملاحظه کنید). هر کدام از این فعال‌شدن‌ها در نهایت تغییراتی را در بیان ژن ایجاد می‌کند که می‌تواند سلول‌ها را تغییر شکل دهد. تولید بالای گیرنده‌های فاکتور رشد می‌تواند اثر مشابهی داشته و منجر به تکثیر غیرطبیعی سلول شود.

■ برخی از پروتئین‌های پوشش ویروسی می‌توانند به گیرنده‌های سلول‌های میزبان متصل شده، آنها را فعال کرده و در نتیجه تکثیر سلولی را در غیاب پیامهای طبیعی تحریک کنند.

■ بسیاری از سلول‌های توموری به طور پیوسته اشکال فعال یک یا چندین پروتئین پیام رسان سلولی را تولید می‌کنند که باعث تحریک پیامهای رشد در غیاب فاکتورهای رشد طبیعی می‌شوند.

■ یک جهش نقطه‌ای در Ras یک پروتئین انتقالی مهم در بسیاری از مسیرهای پیام رسانی که تکثیر و تمایز سلولی را تحریک می‌کند فعالیت GTPase آن را کاهش می‌دهد و در نتیجه آنرا در حالت فعال شده نگه می‌دارد.

■ فعالیت src، یک پروتئین تیروزین کیناز انتقال دهنده پیام سیتوزولی به صورت طبیعی توسط فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون برگشت‌پذیر ریشه تیروزین در نزدیکی انتهای C تنظیم می‌شود (شکل ۱۹-۲۵ را ملاحظه کنید). فعالیت غیرتنظیمی انکوپروتئین src فاقد این تیروزین، باعث تکثیر غیرطبیعی بسیاری از سلول‌ها می‌شود.

■ کروموزوم فیلادلفیا، که ناشی از ترانسلوکاسیون کروموزومی است یک انکوژن کیمری bcr-abl تولید می‌کند. فعالیت غیرقابل تنظیم کینازی Abl مربوط به انکوپروتئین Bcr-Abl برای اثرات انکوژنی آن ضروری است. مهارکننده‌های فعالیت کینازی Abl (ایماتینب و گلیویک) در درمان لوسیهای میلوژنوس (CML) موثر بوده و می‌توانند بر ضد تعداد کمی از سایر سرطان‌های مشتق شده مربوط به کینازها بکار روند (شکل ۲۰-۲۵ را ملاحظه کنید).

■ بسیاری از انواع دیگر لوسمی همچنین در نتیجه بازآرایی‌های کروموزومی ناشی می‌شود که ژن‌های ادغامی جدید در پروتئین‌های ادغامی را بوجود می‌آورد و فرایندهای شکست و اتصالات مجدد نادر در سلول‌های خونی که پروتئین‌های جدید را بوجود می‌آورد سبب رشد کنترل نشده می‌گردد. سلول در یک کلونی از سلول‌های موتانت رشد می‌کند.

■ تولید نامناسب فاکتورهای رونویسی هسته‌ای مثل Fos، Jun و Myc می‌توانند باعث تغییر شکل شوند. در سلول‌های لنفومای بورکیت، C-myc به نزدیکی ژن آنتی‌بادی نقل مکان می‌کند و در نتیجه باعث تولید بالای C-myc می‌گردد (شکل ۲۳-۲۵ را ملاحظه کنید).

■ آنالیز دقیق مولکولی تومورهای اولیه استفاده از درمانهای دارویی هدفمند را که برای نوع ویژه‌ای از انواع تومورها هستند مناسب می‌کند. این آنالیز سبب کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان سینه شده است. بر پایه افزایش اطلاعات در

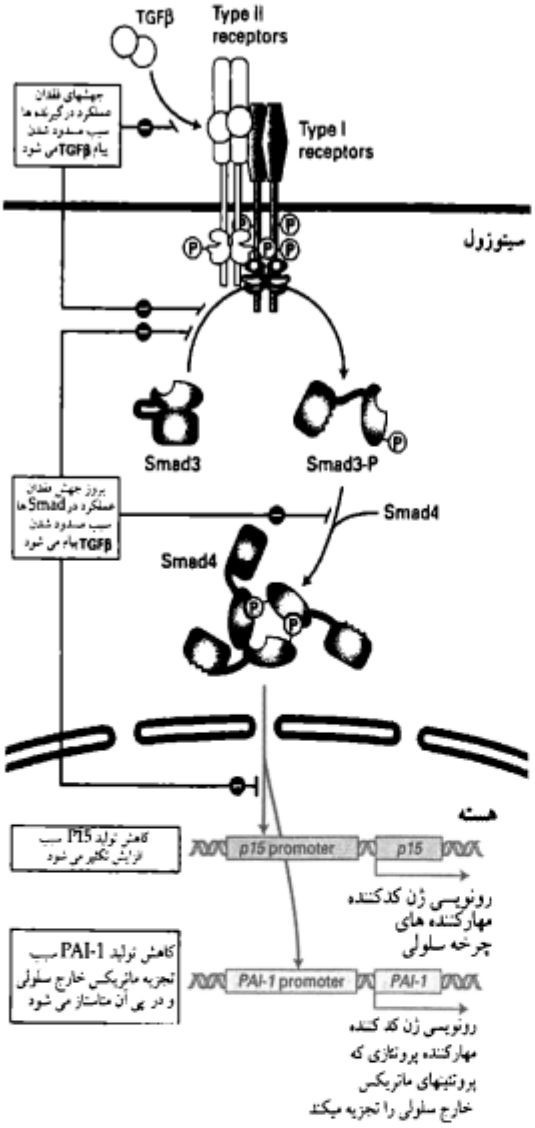
مورد تنظیم سلول‌های توموری، جنبه‌های بسیاری خوبی برای درمان هدفمند سرطان‌ها ایجاد خواهد شد.

■ پیشرفت تکنیک‌های مولکولی برای تعیین ویژگی تک تک تومورها اجازه کاربرد درمانهای دارویی و آنتی بادی را می‌دهد که فقط ویژگی‌های خاصی از تومور را هدف قرار می‌دهد. این امر درمان موثر هر کدام از بیماران را ممکن ساخته و استفاده از داروها و آنتی بادیها را که ممکن است اثرات کم یا حتی سمی داشته باشند محدود خواهد ساخت.

۲۵-۴ جهش‌ها منجر به از دست رفتن کنترل‌های مربوط به مهار رشد و چرخه سلولی می‌شوند

رشد و تکامل عادی به برقراری یک تعادل بسیار متوازن و تنظیم شده میان مسیرهای شروع کننده رشد و مسیرهای مهارکننده رشد بستگی دارد. جهش‌هایی که این توازن را بر هم می‌زنند می‌توانند باعث ایجاد سرطان شوند. اغلب جهش‌هایی که در فصل قبل شرح داده شدند، سبب فعالیت نامناسب مسیرهای شروع کننده رشد می‌شوند. تنها جهش‌هایی برای ما اهمیت دارند که باعث کاهش فعالیت مسیرهای مهارکننده رشد و آن هم در زمانی می‌شوند که به آنها نیاز است.

به عنوان مثال، فاکتور رشد تغییر دهنده β(TGFβ)، علی‌رغم نام آن، سبب مهار تکثیر اکثر انواع سلول‌ها از قبیل سلول‌های سیستم ایمنی و سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود. اتصال TGFβ به گیرنده‌اش، فعالیت فاکتورهای رونویسی Smad سیتوزلی را تحریک می‌کند (شکل ۴-۱۶). پس از انتقال Smadها به هسته، آنها می‌توانند بیان ژن‌های کدکننده p15 را تحریک کنند که یک مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین (CDK4) بوده و سبب می‌شود که سلول‌ها در مرحله G1 متوقف شوند. پیام‌رسانی TGFβ، همچنین سبب راه‌اندازی بیان ژن‌هایی می‌شود که پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و مهارکننده 1 فعال کننده‌های پلاسمینوژن (PAI-1) را کد می‌کنند که در نتیجه آن، سبب کاهش تجزیه ماتریکس که توسط پلاسمین کاتالیز می‌گردد، می‌شود. جهش‌های فقدان عملکرد در گیرنده‌های TGFβ یا در Smadها، تکثیر سلول را شروع کرده که احتمالاً در تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری هم شرکت می‌کند (شکل ۲۴-۲۵). چنین جهش‌هایی در حقیقت در یک نوع خاصی از سرطان‌های انسانی کشف شده است. به عنوان مثال حذف ژن Smad4 در اکثر سرطان‌های پانکراتیک انسانی رخ می‌دهد؛ سلول‌های رتینوبلاستوما و سرطان کولون، فاقد گیرنده‌های TGFβ



▲ **شکل ۲۴-۲۵ اثر ناشی از فقدان مسیر پیام‌رسانی TGFβ.** اتصال TGFβ، یک فاکتور ضد رشد، سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی Smad می‌شود. در غیاب پیام‌رسانی TGFβ به دلیل جهش گیرنده یا جهش در یک SMAD، سلول تکثیر یافته و تهاجم به ماتریکس خارج سلولی احاطه کننده (EMC) آن افزایش می‌یابد.

فعال هستند و بنابراین به مهار رشد توسط TGFβ، جواب نمی‌دهند.

مکانیسم‌های پیچیده تنظیم چرخه سلولی یوکاریوتی، اولین هدف برای جهش‌های انکوژنیک است. هم پروتئین‌های با فعالیت مثبت و هم منفی به طور دقیق ورود سلول‌ها را به داخل چرخه سلولی و پیشروی از میان این چرخه را کنترل می‌کنند که این چرخه دارای چهار فاز اصلی است: G_1، S، G_2 و میتوز (شکل ۳۴-۲۰). این سیستم تنظیمی سبب تضمین همکاری مناسب عوامل رشد سلولی در طی G_1 و G_2، سنتز DNA طی فاز S و تفکیک کروموزومی و

تقسیم سلول در طی میتوز می‌شود. به علاوه، سلول‌هایی که دچار آسیب می‌شوند DNAی آنها در حالت عادی قبل از آن که همانندسازی کند، متوقف می‌شود و یا اگر در فاز G_2 آسیب بینند، قبل از تفکیک کروموزوم‌ها، چرخه متوقف خواهد شد. این توقف‌ها به سلول فرصت می‌دهد تا آسیب DNA را برطرف کند. متناوباً، سلول‌هایی که متوقف شده‌اند، یا توسط مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌میرند و یا دست کم تقسیم نمی‌شوند. عملکرد سیستم کنترل کل چرخه سلولی، مانع از این می‌شود که سلول‌ها سرطانی شوند. طبق آنچه که انتظار می‌رود، بروز جهش‌ها در این سیستم اغلب منجر به تکامل غیرعادی یا ایجاد سرطان می‌شود.

جهش‌هایی که منجر به عبور تنظیم نشده از فاز G_1 به S می‌شوند، انکوژنیک هستند.

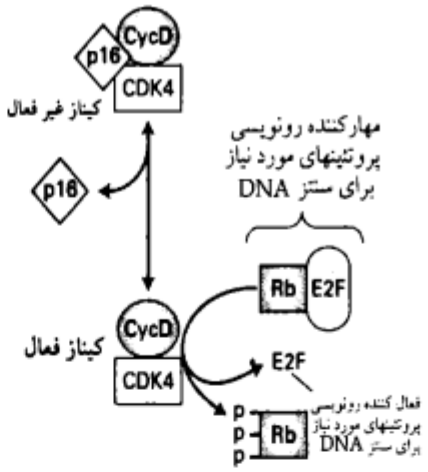
مرحله‌ای که در آن سلول از یک نقطه ویژه در اواخر G_1 می‌گذرد را **نقطه محدودکننده**[1] می‌نامند که در آن سلول به طور برگشت‌ناپذیر به فاز S وارد شده و DNAی آن شروع به همانندسازی می‌کند (شکل ۳۲ـ۲۰). **سیکلین‌های تیپ D، کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs)** و پروتئین Rb، تمام عوامل تشکیل دهنده سیستم کنترلی هستند که گذر از نقطه محدود کننده را تنظیم می‌کنند.

بیان ژن مربوط به سیکلین تیپ D توسط اکثر فاکتورهای رشد خارج سلولی یا **میتوژن‌ها**[2] القا می‌گردد. این سیکلین‌ها به همراه دستجات CDK4 و CDK6 خود آرایش می‌یابند تا تشکیل کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK را بدهند که از لحاظ کاتالیتیکی فعال است و فعالیت کینازی آنها، گذر از نقطه محدودکننده را راه‌اندازی می‌کند. جلوگیری از عملکرد میتوژن قبل از عبور از میان نقطه محدودکننده منجر به تجمع P16 می‌شود. به همین صورت اگر مقدار P15 در غلظت‌های بالا نگه داشته شود، P16 به طور اختصاصی به CDK4 و CDK6 اتصال می‌یابد و با مهارکردن فعالیت کینازی آنها، سبب توقف G_1 می‌شود. در شرایط عادی چرخه سلولی، فسفریلاسیون پروتئین Rb در نیمه راه G_1، توسط کمپلکس‌های فعال سیکلین D-CDK4 و سیکلین D-CDK6 راه‌اندازی می‌شود. Rb غیرفسفریله به فاکتورهای رونویسی E2F در سیتوپلاسم اتصال یافته و سبب توقف فعالیت آنها می‌شود. فاکتورهای رونویسی E2F، رونویسی ژن‌هایی را تحریک می‌کنند که پروتئین‌های مورد نیاز برای سنتز DNA را کد می‌کنند. فسفریلاسیون Rb توسط سایر کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK در اواخر G_1 تکمیل می‌گردد که موجب آزاد شدن و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی E2F و پیشروی $G_1 \rightarrow S$ می‌شود. فسفریلاسیون کامل Rb و جدانشدن آن از E2F، به طور برگشت‌ناپذیری، سلول را به سوی سنتز DNA رهنمون می‌کند. اغلب تومورها دارای یک جهش انکوژنیک هستند که سبب افزایش تولید یا فقدان یکی از اجزاء موجود در این مسیر می‌شوند که چنین سلول‌هایی در غیاب پیام‌های رشد خارج سلولی مناسب به فاز S وارد می‌شوند (شکل ۲۵ـ۲۵ و شکل ۳۳ـ۲۰).

به عنوان مثال، مقادیر افزایش یافته سیکلین D_1، یکی از سه نوع سیکلین D، در اکثر سرطان‌های انسانی گزارش شده است. به عنوان مثال، در سرطان‌های ویژه لنفوسیت‌های B مولد آنتی‌بادی، ژن سیکلین D1 طوری انتقال می‌یابد که رونویسی آن تحت کنترل یک افزاینده ژن آنتی بادی در آمده و سبب افزایش تولید سیکلین D1 فراتر از میزان لازم برای چرخه سلول می‌شود که به پیام‌های خارج سلولی پاسخ نمی‌دهد. (این پدیده مشابه انتقال c-myc در سلول‌های لنفوم بورکیت است که پیشتر به شرح آن پرداختیم). سیکلین D1 می‌تواند به صورت انکوپروتئینی عمل کند که در موش‌های ترانس ژنی که در آنها ژن سیکلین D1 طوری جابجا شده بود که تحت کنترل یک افزاینده اختصاصی برای سلول‌های مجرای پستانی در آمده بود مطالعه شد. در ابتدا سلول‌های مجاری دچار تکثیر کنترل نشده گشتند و سرانجام تومورهای پستانی در این موش‌های ترانس ژنیک گسترش یافت. تزاید ژن سیکلین D1 و به همراه آن افزایش تولید پروتئین سیکلین D1، یک پدیده شایع در سرطان پستان انسان است. مقادیر اضافی سیکلین D1 سلول‌ها را تحریک به گذر از چرخه سلولی می‌کند.

پروتئین‌هایی که نقش مهارکننده‌های سیکلین CDK را دارند، نقش بسیار مهمی در تنظیم چرخه سلولی ایفا می‌کنند (فصل ۲۰)، خصوصاً جهش‌های فقدان عملکرد که مانع از فعالیت مهاری p16 روی فعالیت کینازی سیکلین CDK4/6-D می‌شوند در چندین سرطان انسانی شیوع زیادی دارد. همانطور که شکل ۲۵ـ۲۵ به طور واضح نشان می‌دهد، نبود p16، سبب افزایش تولید سیکلین D1 شده که منجر به فسفریلاسیون بیش از حد Rb و آزادسازی فاکتور رونویسی E2F فعال می‌شود. بنابراین p16 در حالت عادی به عنوان یک مهارکننده تومور عمل می‌کند. اگر چه ژن سرکوبگر تومور p16، در برخی از سرطان‌های انسانی حذف می‌شود اما در سایر سرطان‌ها

1- Restriction point 2- Mitogenes



▲ **شکل ۲۵-۲۵ کنترل نقطه محدودکننده.** پروتئین Rb غیرفسفریله به فاکتورهای رونویسی که مجموعاً E2F نامیده می‌شوند متصل می‌گردد و مانع فعال‌سازی رونویسی با واسطه E2F برای اکثر ژن‌هایی می‌شود که محصولات آنها برای سنتز DNA لازم است (مثل DNA پلی‌مرازها). فعالیت کینازی سیکلین CDK4 سبب فسفریله شدن Rb و فعال شدن E2F می‌شود؛ این فعالیت کینازی توسط P16 مهار می‌شود. افزایش تولید سیکلین D، یک تنظیم کننده مثبت، یا فقدان تنظیم کننده‌های منفی P16 و Rb عموماً در سرطان‌های انسانی رخ می‌دهد.

توالی p16 به صورت نرمال است. در برخی از موارد سرطانی اخیرالذکر (مثل سرطان ریه)، ژن p16 یا ژن‌های کدکننده سایر پروتئین‌هایی که از لحاظ عملکردی مرتبط با آن هستند، به علت افزایش متیلاسیون ناحیه پروموتری آنها به صورت غیرفعال در می‌آیند که این امر موجب ممانعت از رونویسی آنها می‌شود. این که چه عاملی سبب راه‌اندازی این تغییرات در متیلاسیون p16 می‌شود هنوز ناشناخته است. اما این امر مانع از تولید یک پروتئین مهم کنترل کننده چرخه سلولی می‌شود.

طبق آنچه قبلاً شرح دادیم، جهش‌های غیرفعال کننده در هر دو آلل RB منجر به ایجاد رتینوبلاستومای کودکان می‌شود که یک نوع تقریباً نادر از سرطان است. بنابراین، از بین رفتن عملکرد ژن RB، همچنین در اکثر سرطان‌های رایج که در مراحل آخری زندگی بروز می‌کنند (مثل کارسینومای ریه، پستان و مثانه) دیده می‌شود. این بافت‌ها، برخلاف بافت شبکیه به احتمال زیاد، پروتئین‌های دیگری را تولید می‌کنند (مثل p107 و p130 که هر دو از لحاظ ساختاری به p53 مرتبط هستند) که عملکرد این پروتئین‌ها از Rb بیشتر است و بنابراین فقدان Rb برای پیشگیری از سرطان خیلی مهم و حیاتی نیست. یک روش دیگر اینست که سرانجام عملکرد Rb قطع گردد. علاوه بر جهش‌های غیرفعال کننده، عملکرد Rb می‌تواند توسط اتصال یک پروتئین مهارکننده به آن که با E7 نشان داده می‌شود نیز حذف شود که E7 توسط ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) که یک روش خطرناک دیگر ویروس برای ایجاد بافت‌های مولد ویروس است تولید می‌شود. در حال حاضر، بروز این اتفاق تنها در سرطان دهانهٔ رحم شناخته شده است.

تومورهایی که دارای جهش‌های غیرفعال کننده در Rb هستند معمولاً سیکلین D1 و پروتئین P16 عملکردی را در مقادیر نرمال تولید می‌کنند. از طرف دیگر، سلول‌های توموری که سیکلین D1 را در مقادیر زیاد تولید می‌کنند، یا دچار فقدان P16 عملکردی هستند و یا معمولاً دارای Rb تیپ وحشی هستند. بنابراین فقدان تنها یکی از اجزاء این سیستم تنظیمی برای کنترل گذر از نقطه محدودکننده کافی است که کنترل رشد نرمال سلولی متوقف شده و سرطان بروز کند.

جهش‌های فقدان عمل که بر روی پروتئین‌های تغییر شکل کروماتین[1] اثر می‌گذارند، سبب ایجاد تومورها می‌شوند.

مشاهده کردیم که چطور جهش‌ها می‌توانند توسط غیرفعال کردن ژن‌های سرکوب کننده تومور، کنترل رشد را مختل کنند. بنابراین، این نوع از ژن‌ها می‌توانند توسط ساختارهای ممانعت کننده کروماتین خاموش شود. در سال‌های اخیر اهمیت کمپلکس‌های تغییر شکل کروماتین، از قبیل کمپلکس SWI/SNF در کنترل رونویسی به میزان زیادی روشن شده است. این کمپلکس‌های چند پروتئینی عظیم و متنوع در هسته خودشان دارای یک هلیکاز وابسته به ATP هستند و اغلب در راستای کنترل تغییرات هیستونی و تغییر شکل کروماتین ایفای نقش می‌کنند (فصل ۷). کمپلکس‌های SWI/SNF توسط ایجاد تغییرات در موقعیت یا ساختمان نوکلئوزوم‌ها می‌توانند ژن‌ها را در دسترس پروتئین‌های متصل شونده به DNA که رونویسی را کنترل می‌کنند قرار دهند و یا از دسترسی آنها دور کنند. اگر یک ژنی که در حالت عادی توسط تغییرات کروماتینی وابسته به SWI/SNF وساطت می‌شود فعال یا مهار گردد، وقوع جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های SWI یا SNF سبب ایجاد تغییراتی در بیان آن ژن هدف می‌شود.

اطلاعات ما در مورد ژن‌های هدفی که توسط SWI/SNF و سایر کمپلکس‌های اینچنینی تنظیم می‌شوند، هنوز کامل نیست. اما ظاهراً این هدف‌ها شامل برخی از ژن‌های تنظیم کننده رشد است. به عنوان مثال، مطالعات انجام شده روی موش‌های ترانس ژنیک نشان

1- Remodelling

می‌دهد SWI/SNF در مهار ژن‌های E2F نقش دارند که سبب مهار پیشروی چرخه سلول می‌گردد. ارتباط میان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های SWI/SNF و ژن E2F در ضمن آزمایش‌ها ژنتیکی صورت گرفته روی مگس‌ها کشف گردید. مگس‌های ترانس ژنی که در آنها میزان بیان E2F افزایش یافته بود دارای نقایص کمی در رشد بودند. ضمن یک تحقیق بر روی جهش‌هایی که سبب افزایش اثر مقادیر بالای بیان E2F در این مگس‌ها می‌شد، نشان دهنده اثر سه جزء موجود در کمپلکس SWI/SNF بود. فقدان عملکرد این ژن‌ها اثرات تکثیری E2F را افزایش می‌دهد که این امر نشان دهنده اینست که SWI/SNF در حالت عادی بر عملکرد فاکتور رونویسی E2F بی‌اثر است. بنابراین فقدان عملکرد SWI/SNF همانند فقدان عملکرد Rb می‌تواند تنها منجر به افزایش رشد و شاید سرطان شود. در حقیقت در موش‌ها، پروتئین Rb پروتئین‌های SWI/SNF را برای مهار رونویسی ژن E2F آماده می‌کند. Rb توسط این اثری که روی E2F می‌گذارد و توسط بازیابی هیستون دکربوکسیلازها و متیل‌ترانسفرازها، سبب مهار رونویسی ژن‌ها می‌شود.

مشاهدات اخیر بر روی انسان‌ها و موش به طور قوی اثر ژن SNF5 را در سرطان نشان می‌دهد. در انسان‌ها، جهش‌هایی که سبب غیرفعال کردن SNF5 در سلول‌های بدنی می‌شوند منجر به ایجاد تومورهای rhabdoid در کلیه و ایجاد یک زمینه ارثی (خانوادگی) برای تشکیل تومورهای مغزی و سایر تومورها می‌شود. در موش در ۳۰ـ۱۵ درصد هتروزیگوس‌های $snf5^-/snf5^+$، تومورهای rhabdoid ایجاد می‌شود و در تمام این سلول‌های توموری از بین رفتن آلل فعال دیگر مشاهده می‌گردد. از آنجائی که مکانیسم ایجاد این تومورها ناشناخته است، مطالعات ریزآرایه برای کشف تغییرات تنظیمی در این تومورها به کار گرفته شده است. مطالعات نشان دهنده وجود تشابهات بیان ژن در تومورهای موش و انسانی است و این که فقدان SNF5 منجر به بیان بیشتر ژن‌های چرخه سلولی شامل اکثر انواعی می‌شود که توسط E2F تنظیم می‌گردند. انجام آزمایش‌ها ژنتیک بعدی با بکارگیری جهش یافته‌های دوتایی $snf5^-/snf5^-$، $p53^-/p53^-$ در موش نشاندهنده اثر سینرژیک میان ژن‌هایی است که در تشکیل سرطان نقش دارند. در این موش‌ها، فقدان Snf5 منجر به عدم مهار ژن E2F و فقدان p53 منجر به فعال شدن کامل E2F در راه‌اندازی عبور از G_1 به S در چرخه سلولی می‌شود.

همانطور که کمپلکس‌های تغییر شکل کروماتین در تعداد بسیار زیادی از جنبه‌های کنترل رونویسی دخالت دارند، انتظار داریم که SWI/SNF و کمپلکس‌های مشابه نیز با اکثر سرطان‌ها ارتباط داشته باشند. در انسان‌ها، بروز جهش‌هایی در Brgl که یکی از زیرواحدهای کاتالیتیک SWI/SNF را کد می‌کند در تومورهای پروستات، ریه و پستان دیده شده است. ترکیبات کمپلکس SWI/SNF همچنین با BRCA-1 (پروتئین نامشخصی که به سرکوب سرطان پستان انسان کمک می‌کند) نیز ارتباط دارند. BRCA-1 در فرایند ترمیم شکست دو رشته DNA (طبق آنچه که در فصل ۴ شرح داده شد) و در کنترل رونویسی دخالت دارد و بنابراین امکان دارد که کمپلکس SWI/SNF با BRCA-1 در این اعمال همکاری می‌کند.

فقدان p53، نقطه کنترلی آسیب DNA را از بین می‌برد.

سلول‌های دارای p53 عملکردی، زمانی که DNA در اثر تشعشعات آسیب ببینند در فاز G_1 متوقف می‌شوند، در حالی که سلول‌های فاقد p53 بدون عملکرد نمی‌توانند این کار را انجام دهند. برخلاف سایر پروتئین‌های چرخه سلولی، p53 در مقادیر بسیار کمی در سلول‌های سالم وجود دارد زیرا این پروتئین بسیار ناپایدار بوده و سریعاً تجزیه می‌شود. موش‌های فاقد p53 بسیار سالم و زنده هستند به غیر از این که دارای یک پیش زمینه برای ابتلا به چندین نوع سرطان می‌باشند. در موش سالم مقادیر پروتئین p53 طی یک پاسخ پس از رونویسی تنها در شرایط پراسترس از قبیل قرار گرفتن در معرض تشعشعات γ یا فرابنفش، گرما و مقادیر کم اکسیژن بالا می‌رود. آسیب DNA در اثر تشعشعات γ یا سایر استرس‌ها منجر به فعال‌سازی ATM یا ATR (سرین کینازهایی که سبب فسفریلاسیون و بنابراین پایدارشدن p53 می‌شوند) می‌گردد و منجر به افزایش محسوسی در غلظت آن می‌گردد (شکل ۲۶ـ۲۵). p53 پایدار شده، رونویسی ژن‌های کدکننده $p21^{CIP}$ را فعال کرده که این پروتئین به کمپلکس‌های سیکلین ـ CDK در G_1 پستانداران اتصال یافته و آن را مهار کرده و همچنین بر رونویسی جمع کثیری از سایر ژن‌ها نیز اثر می‌کند. در نتیجه، سلول‌های دارای DNAی آسیب دیده در فاز G_1 متوقف شده و فرصتی برای ترمیم DNA توسط مکانیسم‌هایی را فراهم می‌کنند که در فصل ۴ مفصل شرح داده شده‌اند و یا سلول‌ها به طور همیشگی متوقف می‌شوند مثل زمانی که سلول پیر می‌گردد. به جز نقش p53 در گذر از G_1 به S تولید وابسته به p53، $p21^{CIP}$ سبب مهار CDK1 می‌شود که در واقع کمپلکس سیکلین CDK1-B را که برای ورود به میتوز نیاز

است مهار می‌کند و به این ترتیب سبب می‌شود که سلول‌ها در G_2 متوقف گردند (شکل ۳۵ـ۲۰، d❹). p53 به طور مستقیم یا غیرمستقیم در مهار بیان ژن‌های کدکننده سیکلین B و توپرایزومراز II نیز نقش دارد که این دو عامل برای گذر از G_2 به میتوز مورد نیازند. بنابراین اگر DNA در پی همانندسازی آسیب دیده باشد، توقف G_2 به واسطه p53، از انتقال آن به دو سلول دختری ممانعت می‌کند.

طبق آنچه که اخیراً یادآوری کردیم، جهش‌های فقدان عملکرد در ژن p53 در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌های انسانی رخ می‌دهد. زمانی که نقطه کنترلی G_1 توسط p53 به طور مناسب اداره نشود، DNA آسیب دیده می‌تواند تقسیم شده، جهش‌ها را ابقاء کرده و باعث انتقال DNA بازآرایی شده به دو سلول دختری می‌شود که به این ترتیب می‌تواند در ایجاد سلول‌های متاستازی شرکت نماید. با این حال، به طور شگفت‌انگیزی سلول‌های هموزیگوس $p53^-/p53^-$ سبب ایجاد نقایص قابل تشخیصی در توقف G_2 نمی‌شوند. به این ترتیب به نظر می‌رسد که روش‌های دیگری برای فعال‌سازی $p21^{CIP}$ یا مهارکننده‌های متفاوتی برای پیشرفت G_2 وجود داشته باشد.

شکل فعال p53 یک تترامر با چهار زیرواحد مشابه است. یک جهش نقطه‌ای بدمعنی در یکی از دو آلل p53 می‌تواند تقریباً فعالیت کلی p53 را از بین ببرد زیرا تمام الیگومرها دست کم یک زیرواحد معیوب را دارا هستند و چنین اولیگومری قابلیت خود را برای فعال کردن رونویسی از دست می‌دهد. بنابراین جهش‌های انکوژنیک p53 به صورت **غالب منفی**[1] هستند زیرا جهش در یک آلل واحد منجر به فقدان عملکرد می‌شود. فقدان فعالیت به صورت غیرکامل است، بنابراین با توجه به آنها رشد سریع‌تر شده است. سلول‌های توموری گاهی اوقات آلل سالم دیگر خود را نیز از دست می‌دهند (از بین رفتن هتروزیگوسیتی). طبق آنچه که در فصل ۵ عنوان کردیم، جهش‌های غالب منفی می‌توانند در پروتئین‌هایی رخ دهند که اشکال فعال آنها چند زیرواحدی است یا این که عملکرد آنها وابسته به برهمکنش با سایر پروتئین‌هاست. برخلاف آن، جهش‌های فقدان عملکرد در سایر ژن‌های سرکوبگر تومور (مثل RB) به صورت مغلوبند، زیرا پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که به صورت منومری عمل می‌کنند و جهش در یک آلل واحد عواقب کمی در عملکرد آنها دارد.

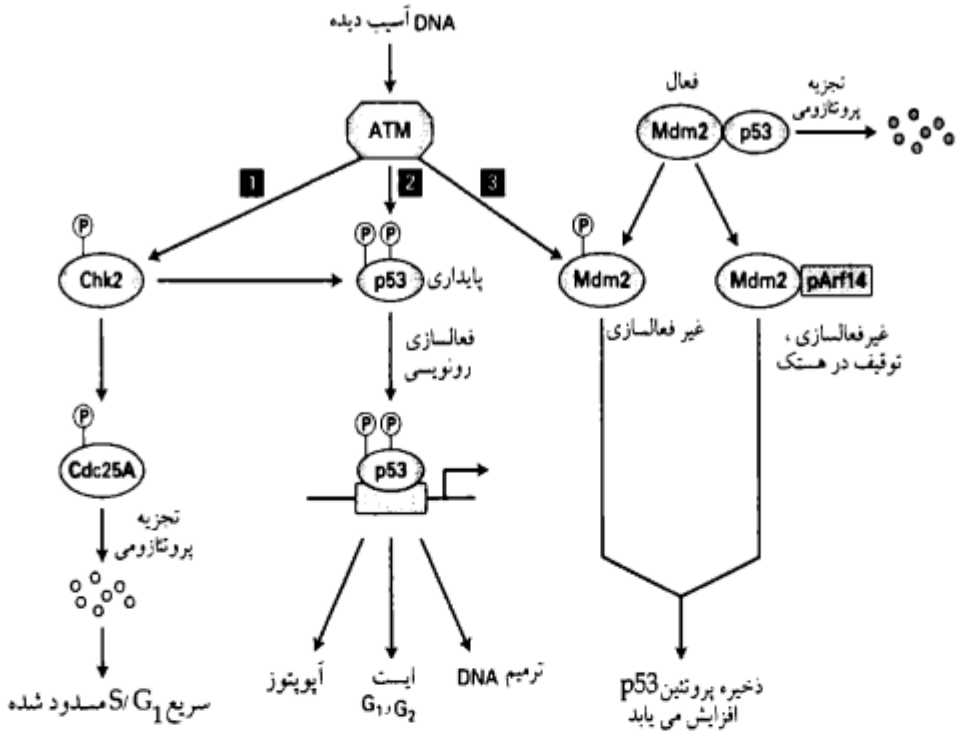
تحت شرایط استرس، ATM کیناز نیز سبب فسفریله و فعال شدن Chk2، (پروتئین کینازی که پروتئین فسفاتاز Cdc25A را فسفریله می‌کند) می‌شود که سبب نشاندار شدن Cdc25A برای تخریب به واسطه یوبی کوئیتین می‌شود. این فسفاتاز در حالت عادی فسفات مهاری را از CDK2 بر می‌دارد. CDK2 یک پیش‌شرط برای ورود سلول‌ها به فاز S می‌باشد. کاهش مقادیر Cdc2A سبب مسدودشدن پیشروی به فاز S و عبور از آن می‌شود (شکل ۲۶ـ۲۵ و شکل ۳۵ـ۲۰، b❹). بنابراین جهش‌های فقدان عملکرد در ژن‌های ATM یا Chk2 برخی از اثرات جهش‌های p53 را دارد.

فعالیت p53 در شرایط عادی توسط پروتئینی که Mdm2 نام دارد در سطوح پائین نگه داشته می‌شود. زمانی که Mdm2 به p53 می‌چسبد، توانایی فعال کردن رونویسی p53 را مهار کرده و اضافه شدن مولکول‌های یوبی کوئیتین به آن را کاتالیز می‌کند و به این ترتیب سبب هدف‌گیری p53 برای تجزیه پروتئازومی می‌شود. فسفریلاسیون p53 توسط ATR یا ATM، سبب برداشت Mdm2 متصل به p53 می‌شود، بنابراین باعث پایداری آن می‌شود. به این دلیل که رونویسی ژن Mdm2 توسط p53 فعال می‌شود، بنابراین Mdm2 در یک حلقه فیدبکی خودتنظیمی با p53 فعالیت دارد که احتمالاً در شرایط عادی مانع از عملکرد بیشتر p53 می‌شود. حتی به نظر می‌رسد که p53 عملکردی که توسط چنین سلول‌های توموری ایجاد می‌شود، مقادیر افزایش یافته Mdm2 سبب کاهش غلظت p53 به حدی می‌شوند که توقف G_1 به واسطه p53 که در پاسخ به تشعشعات ایجاد شده را مختل کند.

فعالیت p53، همچنین توسط یک پروتئین ویروسی پاپیلومای انسانی (HPV) که E6 نام دارد مهار می‌شود. HPV سه پروتئین را کد می‌کند که سبب فعالیت آن در القاء تغییرات پایدار و میتوز در یک گونه از سلول‌های کشت داده شده می‌گردد. دو تا از این پروتئین‌ها (E6 و E7) به ترتیب به p53 و مهارکننده‌های تومورى Rb چسبیده و سبب مهار آنها می‌شوند. وقتی که E7 و E6 با هم فعالیت می‌کنند، توانایی آنها برای القاء تغییرات در غیاب جهش‌های صورت گرفته روی پروتئین‌ها تنظیمی سلول کفایت می‌کند. یادآوری می‌کنیم که پروتئین E5 از HPV که سبب فعال‌سازی شدید گیرنده PDGF می‌شوند، تکثیر سلول‌های تغییر یافته را کاهش می‌دهند.

فعالیت p53 برای القاء توقف چرخه سلولی محدود نمی‌شود. به علاوه، این سرکوبگرهای توموری چندمنظوره، تولید پروتئین‌های پیش آپوپتوز و آنزیم‌های ترمیم کننده DNA را تحریک می‌کند (شکل ۲۶ـ۲۵). پیری و آپوپتوز، در حقیقت مهم‌ترین مواردی هستند که p53 توسط آنها مانع رشد تومور می‌شود.

1- Dominant negative



▲ **شکل ۲۶ـ۲۵ G_1 در پاسخ به آسیب DNA متوقف می‌شود.** فعالیت کینازی ATM در پاسخ به آسیب DNA در اثر استرس‌های مختلف (مثل تشعشعات UV و گرما) فعال می‌شود. سپس ATM فعال شده سه مسیر را راه‌اندازی می‌کند که منجر به توقف G1 می‌شود: (❶) Chk_2 فسفریله می‌شودکه در اصل Cdc25A را فسفریله کرده و آن را برای تجزیه شدن و از بین رفتن نقش آن در فعال‌سازی CDK2 آماده می‌کند. (❷) در مسیر دوم، فسفریلاسیون p25، آن را پایدار کرده و سبب می‌شود ژن‌هایی که بیان آنها توسط p53 فعال می‌شود و کدکننده پروتئین‌هایی هستند که در توقف G_1 و در برخی موارد G_1 نقش دارند، سبب راه‌اندازی آپوپتوز یا شرکت در ترمیم DNA گردند. (❸) مسیر سوم، مسیری دیگر برای کنترل ذخیره p53 است. پروتئین Mdm2 در فرم فعالش، می‌تواند با p53 کمپلکس تشکیل دهد که موجب یوبی‌کوئیتینه شدن p53 و تجزیه آن توسط پروتئازوم می‌شود. ATM سبب فسفریله شدن Mdm2 و فعال‌سازی آن می‌شود که باعث افزایش پایداری p53 می‌شود. به علاوه مقادیر Mdm2 توسط pArf14 (pArf19 در موش) کنترل می‌شود که به Mdm2 متصل شده و آن را در هستک متوقف می‌کند، بنابراین دیگر نمی‌تواند به p53 دسترسی پیدا کند. ژن Mdm2 انسانی به طور مداوم در سارکوما تزاید می‌یابد که به احتمال زیاد سبب غیرفعال شدن شدید p53 می‌شود. به منظور اطلاعات بیشتر به متن مراجعه شود.

ژن‌های آپوپتوتیک می‌توانند به صورت انکوژن‌ها یا ژن‌های سرکوب‌کننده تومور عمل کنند.

در طی تکامل نرمال، اکثر سلول‌ها برای **مرگ برنامه ریزی شده سلول** که تحت عنوان آپوپتوز خوانده می‌شود در نظر گرفته می‌شوند (فصل ۲۱). اکثر ناهنجاری‌ها شامل خطاهای میتوزی، آسیب DNA و تجمع غیرعادی سلول‌هایی که برای تکامل یک اندام عملگر نیاز نیستند، نیز می‌تواند مورد هدف آپوپتوز قرار گیرند. در برخی موارد، مرگ سلولی در شرایط غیرعادی به همراه دریافت پیام‌های موردنیاز برای تأمین بقاء سلولی، رخ نمی‌دهد. سلول‌ها می‌توانند دستورات لازم برای زنده ماندن و یا دستورات لازم برای مرگ را به دست آورند و یک سیستم تنظیمی پیچیده به تکمیل انواع مختلفی از اطلاعات می‌پردازد.

اگر سلول‌ها در زمانی که باید بمیرند، دچار مرگ نشوند و در عوض شروع به تکثیر نمایند ممکن است یک تومور را تشکیل دهند. به عنوان مثال، لوکمی لنفوبلاستیک حاد (CLL) به این دلیل اتفاق می‌افتد که سلول‌ها زمانی که باید بمیرند زنده می‌مانند. سلول‌ها در این حالت به آهستگی تجمع می‌یابند و در اکثر موارد به طور فعالانه تقسیم نمی‌شوند، اما هنوز زنده‌اند. سلول‌های CLL دارای تبادلات کروموزومی هستند که سبب فعال‌سازی ژنی بنام bcl-2 می‌شوند و ما هم اکنون می‌دانیم که این ژن به عنوان مسدود کننده مهم آپوپتوز است (شکل ۲۱-۳۷). در نتیجه تولید بیش از حد و نامناسب پروتئین Bcl-2، از آپوپتوز نرمال جلوگیری کرده و به این سلول‌های توموری اجازه می‌دهد که به حیات خود ادامه دهند بنابراین تومورهای CLL سبب ایجاد نقص در مرگ سلول می‌شوند. دوجین دیگر از این ژن‌ها

که پروتوانکوژن هستند در حالت عادی در تنظیم منفی آپوپتوز نقش دارند که در اثر جهش یافتن به انکوژن‌ها تبدیل می‌گردند. افزایش تولید پروتئین‌هایی که توسط آنها کد می‌شوند، مانع آپوپتوز می‌شوند حتی زمانی که برای توقف رشد سلول‌های سرطانی مورد نیازند.

برعکس، ژن‌هایی که محصولات پروتئینی آنها، آپوپتوز را تحریک می‌کند به صورت سرکوبگرهای توموری عمل می‌کنند. یک مثال در این مورد ژن PTEN است که در فصل ۱۶ راجع به آن صحبت کردیم. فسفاتازی که توسط این ژن کد می‌شود، سبب دِفسفریله شدن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳، ۴، ۵ ـ تری‌فسفات که یک پیک ثانویه بوده و سبب فعال‌سازی پروتئین کیناز B می‌شود، می‌گردد (شکل ۳۰ـ۱۶). در سلول‌های فاقد فسفاتاز PTEN، سطح فسفاتیدیل اینوزیتول ۳، ۴، ۵ ـ تری‌فسفات افزایش می‌یابد و پروتئین کیناز B فعال می‌شود که سبب بقا سلول و جلوگیری از آپوپتوز توسط چندین مسیر مختلف می‌شود. بنابراین PTEN به عنوان یک مهارکننده تومور پروآپوپتوتیک عمل می‌کند و این عمل را توسط کاهش اثرات ضد آپوپتوزی پروتئین کیناز B به انجام می‌رساند.

شایع‌ترین ژن سرکوبگر تومور پروآپوپتوتیک که در سرطان‌های انسانی شناسایی شده است p53 می‌باشد. در میان ژن‌هایی که توسط p53 فعال می‌شوند چندین عدد از آنها کدکننده پروتئین‌های پروآپتوتیک از جمله Bax هستند (شکل ۴۱ـ۲۱). زمانی که اکثر سلول‌ها متحمل آسیب دیدگی‌های شدید DNA یا سایر استرس‌های بی‌شمار از قبیل کمبود فاکتور رشد یا هیپوکسی می‌شوند، بیان وابسته به p53 پروتئین‌های پروآپوپتوتیک، منجر به مرگ سریع آنها می‌شود (شکل ۲۶ـ۲۵). گرچه این وضعیت ممکن است شبیه یک پاسخ مؤثر به آسیب DNA به نظر برسد، اما مانع تکثیر سلول‌هایی می‌شود که به احتمال بالایی دارای تعداد زیادی جهش در خود هستند. زمانی که فعالیت p53 از بین برود، آپوپتوز القاء نمی‌شود و تجمع جهش‌های مورد نیاز برای ایجاد سرطان، با احتمال بیشتری صورت می‌گیرد.

نقص در نقاط کنترل کننده چرخه سلولی اغلب منجر به آنیوپلوئیدی در سلول‌های توموری می‌شود.

مدت زمان زیادی است که به وجود ناهنجاری‌های کروموزومی در تعداد وسیعی از سلول‌های توموری، پی برده‌ایم. هم اکنون به شرح چندین مثال در زمینه انکوپروتئین‌هایی که به واسطه تبادلات، تزاید یا هر دو (مثل c-myc، bcr-abl، bcl-2 و سیکلین D1) ایجاد می‌شوند می‌پردازیم. ناهنجاری کروموزومی دیگری که تقریباً در تمامی سلول‌های توموری به چشم می‌خورد **آنیوپلوئیدی**[1] است، که در آن تعداد غیرعادی از کروموزوم‌ها وجود دارد.

سلول‌هایی که دارای تعداد غیرعادی کروموزومی هستند زمانی تشکیل می‌شوند که نقاط کنترلی ویژه در چرخه سلولی به صورت غیرفعال در آیند. همانطور که در فصل ۲۰ شرح داده شد، نقطه کنترلی DNA همانندسازی نشده در حالت عادی از ورود آن به داخل میتوز جلوگیری می‌کند مگر این که همه DNA در کروموزوم‌ها به طور کامل همانندسازی کرده باشد؛ نقطه کنترلی آرایش یابی دوک، مانع از ورود به آنافاز می‌شود، مگر این که تمام کروموزوم‌های همانندسازی شده، به طور مناسب در دستگاه میتوزی متافاز چسبیده باشند؛ و نقطه کنترلی تفکیک ـ کروموزومی مانع از خروج میتوز و سیتوکینز می‌شود مگر آن که تفکیک کروموزومی به طور صحیح صورت گرفته باشد (شکل ۳۵ـ۲۰ و ❸ ـ ❶). در راستای پیشرفت‌های به دست آمده در شناسایی پروتئین‌هایی که این ناهنجاری‌ها را تشخیص می‌دهند و باعث توقف چرخه سلولی می‌شوند، اساس مولکولی نقایص عملکردی که منجر به آنیوپلوئیدی در سلول‌های سرطانی می‌شود، نیز روشن خواهد شد.

نکات کلیدی بخش ۴-۲۵

جهش‌های مسبب کاهش مهار رشد و کنترل چرخه سلولی

- کاهش پیامدهی توسط TGFB یک تنظیم کننده منفی رشد، تکثیر و رشد سلول‌های بدخیم را افزایش می‌دهد (شکل ۲۴-۲۵ را ملاحظه کنید).
- بیان بالای پروتوانکوژن کدکننده سیکلین D1 یا کاهش ژن‌های سرکوبگر توموری کننده P16 و Rb می‌تواند سبب تنظیم نامناسب در نقطه محدود در مرحله تاخیری G1 شود. برخی از ناهنجاریها معمولاً در تومورهای انسانی دیده می‌شود.
- جهش‌های موثر بر کمپلکس SWI/SNF مربوط به کروماتین که در کنترل رونویسی شرکت می‌کند با انواع وسیعی از تومورها همراه است. در برخی از موارد برهمکنش کمپلکس SWI/SNF با پروتئین سرکوبگر تومور هسته‌ای ممکن است اثر آشکارکنندگی بر بیان ژن داشته باشد.
- پروتئین p53 یک سرکوبگر تومور چند عملکردی است که استراحت بین G1 و G2 آپوپتوز و تعمیر DNA را در پاسخ به DNA آسیب دیده تحریک می‌کند (شکل ۲۶-۲۵ را ملاحظه کنید)

1- Aneuploidy

■ جهش‌های منجر به عدم عملکرد مربوط به ژن p53 در بیش از ۵۰ درصد مواد سرطان‌های انسانی رخ می‌دهد. تولید بالای Mdm2 پروتئینی که به طور طبیعی فعالیت p53 را مهار می‌کند در بسیاری از موارد سرطان‌هایی روی می‌دهد (مثل سارکوما) که پروتئین p53 طبیعی را بیان می‌کند بنابراین در یک روش یا روشهای دیگر مسیر پاسخ p53 غیرفعال شده و منجر به رشد تومور می‌شود.

■ پاپیلوویروس انسانی (HPV) سه پروتئین انکوژنیک کد می‌کند: E6 (p53 را مهار می‌کند)، E7 (Rb را مهار می‌کند) و E5 (گیرنده PDGF را فعال می‌کند).

■ تولید بالای پروتئین‌های ضد آپوپتوزی (مثل Bcl-2) می‌تواند منجر به حیات سلولی نامناسب شده و با لوسمی لنفوبلاستیک حاد (CLL) و سایر سرطان‌ها همراه است. فقدان پروتئین‌هایی که آپوپتوز را تحریک می‌کنند (مثل فاکتور رونویسی p53 و PTEN فسفاتاز) اثرات انکوژنیک مشابهی دارد.

■ ناپایداری ژنومی عامل ایجاد سرطان است. بسیاری از انواع آسیب‌های DNA در تومورها دیده شده است. بسیاری از سلول‌های توموری انسان آنیوپلوئیدی هستند که حاوی تعداد غیرطبیعی از کروموزوم‌ها (همیشه بیشتر) هستند. تخریب در نقاط کنترلی چرخه سلولی که به طور طبیعی DNAی غیرهمانندسازی شده را تشخیص می‌دهند یا کارکرد بد در همایش دوک‌ها یا جدایی نامناسب کروموزوم‌ها می‌توانند باعث ایجاد آنوپلوئیدی در سلول‌ها شوند.

۲۵ـ۵ کارسینوژن‌ها و ژن‌های کارتاکر در سرطان

کارسینوژن‌ها که یا طبیعی بوده و یا به دست انسان ساخته می‌شوند، مواد شیمیایی هستند که سبب ایجاد سرطان می‌شوند. کارسینوژن‌ها سبب جهش‌هایی می‌شوند که عملکرد ژن‌های سرکوبگر تومور را کاهش داده و باعث تشکیل انکوژن‌ها از پروتوانکوژن‌ها، یا آسیب دیدن سیستم ترمیم کننده DNA می‌شوند. همانطور که بحث‌های قبلی نیز نشان می‌دهند، ایجاد دگرگونی در DNA که منجر به نقص عملکردی پروتئین‌های سرکوبگر تومور و انکوپروتئین‌ها می‌شود، علت اصلی بروز اکثر سرطان‌هاست. این جهش‌های انکوژنیک در ژن‌های کلیدی رشد و ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی، مسبب بروز اکثر سرطان‌هاست. این جهش‌های انکوژنیک در ژن‌های کلیدی رشد و ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی، شامل دخول‌ها، حذف‌ها و جانشینی‌های اساسی است که همانند تزایدها و تبادلات کروموزومی عمل می‌کنند. به علاوه، آسیب ژن‌های کارتاکر که سیستم‌های ترمیم کننده DNA را درگیر می‌کند (فصل ۴) منجر به افزایش سرعت جهش می‌شود. وقتی که تعداد زیادی جهش تجمع یابد، برخی بر تنظیم کننده‌های چرخه سلولی اثر گذاشته و سلول‌هایی که دچار این وضعیت شده‌اند، ممکن است سرطانی گردند. از این گذشته، برخی از مکانیسم‌های ترمیم کننده DNA، خودشان مستعد خطا هستند (شکل ۴ـ۴۰). این «ترمیم‌ها» نیز در پدیده انکوژنز شرکت می‌کنند. ناتوانی سلول‌های توموری برای حفظ تمامیت ژنومی، منجر به تشکیل یک جمعیت هتروژن از سلول‌های بدخیم می‌شود. به این علت، شیمی‌درمانی برای یک ژن واحد یا حتی گروهی از ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد که احتمال از بین رفتن تمام سلول‌های بدخیم فراهم شود. این مشکل نیز به مباحث بحث برانگیز درمان‌ها اضافه می‌شود که بتواند با منبع تغذیه‌ای خونی تومورها تداخل کرده و یا استفاده از روش‌های دیگری که بتواند چندین نوع سلول توموری را درگیر کند و از بین ببرد.

سلول‌های بنیادی (فصل ۲۱)، با قابلیت آنها در انجام تقسیمات بیشمار سلولی، یک منبع غنی از سلول‌های سرطانی است. سلول‌هایی که به طور نرمال تقسیم می‌شوند معمولاً از چندین مکانیسم برای پیشگیری از جهش‌های زیان‌آوری که می‌توانند منجر به سرطان شوند جلوگیری می‌کنند. یکی از اشکال حفاظت علیه جهش‌ها در سلول‌های بنیادی، سرعت نسبتاً پائین آنها در تقسیم شدن است که امکان آسیب DNA را در طی همانندسازی DNA و میتوز کاهش می‌دهد. با این حال، پیش‌ساز سلول‌های بنیادی قابلیت تقسیم شدن را به طور نامحدود ندارند. پس از چند دوره تقسیم شدن، این سلول‌ها از چرخه سلولی خارج شده و امکان از بین رفتن تنظیم چرخه سلولی که توسط جهش القا شده و با ایجاد تومورهای خطرناک مرتبط است را کاهش می‌دهد. همچنین، اگر چندین جهش که برای رشد تومور، به دست آوردن یک منبع مغذی خونی، تهاجم به بافت‌های مجاور و متاستاز مورد نیازند رخ دهد، در صورتی که سرعت پائین همانندسازی با سرعت کم و عادی بروز جهش‌ها (10^{-9}) همراه شود، سپر حفاظتی بیشتری علیه سرطان فراهم می‌کند. این حفاظت‌ها در صورت رسیدن یک جهش‌زای قوی به سلول‌ها، یا در صورت نقص ترمیم DNA از میان برداشته شده و سرعت جهش افزایش می‌یابد. زمانی که سلول‌های دارای خصوصیات رشد شبیه سلول بنیادی توسط سموم محیطی جهش می‌یابند دیگر قادر به ترمیم کارآمد آسیب نخواهند بود و سرطان می‌تواند اتفاق افتد.

در این بخش، مسیرهایی که طی آنها کارسینوژن‌های مختلف روی DNA اثر کرده و سبب القاء سرطان می‌شوند را شرح می‌دهیم. در ضمن توضیح می‌دهیم که چگونه بروز جهش‌ها در ژن‌های کارتاکر، توسط از بین بردن قابلیت سلول‌ها در ترمیم آسیب‌های وارده به DNA، منجر به سرطان می‌شوند. در انتهای این بخش در مورد آنزیم‌های خاصی که تلومراز نام دارند صحبت می‌کنیم که یکی دیگر از محافظان ژنومی بوده و از آن در برابر آسیب DNA حفاظت می‌کند در انتها به شرح نقش تلومراز در سلول‌های سرطانی می‌پردازیم.

کارسینون‌ها توسط آسیب رساندن به DNA، سرطان را القاء می‌کنند.

توانایی کارسینوژن‌های فیزیکی و شیمیایی برای القاء سرطان در نتیجه ایجاد آسیب در DNA است که به صورت خطاهایی در طی تلاش سلول‌ها برای ترمیم این آسیب، شروع می‌شوند. بنابراین کارسینوژن‌ها هم **جهش‌زا** هستند. یکی از مدارک قوی در ارتباط با این که کارسینوژن‌ها می‌توانند همانند جهش‌زاها عمل کنند، توسط مشاهداتی حاصل شد که طی آن DNAی سلولی توسط در معرض قرارگرفتن سلول‌ها در برابر کارسینوژن‌ها تغییر کرده و توانست سلول‌های کشت داده شده از جمله سلول‌های 3T3 یا سلول‌های کشت داده شده در موش را تغییر دهد و سلول‌های شبه سرطانی با رشد سریع ایجاد کند (شکل ۲۵.۶). اثر جهش‌زایی کارسینوژن‌ها به طور کلی متناسب با توانایی آنها برای تغییر سلول‌ها و القاء سرطان در مدل‌های حیوانی است.

اگر چه موادی که به عنوان کارسینوژن‌های شیمیایی معرفی شده‌اند، دارای دامنه وسیع از ساختارهایی هستند که مرزبندی کامل و شناخته شده‌ای ندارد، اما آنها را می‌توان در دو دسته اصلی طبقه‌بندی کرد. کارسینوژن‌های با فعالیت مستقیم که دارای اعضاء کمی است و اکثراً شامل الکتروفیل‌های واکشنگر است (ترکیباتی که جویای الکترون هستند و با مراکز غنی از الکترون در سایر ترکیبات واکنش می‌دهند). این ترکیبات، توسط واکنش شیمیایی با اتم‌های نیتروژن و اکسیژن موجود در DNA می‌توانند بازهای DNA را تغییر داده و الگوی عادی جفت شدن بازها را مختل کنند. اگر این نوکلئوتیدهای تغییریافته ترمیم نشوند می‌توانند به صورت یک نوکلئوتید نادرست در طی همانندسازی وارد ساختمان DNA شوند. این نوع از کارسینوژن‌ها شامل اتیل متان سولفونات (EMS)، دی متیل سولفات (DMS) و خردل‌های نیتروژن می‌باشند.

برعکس، کارسینوژن‌های با فعالیت غیرمستقیم عموماً غیرواکنشگرند و اغلب ترکیباتی هستند که در آب غیرقابل حل بوده و تنها زمانی می‌توانند به صورت القاگران مهم سرطان عمل کنند که به صورت مراکز الکتروفیلیک در آیند. در حیوانات، آنزیم‌های سیتوکروم P450 در شبکه آندوپلاسمی اکثر سلول‌ها و علی‌الخصوص در مقادیر بالا در سلول‌های کبدی وجود دارند. آنزیم‌های P450 در حالت عادی با اضافه کردن مراکز الکتروفیل از قبیل گروه‌های OH به مواد شیمیایی خارجی غیرقطبی مثل حشره‌کش‌های خاص و داروهای درمانی، سبب افزایش حلالیت آنها و توانایی بدن در دفع آنها می‌شود. به این ترتیب، آنزیم‌های P450 می‌توانند سبب تبدیل مواد شیمیایی مضر به کارسینوژن‌ها شوند. در حقیقت، اکثر کارسینوژن‌های شیمیایی تا زمانی که توسط آنزیم‌های سلولی تغییر نیافته باشند دارای اثرات جهش‌زایی کمی هستند.

برخی از کارسینوژن‌ها به سرطان‌های خاصی مرتبط هستند.

در روزهای اولیه آگاهی از سرطان، می‌توان روشن نمود که دست کم برخی از سرطان‌ها در نتیجه سموم محیطی ایجاد شده‌اند. به عنوان مثال در سال ۱۷۷۵ گزارش شد که استفاده از بخاری پاک‌کن برای زدودن دوده‌ها، سبب سرطان بیضه می‌شود و در سال ۱۷۹۱ گزارش شد که استفاده از فتیله با سرطان بینی مرتبط است. مواد شیمیایی محیطی و ارتباط آنها با سرطان توسط مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته بر حیوانات حاصل شد. آزمایش‌ها کلاسیک شامل تزریق یک ماده به موش و جستجوی توسعه تومورهای موضعی و سیستمیک در حیوان می‌باشد. انجام چنین بررسی‌هایی منجر به تخلیص یک ماده شیمیایی کارسینوژن از قطران زغال سنگ در سال ۱۹۳۳ شد که بنزو (α) پیرن نام داشت. نقش تشعشعات در آسیب رساندن به کروموزوم‌ها، ابتدا در سال ۱۹۲۰ و با بکارگیری اشعه x بر روی دروزوفیلا مشخص گردید. توانایی تشعشعات برای ایجاد سرطان در انسان، خصوصاً لوکمیا، بعدها توسط افزایش سرعت ابتلا به لوکمی در میان بازماندگان جنگ جهانی دوم که تحت بمب‌های اتمی قرار گرفته بودند مشخص شد و اخیراً توسط افزایش ملانوما (سرطان پوست) در افرادی که به میزان بیشتری در معرض نور خورشید (تشعشعات UV) قرار گرفته‌اند مشخص گردیده است.

اگرچه اعتقاد بر اینست که کارسینوژن‌های شیمیایی به عنوان ریسک فاکتورهای ابتلا به اکثر سرطان‌های انسانی هستند، اما یک ارتباط مستقیم بین سرطان‌های خاص و آنها تنها در تعداد کمی از موارد به چشم می‌خورد که این موارد که مهم‌ترین آنها سرطان ریه

▲ **شکل ۲۷ـ۲۵ کارسینوژن‌های شیمیایی حاصل از مصرف توتون.** مصرف سیگار یک مثال روشن از شکل کشنده کارسینوژن‌های شیمیایی فراهم می‌کند. سرعت ابتلا به سرطان ریه به دنبال سرعت مصرف سیگار، در حدود ۳۰ سال تأخیر دارد. کشیدن سیگار میان جمیع کثیری از زنان، از سال ۱۹۶۰ شروع شد و در سال ۱۹۹۰ شیوع سرطان پستان در میان زنان افزایش یافت و تبدیل به یک سرطان کشنده در آنها گردید. در همان زمان، یک کاهش تدریجی در سرعت مصرف سیگار در مردان مشاهده می‌شود که از سال ۱۹۶۰ شروع شد و بازتاب آن کاهش سرعت ابتلا به سرطان ریه در آنان بوده است.

است شامل سرطان‌های دیگر از جمله حنجره، حلق، معده، کبد، پانکراس، مثانه، سرویکس و سایرین و ارتباط آنها با سیگارکشیدن است. مطالعات اپیدمیولوژیکی (شکل ۲۷ـ۲۵)، در ابتدا نشان داد که کشیدن سیگار مهمترین دلیل ابتلاء به سرطان ریه است، اما دلایل آن تا زمانیکه کشف گردید که حدود ۶۰٪ از سرطان‌های ریه انسان دارای جهش‌های غیرفعال کننده در ژن p53 هستند، نامشخص بود. بنزو (a) پیرن شیمیایی که در قطران زغال سنگ وجود دارد در دود سیگار نیز وجود داشته که تحت فعال شدن متابولیک در ریه (شکل ۲۸ـ۲۵) به یک جهش‌زای مهم تبدیل می‌شود که این جهش‌زا اکثراً سبب تبدیل باز گوانین (G) به تیمین (T) طی یک **جهش تبدیلی**[1] می‌شود. زمانی که سلول‌های اپیتلیومی برونش‌ها در محیط کشت در معرض بنزو (α) پیرن قرار گیرند، این ماده فعال شده و سبب ایجاد جهش‌های زیادی می‌شود که شامل جهش‌های غیرفعال کننده در کدون‌های ۱۷۵، ۲۴۸ و ۲۷۳ در ژن p53 است. این موقعیت‌های مشابه، در میان تمام دُمین‌های پروتئین‌های متصل شونده به DNA یکی از نقاط داغ جهشی اصلی در سرطان ریه انسان است. در حقیقت ماهیت جهش‌هایی که در p53 (و سایر ژن‌های مرتبط به سرطان) رخ می‌دهد، سرنخ‌هایی از منشا سرطان به دست ما خواهد داد. به عنوان مثال تبدیل G به T که توسط بنزو (α) پیرن ایجاد می‌شود، در ژن p53 حدود یک سوم تومورهای ریه افراد سیگاری ایجاد می‌شود.

این نوع جهش در میان جهش‌های p53 که در سایر انواع تومورها ایجاد می‌شود، نسبتاً نادر است. بنابراین، یک ارتباط قوی میان کارسینوژن شیمیایی مشخص شده در دود سیگار و سرطان انسان وجود دارد. این احتمال وجود دارد که سایر مواد شیمیایی در دود سیگار، جهش‌هایی را در سایر ژن‌ها ایجاد کنند، تا آنجایی که حدود بیش از ۶۰ کارسینوژن را در دود سیگار معرفی کرده‌اند. به طور مشابه، **آزبستوز**[2] به طور واضحی با **مزوتلیوما**[3] که یک نوع سرطان اپی‌تلیوم است ارتباط دارد.

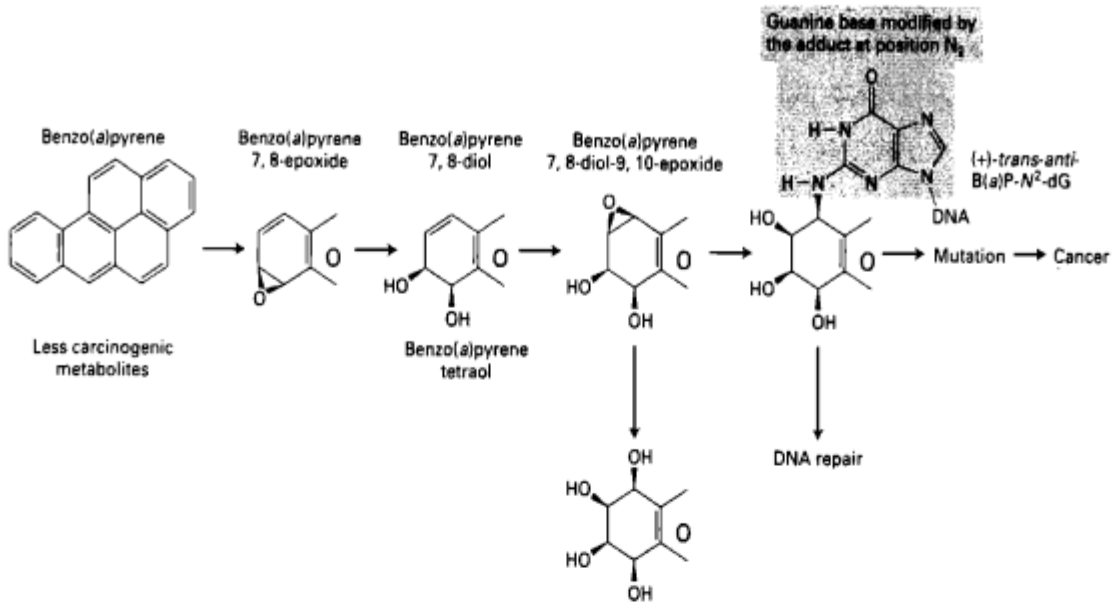
سرطان ریه تنها سرطان مهم انسانی نیست که برای آن یک ریسک فاکتور واضح (منظور، سیگار) مشخص شده است. آفلاتوکسین، یک متابولیت قارچی که در غلات کپک زده وجود دارد، سبب القاء سرطان کبد می‌شود (شکل ۲۵ـ۲۹). پس از انجام تغییرات شیمیایی توسط آنزیم‌های کبدی روی افلاتوکسین، این ماده به ریشه‌های G در DNA متصل شده و سبب تبدیل G به T می‌شود. آفلاتوکسین، همچنین سبب ایجاد جهش در ژن p53 می‌شود. از این گذشته، گوشتی که در دمای بالا پخته شده باشد، سبب واکنش‌های شیمیایی در بدن می‌شود که منجر به تولید آمین‌های حلقوی (HCAs) شده که این ترکیبات جزو جهش‌زاهای قوی هستند و سبب ایجاد کارسینوماهای کولون و پستان در مدل‌های حیوانی می‌شوند. HCAها با بازهای دئوکسی‌گوانوزین واکنش داده و اداکت‌های جهش‌زا را تشکیل می‌دهند (شکل ۲۵ـ۲۹b). قرارگیری در معرض مواد شیمیایی نیز با سرطان‌های خفیف هم ارتباط دارند. شواهد قوی در مورد نوع رژیم غذایی و فاکتورهای ریسک محیطی که بتواند به ما در پیشگیری از سرطان‌های شایع کمک کند (مثل سرطان پستان و کولون و پروستات و لوکمیاها) در دسترس نیستند.

از بین رفتن سیستم‌های ترمیم کننده DNA می‌تواند منجر به سرطان شود.

حتی بدون وجود کارسینوژن یا جهش‌زاهای خارجی، فرایندهای معمول نیز سبب ایجاد مقادیر زیادی از آسیب‌های DNA می‌شوند.

1- Transversion mutation

2- Asbestos 3- Mesothelioma

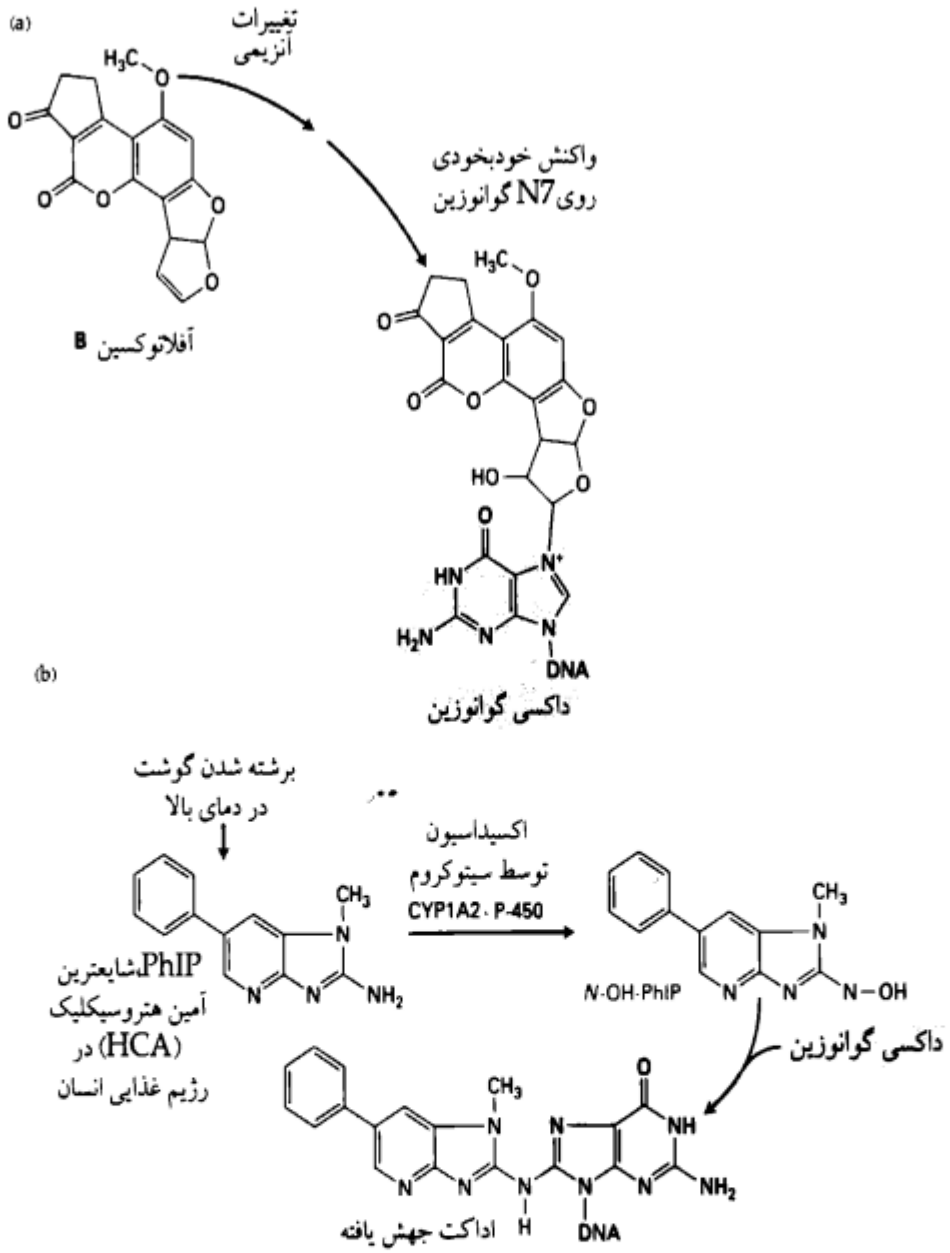


▲ **شکل ۲۸ـ۲۵ فرایندهای آنزیمی تبدیل بنزو (α) پیرن به یک ترکیب بسیار مهم جهش‌زا و کارسینوژن.** آنزیم‌های کبد، خصوصاً آنزیم‌های P-450، بنزو (α) پیرن را توسط یک سری از واکنش‌ها به مواد دیگری تبدیل می‌کنند و ۷ و ۸ دیول ـ ۹، ۱۰ ـ اپوکسید تولید می‌کنند که یک نوع جهش‌زای بسیار مهم بوده و با DNA در محل اتم N2 یک باز گوانین واکنش می‌دهد. در نتیجه آداکت (+) ـ ترانس ـ آنتی ـ $B(\alpha)P - N^2$ ـ تولید می‌کند که سبب می‌شود پلیمراز به جای واردکردن C در مقابل این G تغییر یافته، باز A را وارد کند. دفعهٔ بعد که DNA همانندسازی می‌کند، یک T در مقابل A قرار می‌گیرد و به این ترتیب جهش کامل می‌شود. فلش‌های افقی نشاندهنده تغییرات به سمت ایجاد مواد با ظرفیت بیشتر در سمیت است در حالی که فلش‌های عمودی نشان دهنده تغییرات در جهت کاهش سمیت است. علامت O بزرگ اشاره به باقیمانده ساختمان چندحلقه‌ای نشان داده شده در ملکول کامل بنزو و (α) پیرن در سمت چپ است.

آسیب‌ها در نتیجه واکنش‌های دپوریناسیون، واکنش‌های آلکیلاسیون و تولید گونه‌های واکنشگر از قبیل رادیکال‌های اکسیژن ایجاد می‌شوند که همگی این موارد می‌توانند DNA را تغییر دهند. تخمین زده شده است که در هر سلول، بیش از ۲۰۰۰۰ تغییر در DNA در هر روز فقط به دلیل تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر و دپوریناسیون ایجاد می‌گردد. بنابراین سیستم ترمیم کننده DNA یک سیستم دفاعی حیاتی و پراهمیت است.

نقش معمول ژن‌های کارتاکر، پیشگیری از آسیب DNA یا ترمیم آن است. از دست رفتن سیستم‌های ترمیم کننده DNA با صحت بالا که در فصل ۴ شرح داده شد، با افزایش ریسک ابتلا به سرطان مرتبط است. به عنوان مثال، انسان‌هایی که جهش‌هایی را در ژن‌های کدکننده یک پروتئین حیاتی در ترمیم عدم تطابق یا ترمیم حذف به ارث می‌برند، احتمال ابتلا به سرطان‌های خاصی در آنها به میزان خیلی زیاد بالا می‌رود (جدول ۲ـ۲۵). بدون ترمیم درست DNA، افرادی که دارای بیماری گزرودرماپیگمنتوزوم (XP) یا سرطان کلورکتال غیرپولیپی ارثی (HNPCC) هستند، استعداد تجمع جهش‌ها در سایر ژن‌هایشان که در کنترل رشد سلول و تکثیر آن اهمیت دارند، نیز بیشتر است. XP باعث ایجاد سرطان پوست با سرعتی حدود هزار بار بیشتر از حالت عادی در افراد می‌شود. هفت عدد از هشت ژن شناخته شده در ژن‌های XP، کدکننده اجزاء ماشین ترمیم کننده حذف هستند که در غیاب این مکانیسم ترمیمی، ژن‌های کنترل کننده چرخه سلولی یا ژن‌های تنظیم کننده رشد و مرگ سلول، جهش می‌یابند. ژن‌های HNPCC کدکننده اجزاء سیستم ترمیم عدم تطابق هستند و بروز جهش‌هایی در آنها، سبب بروز درصد کمی از موارد سرطان کولون می‌شود. در این حالت تبدیل پولیپ‌های خوش‌خیم به تومورهای full-fledged در طی پدیده پیشرفت سرطان، نسبت به حالت معمول سریع‌تر صورت می‌گیرد که احتمالاً علت آن قرارگرفتن سلول‌های مولد سرطان در معرض جهش‌های عدم تطابق مداوم بدون ترمیم آنهاست.

یک ژن در سرطان‌های کولون، به دلیل ترمیم نشدن عدم تطابق در ژن کدکننده تیپ TGFβ II، بارها و بارها جهش می‌یابد (شکل ۲۴ـ۲۵ و فصل ۱۶). ژن‌های کدکننده این گیرنده‌ها حاوی یک



▲ **شکل ۲۹ـ۲۵ (شکل رنگی) نحوه عملکرد دو کارسینوژن شیمیایی.** (a) همانند تمام کارسینوژن‌های با فعالیت مستقیم، افلاتوکسین نیز، اغلب پیش از آن که بتواند با DNA برهمکنش کند، توسط آنزیم‌های کاتالیز کننده تغییرات در آن، دچار دگرگونی می‌شود. پیوند دوگانه آفلاتوکسین که به صورت رنگی نشان داده شده، با اتم اکسیژن واکنش داده و آن را قادر به واکنش شیمیایی با اتم N-7 در گوانین DNA می‌کند و بدین ترتیب یک مولکول بسیار حجیم تشکیل می‌شود که DNA پلیمراز را وادار به واردکردن یک A به جای C در مقابل بازتغییر یافته G در طی همانندسازی DNA می‌کند. این ترکیب در ژن سرکوبگر تومور p53 جهش ایجاد می‌کند و سبب تبدیل G به T می‌گردد و به این ترتیب به عنوان یک فاکتور ریسک سرطان انسان محسوب می‌شود. (b) واکنش‌های شیمیایی که در اثر خوردن غذاهای سرخ شده در دمای بالا خصوصاً گوشت قرمز در انسان ایجاد می‌شود، حدود شانزده نوع مختلف از آمین‌های هتروسیکلیک (HCA) تولید می‌کند که از پیش‌سازهای کراتین و اسیدهای آمینه تولید می‌شوند. HCA نشان داده شده در اینجا، PhIP است که یکی از شایع‌ترین انواع موجود در رژیم غذایی انسان است. آنزیم‌های سیتوکروم P450 این ترکیب را تغییر داده و به یک شکل بسیار واکنشگر شیمیایی تبدیل می‌کنند که با بازگوانین در DNA واکنش داده و اداکتی در DNA ایجاد می‌کند که جهش‌زا است. PhIP سبب کارسینومای پستان و کلون در جوندگان می‌شود و ممکن است در سرطان پروستات انسان هم نقش داشته باشد. اگرچه تغییرات ناشی از P450 به طور اساسی در سلول‌های کبدی رخ‌می‌دهد، اما HCAها می‌توانند به سایر بافت‌ها مهاجرت کنند.

جدول ۲-۲۵. برخی از بیماری‌های ارثی و سرطان‌های انسانی مرتبط با نقص در ترمیم DNA.

بیماری	سیستم ترمیم - DNA معیوب شده	حساسیت	استعداد ابتلا به سرطان خاص	نشانه‌ها
جلوگیری از جهش‌های نقطه‌ای، دخول‌ها و حذف‌ها				
سرطان کلورکتال غیرپولیپی ارثی	ترمیم عدم تطابق DNA	تشعشعات UV، جهش‌زاهای شیمیایی	کولون و تخمدان	توسعه زودرس تومورها
گزرودرما پیگمنتوزوم	ترمیم حذف نوکلئوتیدی	تشعشعات UV، جهش‌های نقطه‌ای	کارسینومای پوست، ملانوزوماها	حساسیت پوست و چشم و شاخی شدن آنها
ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای				
سندرم بلوم	ترمیم شکست‌های دورشته‌ای توسط نوترکیبی همولوگ	عوامل آلکیله کننده	کارسینوماها، لوکمیاها، لنفوماها	حساسیت به نور، تلانجکتزیا، تغییرات کروموزومی
آنمی فانکونی	ترمیم شکست‌های دورشته‌ای توسط نوترکیبی همولوگ	عوامل اتصال دهنده عرضی DNA، اکسیدان‌های شیمیایی واکنشگر	لوکمی میلوئید حاد، کارسینومای سلول اسکوآموس	ناهنجاری‌های تکاملی شامل عقیمی و بدشکلی‌های اسکلتی، آنمی
سرطان ارثی پستان، نقص BRCA-1 و BRCA-2	ترمیم شکست‌های دورشته‌ای توسط نوترکیبی همولوگ		سرطان پستان و تخمدان	سرطان پستان و تخمدان

توالی ۱۰ آدنینی در یک ردیف هستند. به دلیل «**رهاشدن**»[1] DNA پلیمراز در طی همانندسازی، این توالی اغلب تحت تأثیر جهش‌هایی قرار می‌گیرد که ماحصل آنها، ایجاد توالی با حدود ۹ یا ۱۱ آدنین است. اگر این جهش‌ها توسط سیستم ترمیم عدم تطابق، ترمیم نشوند، نتیجه آن تغییر چارچوب توالی کدکننده پروتئین و تولید نشدن پروتئین گیرنده نرمال است. همان طور که قبلاً ذکر کردیم، چنین جهش‌های غیرفعال کننده‌ای سبب می‌شوند که سلول‌ها نسبت به مهار رشد توسط TGFβ مقاوم شده و رشد آنها به صورت تنظیم نشده صورت گیرد که این یکی از خصوصیات این تومورهاست. این یافته‌ها اهمیت ترمیم عدم تطابق را در تصحیح آسیب ژنتیکی تصدیق می‌کنند که امکان دارد از طرف دیگر منجر به تکثیر کنترل نشده سلول گردد.

تمامی مکانیسم‌های ترمیم DNA از خانواده‌ای از DNA پلیمرازها برای تصحیح آسیب DNA استفاده می‌کنند. ۹ عدد از این پلیمرازها که یکی DNA پلیمراز β نام دارد دارای قابلیت استفاده از قالب‌هایی که حاوی اداکت‌های DNA و سایر مواد شیمیایی تغییر یافته و حتی بازهای حذف شده‌اند می‌باشد. هر کدام از اعضای این خانواده پلیمرازی، دارای قابلیت‌های مجزایی برای ترمیم نوع خاصی از خسارات وارد شده به DNA هستند. احتمالاً چنین پلی‌مرازهایی وجودشان لازم است زیرا اغلب، انجام هر ترمیم بهتر از انجام نشدن آن است. این پلیمرازها به عنوان آخرین تدابیر استفاده می‌شوند و زمانی به کار گرفته می‌شوند که پلیمرازهای دقیق‌تر و معمول‌تر قادر به انجام تصحیح نباشند و در این هنگام این پلیمرازها، یک فرایند همانندسازی جهش‌زا را به انجام می‌رسانند. DNA Ploβ دارای قابلیت غلط‌گیری[2] نبوده و در تومورهای مشخصی، به میزان زیاد تولید می‌شود که شاید علت آن اینست که سلول‌هایی که در معرض جهش‌های افزاینده رشد قرار گرفته‌اند برای تقسیم شدن در دفعات زیاد نیاز به مقادیر بالای این پلیمراز دارند. به نظر می‌رسد که سیستم‌های ترمیمی مستعد خطا، اکثر (و نه همه) اثرات کارسینوژنیک مواد شیمیایی و تشعشعات را وساطت می‌کنند زیرا تنها پس از عمل آنهاست که جهش‌های توارثی ایجاد می‌شوند. شواهد رو به رشدی وجود دارند که بیانگر ارتباط جهش‌های صورت گرفته در DNA Polβ با تومورها هستند. زمانی که ۱۸۹ تومور مورد بررسی قرار گرفتند، ۵۸ تای آنها دارای جهش‌هایی در ژن DNA Polβ

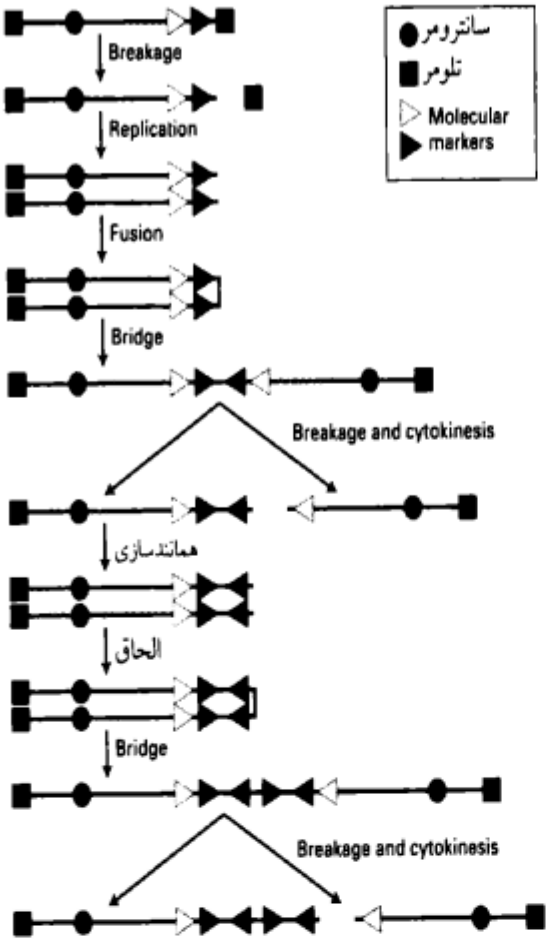
1- Slippage 2- Proofreading

بودند و اغلب این جهش‌ها نه تنها در بافت سالم همان بیمار و بلکه در اسپکتروم نرمال جهش‌های یافت شده در افراد مختلف نیز دیده شد. بیان دو فرم جهش یافته پلیمراز در سلول‌های موشی، سبب رشد آنها با ظاهری تغییر یافته می‌شود که کانون تشکیل و تکیه‌گاه آنها به صورت مستقل از هم است.

شکست‌های دورشته‌ای خصوصاً آسیب‌هایی که به دلیل اتصال نادرست رشته‌های دوتایی DNA ایجاد می‌شوند می‌تواند منجر به بازآرائی‌های کروموزومی عمده و تبادلات کروموزومی شود که از جمله آنها می‌توان به آنهایی که سبب تولید یک ژن دورگه شوند و یا اینکه یک ژن تنظیم‌کننده رشد تحت کنترل یک پروموتر قرار می‌گیرد نام برد. غالباً برای ترمیم چنین آسیب‌هایی، نیاز به استفاده از کروموزوم همولوگ به عنوان راهنمای سنتز رشتهٔ آسیب دیده می‌باشد (فصل ۴). سلول‌های B و T سیستم ایمنی به طور ویژه نسبت به بازآرایی‌های DNA به دلیل شکست‌های دورشته‌ای مستعد هستند که این شکست‌ها در طی بازآرایی ژن‌های گیرنده سلول T یا ایمنوگلوبولین آنها به وجود می‌آید که این امر، علت وجود این ناحیه ژنی در لوکمیاها و لنفوماها با تکرار زیاد را شرح می‌دهد. ژن‌های BRCA-1 و BRCA-2 که در سرطان‌های پستان و تخمدان انسان آسیب می‌بینند، کدکننده ترکیبات مهم سیستم‌های ترمیم کننده شکست DNA هستند. سلول‌هایی که فاقد یک BRCA فعال هستند، قادر به ترمیم DNA در جائی که کروموزم همولوگ، قالب ترمیم رشته آسیب دیده را فراهم کرده، نیستند.

بیان تلومراز سبب جاودانگی سلول‌های سرطانی می‌شود.

تلومرها[1]، انتهای فیزیکی کروموزوم‌های خطی هستند که حاوی آرایش‌های سر به دم یک توالی کوتاه از DNA هستند که این توالی در مهره‌داران TTAGGG می‌باشد. تلومرها، راه‌حلی برای مشکل همانندسازی انتهای کروموزوم‌ها فراهم می‌کنند، DNA پلیمرازها قادر به همانندسازی کامل انتهای یک مولکول دورشته‌ای DNA نیستند (فصل ۶). تلومراز یک ترانس کریپتاز معکوس است که دارای یک قالب RNA بوده و به طور مدام تکرارهای TTAGGG را به انتهای کروموزوم اضافه کرده و طول آن را در حدود نواحی ۲۰kb گسترش می‌دهد. این نواحی تکرارهایی هستند که انتهای کروموزم‌های انسانی را می‌سازند (شکل ۴۹ـ۶). سلول‌های جنینی، سلول‌های لایه زایا، و سلول‌های بنیادی، تلومراز را تولید می‌کنند اما



▲ **شکل ۳۰ـ۲۵ اتصال کروموزومی و آسیب ناشی از فقدان تلومرها.** نبودن یک تلومر در انتهای یک کروموزوم باعث انجام یک چرخه شکست ـ ادغام ـ پل زدن (B-F-B) می‌شود که در نهایت سبب بروز آسیب‌های مهم در ساختارهای کروموزومی می‌شود. از دست رفتن یک تلومر (توسط شکست یا در نتیجه نبودن تلومراز) به کروماتید امکان ادغام با کروماتید خواهرش در طی میتوز را می‌دهد. یک پل تشکیل می‌شود و زمانی که سانترومرها در طی آنافاز از هم جدا می‌شوند؛ دو کروماتید که به هم متصلند باید از هم جدا شوند و بشکنند. در هر سلول دختر، فقدان دوباره تلومرهای کروموزومی، سبب تکرار چرخه می‌شود. جایگاه‌های شکست معمولاً در حدود یک مگا باز تلومر است و هر سلول دختر یا دارای پایانه‌های حذف شده است و یا دارای ژن‌هایی است که پایانه‌های آن تزاید یافته است. تلومرها اغلب حتی در سلول‌های سرطانی که دارای تلومرهای فراوانند نیز از بین می‌روند، بنابراین چندین مکانیسم باید برای راه‌اندازی چرخه B-F-B وجود داشته باشد.

1- Telomeres

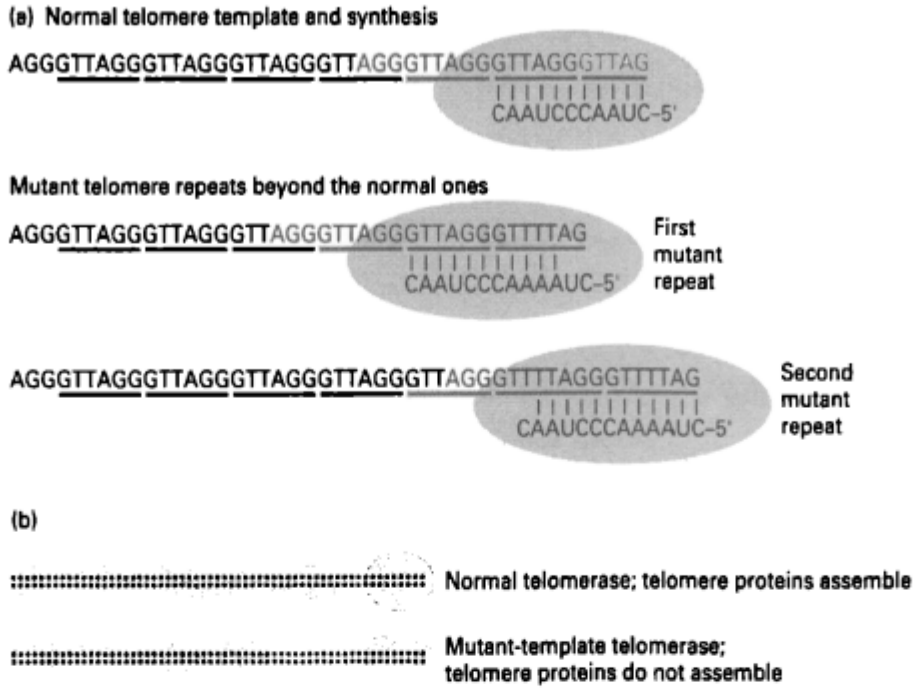
▲ **شکل ۳۱ـ۲۵ فقدان تلومرها در شرایط عادی، تعداد دورهای تقسیم سلولی را محدود می‌کند.** همانندسازی دو انتهای کروموزوم‌ها که تلومر نام دارد، نیازمند یک آنزیم به نام تلومراز است. تلومراز دارای یک قالب کوتاه RNA است که به عنوان قالب رهبر برای سازمانیابی تکرارهای TTAGGG در دو انتهای کروموزوم‌ها استفاده می‌شود. سلول‌های جنینی انسان دارای ۸ـ۱۰kb از این تکرارها در هر انتهای کروموزوم‌های خود هستند. به دلیل این که DNA پلیمراز نیازمند یک پرایمر است و در انتهای رشته رهبر چنین توالی وجود ندارد، بنابراین قادر به همانندسازی کامل DNA در دو انتهای آن نمی‌باشد (فصل ۶). تلومراز یک آنزیم ضروری است و در غیاب آن، کروموزوم‌ها در طی هر میتوز، کوتاه‌تر می‌شوند. تلومراز در سلول‌های بنیادی و سلول‌های لایه زایا وجود دارد که در این سلول‌ها برای حفظ طول تلومرها به آن نیاز است و اساساً به آنها اجازه می‌دهد که به طور نامحدود تقسیم یابند. در اکثر سلول‌های بدنی، تلومراز در مقادیر کم یا بسیار کم وجود دارد و طول تلومر در این سلول‌ها، تدریجاً و به طور متوالی کاهش می‌یابد. به این ترتیب طول تلومرها یک حدی را برای ظرفیت همانندسازی سلولی ایجاد می‌کند. فقدان کامل تکرارهای تلومری، منجر به راه‌اندازی سیستم‌های ترمیمی DNA و آپوپتوز می‌شود. سلول‌های سرطانی اغلب به تولید تلومراز می‌پردازند که به آنها امکان تقسیم شدن نامحدود و گریز از مرگ برنامه‌ریزی شده را می‌دهد.

اکثر سلول‌های بدنی انسان تنها یک سطح کمی از تلومراز را زمانی که به فاز S وارد می‌شوند تولید می‌کنند. در نتیجه عملکرد بسیار کم تلومرازها، تلومرها در طی هر چرخه سلولی کوتاه و کوتاه‌تر می‌شوند. فقدان کامل تلومرها منجر به اتصال انتها به انتهای کروموزوم‌ها (شکل ۳۰ـ۲۵) و سرانجام مرگ سلول می‌شود. کوتاه شدن وسیع تلومرها توسط سلول به عنوان یک نوع آسیب DNA تلقی شده و سبب پایداری و فعال شدن پروتئین p53 می‌شود که منجر به آپوپتوز القاء شده توسط p53 می‌شود. شکل ۳۱ـ۲۵ به طور خلاصه اثرات ناشی از تعداد مختلف تکرارهای تلومری را نشان می‌دهد.

اکثر سلول‌های تومورى، علیرغم سرعت بالای تکثیرشان، به دلیل تولید تلومراز، می‌توانند برای مدت زیادی زنده بمانند و تقسیم شوند. اکثر محققان معتقدند که بیان شدن تلومراز برای جاودانگی سلول توموری ضروری است و مهارکنندگان اختصاصی تلومراز را می‌توان در حکم عوامل درمانی سرطان محسوب کرد. تولید ترانس ژن‌های مولد تلومراز به داخل سلول‌های کشت داده شده انسانی که فاقد آنزیم هستند می‌تواند دوره حیات را ۲۰ برابر افزایش می‌دهد که این در حالی است که طول تلومر حفظ می‌شود. برعکس، تیمار سلول‌های تومور انسانی (سلول‌های هلا) در محیط کشت با RNA آنتی‌سنس بر علیه تلومراز سبب کاهش رشد آنها در حدود چهار هفته می‌شود. تلومرازهای غالب منفی از قبیل آنهایی که حاصل یک قالب RNA تغییر یافته‌اند، می‌توانند با رشد سلول‌های سرطانی تداخل کنند. به عنوان مثال، زمانی که چنین جهش‌یافته‌ای (شکل ۳۲ـ۲۵) در سلول‌های سرطانی پروستات یا پستان در محیط کشت بیان شود، سلول‌ها آپوپتوزی می‌شوند. به علاوه اگر سلول‌های تومور پستان انسان که حامل تلومراز جهش یافته‌اند، به موش تزریق شوند مشاهده می‌شود که با سرعت‌های پائین‌تری رشد می‌کنند.

برای پیش‌بینی ابتلا به نوروبلاستوما که یک تومور درگیر کننده سیستم اعصاب محیطی است، می‌توان سطح فعالیت تلومراز را در سلول‌های توموری اندازه‌گیری نمود. پیش‌بینی می‌شود که سطوح بالای تلومراز، به درمان پاسخ ضعیفی بدهند در حالی که سطوح پائین آن می‌تواند پاسخ خوبی بدهد. سطح پروتئین N-myc که یک فاکتور رونویسی تنظیم کننده بیان تلومراز است، نیز یک فاکتور پیش‌بینی کننده در بررسی نتایج این تومورهاست. تومورهایی که ژن N-myc در آنها تزاید یافته و دارای تعداد کپی‌های زیادی از این ژن می‌شوند پیش‌بینی می‌شود که وضعیت بدتری داشته باشد. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت شناخت مسیر سنتز و تنظیم تلومراز است.

مطالعات ژنتیکی درک ما را در مورد نقش تلومراز در سرطان به میزان زیادی بهبود بخشیده است. یافته‌های اولیه حاصل از حذف زیرواحد RNA در تلومراز موش‌هایی که در این صفت هموزیگوت بودند برای ما بسیار ارزشمند بود و نشان دهنده تغییرات شگفت‌انگیز در باروری این موش‌ها و زنده ماندن آنها



▲ **شکل تجربی ۳۲ـ۲۵ (شکل رنگی) تلومراز را می‌توان برای مهارکردن رشد سلول سرطانی استفاده نمود.** یک تلومراز مهندسی شده که حاوی یک قالب RNA معیوب (یک تلومراز با قالب جهش یافته) است را برای به منظور از بین بردن عملکرد معمول آنزیم به کار می‌گیریم. (a) بالا: تلومراز سالم (خاکستری) روی یک زنجیره DNA در انتهای یک تلومر نشان داده شده است. توالی که با آبی تیره نشان داده‌ایم، قالب RNA است که در تلومراز وجود دارد. توالی تلومریک عادی، یک سری از تکرارهای ۶ تایی GTTAGG (سبز) می‌باشد. سنتز در جهت راست پیشروی می‌کند. آخرین توالی تکراری اضافه شده با سبز کم‌رنگ مشخص شده است. پائین: تلومراز با قالب جهش یافته (صورتی) دارای یک قالب RNAی تغییریافته است که دو باز A اضافی دارد (قرمز). زمانی که DNA همانندسازی می‌کند، این تلومراز جهش یافته، اضافه شدن تکرارهای ۸ تایی با دو باز dT اضافی (قرمز) را کاتالیز می‌کند. دو دوره مقدماتی و سنتز نشان داده شده است. (b) تلومراز جهش یافته به صورت یک جهش بارز منفی عمل می‌کند زیرا پروتئین‌هایی که (زرد) به توالی‌های تلومری عادی می‌چسبند و از آن محافظت می‌کنند، قادر به سازمانیابی روی توالی‌های تلومری تغییر یافته که توسط آنزیم جهش‌یافته سنتز شده‌اند، نمی‌باشند. مرحله بعدی، ناپایدار کردن کروموزوم‌هاست که به دلیل حفاظت نشدن تلومرها، سلول نسبت به آسیب DNA حساس شده و دچار آپوپتوز می‌شود. زمانی که این آنزیم جهش یافته در سلول‌های سرطانی پستان انسان یا پروستات در محیط کشت بیان می‌شود، این آنزیم سبب مهار تقسیم سلولی و افزایش آپوپتوز می‌شود. این بررسی‌ها حتی با بکاربردن مقادیر پائین تلومراز جهش یافته باز هم مؤثر است.

داشت. با این حال پس از گذشت چهار تا شش نسل از آنها، معایب شروع به تظاهر کرد و موش‌های دارای تلومراز غیرفعال که دارای تلومرهای بسیار بلندی بودند (۴۰ـ۶۰kb)، کم‌کم به طور مشخصی طول آنها کوتاه‌تر شد. این معایب شامل کاهش سرعت تقسیم در بافت‌هایی که نیاز به سرعت‌های بالای تقسیم سلولی داشتند از جمله پوست و روده و عدم باروری بود.

اگر موش فاقد تلومراز فعال را با کارسینوژن‌ها تیمار کنیم، تومورها در آنها با سهولت بیشتری نسبت به موش سالم، ایجاد می‌گردد. به عنوان مثال، پاپیلومای پوستی که توسط ترکیبی از کارسینوژن‌های شیمیایی القاء می‌شود، در موش‌های فاقد تلومراز فعال با سرعتی حدود ۲۰ برابر کمتر از موش‌های سالم ایجاد می‌گردد که احتمالاً علت آن القاء آپوپتوز تحریک شده توسط p53 در پاسخ به هر بار کوتاه‌تر شدن تلومرهای سلولی طی هر بار تقسیم سلول‌های فاقد تلومراز فعال است.

با این حال، اگر هم تلومراز و هم p53 وجود نداشته باشند، سرعت رشد تومورهای اپی‌تلیومی از قبیل کارسینومای سلول اسکوآموس، سرطان کولون و پستان، افزایش می‌یابد. موش‌هایی که در یک APC جهش یافته‌اند، در حالت عادی دچار تومورهای کولون می‌شوند و این میزان ابتلا به تومور در صورت حذف تلومراز در آنها به مقدار زیادی کاهش خواهد یافت. در برخی دیگر از تومورها، فقدان تلومراز اثر کمتری روی آنها می‌گذارد. این مطالعات نشان دهنده لازمه وجود تلومراز برای تقسیم لجام گسیخته سلول است و بنابراین این آنزیم یک هدف ممکن برای شیمی درمانی است.

نکات کلیدی ۵-۲۵

کار سینوژن‌ها و ژن‌های کارتاگر در سرطان

■ تغییرات توالی DNA نتیجه همانندسازی غلط و اثرات عوامل شیمیایی و فیزیکی مختلف یا کارسنوژن هاست. تمامی کارسینوژن‌ها جهش زا هستند که آنها معمولاً یک یا تعداد بیشتری نوکلئوتید را در DNA تغییر می‌دهند.

■ قبل از عملکرد کارسینوژن‌ها در آسیب به DNA آنها باید به صورت غیرمستقیم فعال شوند. در حیوانات، فعال شدن متابولیکی با سیستم سیتوکروم P-450، مسیر ی که به طور عمده توسط سلول‌ها برای حذف سموم و مواد شیمیایی استفاده می‌شود صورت می‌گیرد. فعال شدن مستقیم کارسینوژن‌هایی مثل EMS و DMS به هیچ تغییر سلولی برای آسیب به DNA نیاز ندارد.

■ بنزو (α) پیرن، یک ترکیب موجود در دود سیگار، باعث غیرفعال شدن جهش‌ها در ژن p53 می‌شود که در شروع تومورهای ریهٔ انسانی مشارکت می‌کند.

■ ژن‌های کارتاگر آنزیم‌هایی را کد می‌کنند که در ترمیم DNA نقش دارند. به عبارت دیگر یکپارچگی کروموزوم‌ها را حفظ می‌کند یا مرگ سلول‌ها را به هنگام آسیب DNA تحریک می‌کند. جهش در ژن‌های کارتاگر اجازه حیات به سلول‌هایی را می‌دهند که باید بمیرند و جهش‌های مداومی از ژنوم را که می‌توانند منجر به آسیب کنترل چرخه سلولی و در نتیجه ایجاد سرطان شوند باعث می‌گردند.

■ نقص‌های ارثی در فرایندهای تعمیر DNA که در برخی از بیماریهای انسانی یافت شده است با افزایش وقوع برخی از سرطان‌ها همراه است (جدول ۲-۲۵ را ملاحظه کنید).

■ سلول‌های سرطانی مثل سلول‌های زایا و سلول‌های بنیادی ولی نه مثل اغلب سلول‌های تمایزیافته، تلومراز را تولید می‌کنند که از کوتاه شدن کروموزوم‌ها به هنگام همانندسازی DNA جلوگیری کرده و ممکن است در پایداری آنها شرکت کند. غیاب تلومراز با مقاومت به تولید برخی از تومورها همراه است که ناشی از پاسخهای حفاظتی p53 است.

چشم‌اندازی به آینده

پی بردن به این مطلب که سرطان اساساً یک بیماری ژنتیکی می‌باشد، افق‌های جدیدی را برای پیشگیری و درمان این بیماری به روی ما گشوده است. هم اکنون می‌توان کارسینوژن‌ها را به منظور مطالعه اثرات آنها روی مراحل شناخته شده کنترل کننده چرخه سلولی، مورد بررسی قرار داد. وجود معایب ژنتیکی در نقاط کنترل که مناطق آسیب دیده DNA را شناسایی می‌کنند و همچنین سیستم‌های ترمیم کننده آن را می‌توان به سهولت شناسایی نموده و از آن می‌توان مکانیسم‌های سرطان را توضیح داد. شناخت تغییرات چندگانه‌ای که اغلب در طی رشد یک سلول اتفاق می‌افتد و آن را به یک سلول توموری خطرناک تبدیل می‌کند فرصت‌های زیادی را برای کسب موفقیت در این زمینه فراهم نموده است. با معرفی ژن‌های جهش یافته‌ای که مستقیماً با سرطان‌ها ارتباط دارند و شناخت پروتئین‌های ناشی از آنها، می‌توان داروها را به طور مستقیم به سمت این پروتئین‌ها هدف‌گیری کرد.

توسط یافته‌های جدید به منظور نشان دادن تعداد زیادی از خصوصیات سلول‌ها، می‌توان داروهای مرسوم را به شکل دلخواه تغییر داد. روش‌های قدیمی برای تشخیص سلول‌های توموری، خصوصاً مشاهده سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ را می‌توان گسترش داد یا توسط تکنیک‌های اندازه‌گیری میزان بیان دهها هزار ژن جایگزین نمود که این روش‌ها به طور اختصاصی روی ژن‌هایی متمرکز می‌شود که فعالیت و خصوصیات آنها به عنوان یک نشانگر قدرتمند در شناسایی خصوصیات رشد سلول‌ها و مشخص نمودن افراد مبتلا به بیماری استفاده می‌شود. به طور معمول، ریزآرایه DNA برای ما امکان اندازه‌گیری میزان رونویسی ژن را فراهم کرده است. در آینده، تکنیک‌هایی که به طور سیستماتیک به اندازه‌گیری تولید پروتئین، تغییرات، قرارگیری آنها و تمام نکات مهم وضعیت سلول می‌پردازند، حتی به ما اطلاعات بیشتری از جزئیات ظریف سلولی ارائه خواهند داد. تومورهایی که امروزه بسیار شبیه و یکسان با هم به نظر می‌رسند، در آینده مشخص خواهد شد که به صورت تومورهای بسیار متفاوت از هم هستند و هر کدام نیاز به تیمارها و درمان‌هایی مجزا از سایرین دارند. بررسی‌هایی که سابقاً روی تومورها صورت می‌گرفت، براساس روشن نمودن بهتر ویژگی‌های سلول بوده و امکان ایجاد درمان‌های مناسب‌تر را فراهم می‌نمود. متمرکز کردن بررسی‌ها بر روی فرآیندهای مخربی از جمله متاستاز، ما را در تشخیص مکانیسم‌هایی که توسط سلول‌ها برای مهاجرت، چسبیدن به سایر سلول‌ها و تهاجم از آنها استفاده می‌کنند، یاری خواهد داد. با ادامه بررسی‌های صورت گرفته بر پدیده رگ‌زایی در تومورها می‌توان این امید را داشت که از این روش به عنوان

وسیله‌ای برای خاموش سازی تومورها استفاده نمود.

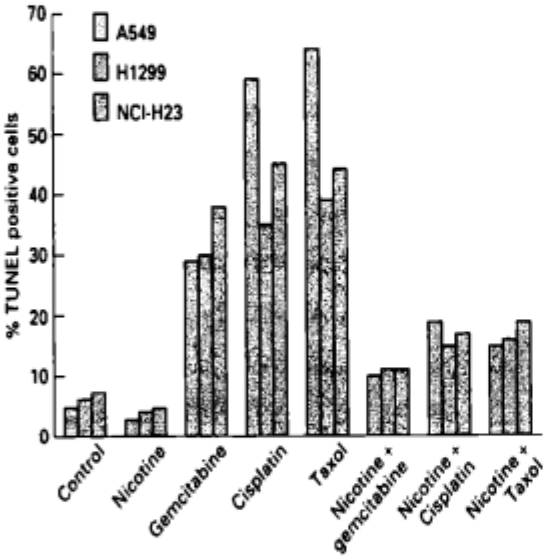
بررسی‌های زیست‌شناسی سلولی مولکولی روی سرطان، مسیر ایجاد درمان‌های جدید را هموار نموده است اما مانع از این می‌شود که این درمان‌ها به صورت قطعی و قابل ترجیح باقی بمانند. اجتناب از کارسینوژن‌ها، خصوصاً استعمال سیگار، می‌تواند به طور مشخصی، میزان ابتلا به سرطان ریه و احتمالاً سایر سرطان‌ها را کاهش دهد. علاوه بر روش‌هایی از قبیل کاهش در معرض قرارگرفتن کارسینوژن‌هایی از جمله دخانیات و نور خورشید، امروزه انجام بررسی‌های ویژه و اختصاصی امکان‌پذیر شده است. کسب اطلاعات جدید در مورد ویروس پاپیلومای انسانی ۱۶ که در اکثر سرطان‌های سرویکس وجود دارد، منجر به ایجاد یک واکسن سرطان گشت که توسط سازمان متحد غذا و دارو (FDA) تصویب شده و سبب جلوگیری از سه چهارم کل سرطان‌های سرویکس می‌شود. به کارگیری آنتی‌بادی‌ها بر علیه مارکرهای سطح سلولی که سلول‌های سرطانی را تشخیص می‌دهند به عنوان امیدی بزرگ است. خصوصاً پس از کسب نتایج موفقیت‌آمیز در استفاده کلینیکی آنتی‌بادی منوکلونال علیه گیرنده EGF2 انسانی (Her2) که پروتئینی است که در برخی از موارد سرطان پستان انسان دیده می‌شود. درک زیست‌شناسی سلولی سرطان یک قدم اولیه و مهم در جهت جلوگیری و مراقبت از سرطان است اما قدم‌های بعدی، بسیار مشکل هستند. موفقیت‌های کسب شده با گلیویک (ایماتینیب) بر علیه لوکمیا، استثنائی است؛ درمان اکثر سرطان‌ها یک روند بسیار مشکل است و با ایجاد تداخلات بسیار زیادی همراه است. از آنجائی که سرطان، کلمه‌ای است که دامنه بسیار وسیعی از بیماری‌ها را در برمی‌گیرد، درمان‌های موفقیت‌آمیزی که برای این نوع به کار می‌رود ممکن است برای سایرین کاربرد نداشته باشد. علیرغم وجود این حقایق ترساننده، ما هم اکنون در حال برداشت نتایج حاصل از سال‌ها تلاش محققانی هستیم که زیست‌شناسی مولکولی سلول را شرح داده‌اند. ما امیدواریم که اکثر خوانندگان این کتاب بتوانند در رفع موانع باقیمانده به ما کمک کنند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

استعمال سیگار یک ریسک فاکتور اصلی در ایجاد سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه[1] (NSCLC) است که حدود ۸۰ درصد از کل انواع سرطان‌های ریه را شامل می‌شود. نشانه‌های NSCLC، پیش‌آگهی ضعیف و مقاومت به شیمی درمانی است.

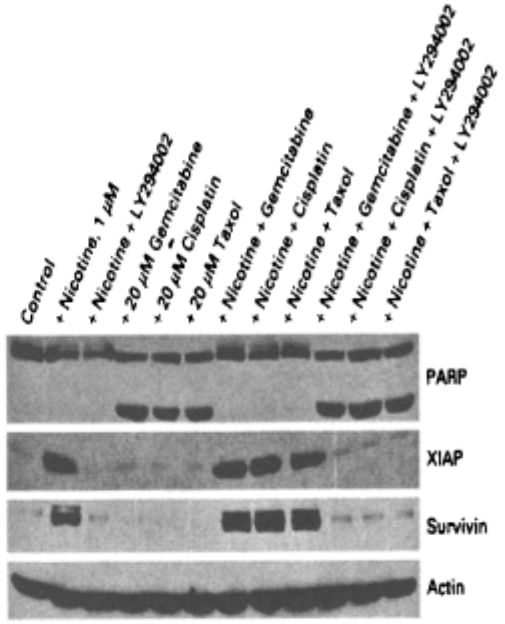
به منظور بررسی اثرات نیکوتین بر روی این مقاومت، دودمان‌های سلولی سرطان ریه را در حضور و عدم حضور نیکوتین با داروهای شیمی درمانی گمسیتابین، سیس‌پلاتین و تاکسول تیمار کردند.

a. سه دودمان سلولی مختلف از NSCLC، شامل A549، NCI-H23 و H1299، توسط بررسی‌های TUNEL مورد آزمایش قرار گرفتند که در این روش سلول‌هایی که تحت اثر آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) قرار می‌گیرند، مشخص می‌گردد. برخی سلول‌ها را در حضور یا عدم حضور نیکوتین با یکی از سه داروی شیمی درمانی تیمار کردند و برخی را تیمار نکردند. یافته‌های به دست آمده در نمودار پائین آورده شده است. چرا این داروها پتانسیل درمان سرطان ریه را دارند و چه دوزی از نیکوتین بر میزان مؤثربودن آنها اثر دارد؟



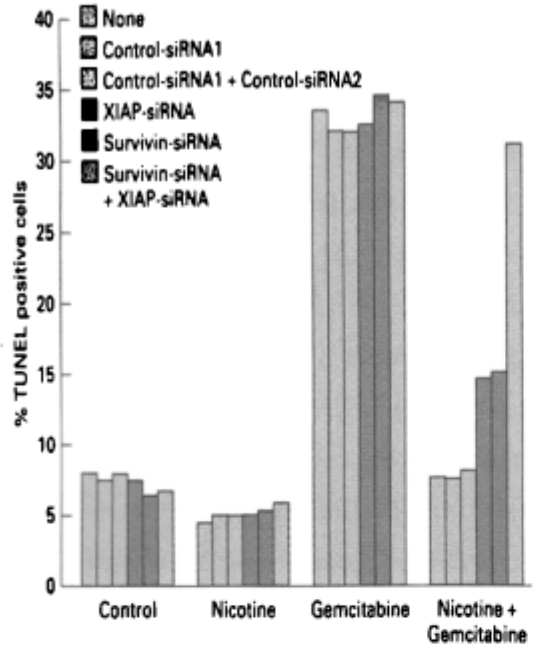
b. سلول‌های A549 را با داروهایی که در بخش a آورده شده است به همراه یک داروی اضافی به نام کامپتوتسین در حضور و عدم حضور نیکوتین انکوبه کرده‌ایم. سلول‌ها را لیز کرده و عصاره سلولی حاصل را بر روی ژل‌های SDS بارگیری کرده‌ایم و سپس ژل‌ها را خشک کرده و با آنتی بادی‌های علیه پروتئین‌های مشخص شده پروب‌گذاری می‌کنیم. PARP، پروتئینی است که در طی آپوپتوز شکسته می‌شود. چگونه می‌توان از این یافته‌های به دست آمده، اثرات نیکوتین را بررسی نمود؟ هدف از اندازه‌گیری مقادیر p53، p21 و اکتین چیست؟

1- Non-small

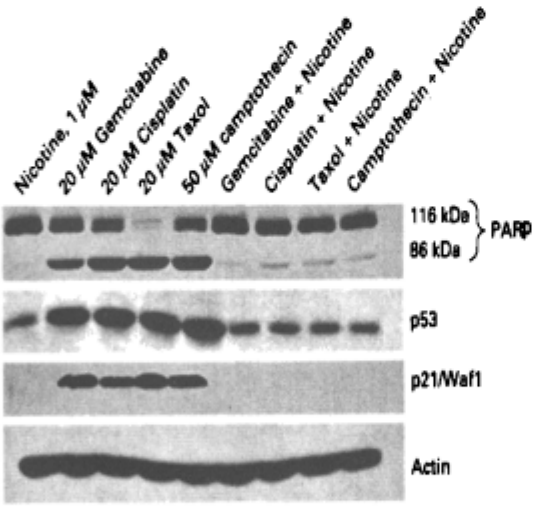


c. Survivin و XIAP هر دو، از اعضای خانواده مهارکنندگان آپوپتوز (IAP) بوده و پروتئین‌هایی هستند که از سلول‌ها در مقابل آپوپتوز محافظت می‌کنند. سلول‌های A549 را تحت تیمار با داروهای شیمی درمانی در حضور و غیاب نیکوتین، LY294002 و مهارکننده PI3 کیناز (به فصل ۱۶ مراجعه شود) قرار دادیم. نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطوح PARP، XIAP، Survivin و اکتین، در وسترن بلات در زیر نشان داده شده است. نمودار نشان دهنده نتایج حاصل از بررسی TUNEL بر روی سلول‌های A549 است که به داخل آنها siRNAهای مشخصی را تزریق نمودیم.

«None» نشانه میزان مرگ سلول در غیاب RNAهای نشان داده شده است. siRNAهای کنترلی ۱ و ۲، RNAهای نامربوطی هستند که به منظور کنترل اثرات غیراختصاصی ناشی از داشتن یک RNA تداخل کننده تزریق شده به سلول‌ها، اضافه شده است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعات، در مورد مکانیسم عمل نیکوتین، چه چیز را می‌توان استنباط نمود؟



d. دلیل بهبودی کندتر بیمارانی که در طی شیمی درمانی، از دخانیات استفاده می‌کنند نسبت به بیمارانی که پیش از انجام شیمی درمانی آن را ترک کرده‌اند، از لحاظ زیستی چیست؟



واژه‌یاب

آ

آبدوست، ۴۱
آبشار فاکتور نسخه‌برداری، ۱۱۹۴
آبگریز، ۴۱
آپوپتوز، ۲۶، ۱۱۳، ۱۱۵۰، ۱۱۵۸، ۱۳۳۴، ۱۳۵۰
آپوترانسفرین، ۷۵۷
آترواسکلروزیس، ۵۴۰
آدنوزین تری‌فسفات، ۵۹۱
آدنیلیل سیکلاز، ۷۹۵
آدیپوسیت‌ها، ۵۳۷
آذین‌بندی، ۸۸۳
آرابیدوپسیس‌تالیانا، ۳۰۳
آراکنا‌ها، ۲
آرترواسکلروزیس، ۴۳۰
آرگوناوت، ۴۴۰
RNA آز MRP، ۴۵۷
آزبستوز، ۱۳۹۵
آزمایش رشته-لغزنده، ۹۰۲
آسم، ۷۷۴
آشکار سازهای تباینی، ۱۲۵۷
آکانه، ۱۱۴۰
a ـ آکتینین، ۸۹۸
آکسون، ۱۲۲۳
آکسونم، ۹۵۴
آکسون، مخروط رشد، ۱۲۷۱
آکسون‌ها، ۱۲۱۲
آکوآپورین‌ها، ۵۴۹
آکواپورین‌ها، ۵۲۷
آگونیست، ۷۷۴
آلزایمر، ۹۹
آلفا - آمانیتین، ۳۴۰
DNA آلفوئید، ۳۳۵
آلوستری، ۱۱۵
آماده سازی، ۵۹۴
آمانیتا فالوئید، ۸۹۶
آمتوپترین، ۵۰۷
آمفی پاتیک، ۴۱
آمفی‌پاتیک، ۸۹
آمیب دیکتیواستلیوم، ۹۲۳
آمینواسیل ـ tRNA سنتتازها، ۱۶۸
آمینوپترین، ۵۰۷
آنتاگونیست پیام چندگانه سربروس، ۱۱۸۱
آنتاگونیست‌ها، ۷۷۴
آنتاگونیست‌های، ۵۰۷
آنتالپی، ۷۳
آنتروپی، ۷۳
آنتی‌پورتر ATP/ADP، ۶۲۸
آنتی ژن سیالیل لویس -X، ۱۰۳۰
آندوپلاسمی خشن، ۶۵۹
آندودرم، ۱۱۶۴
آندوسیتوز وابسته به گیرنده، ۱۳۲۵
آنزیم دوکاره، ۵۹۷
آنزیم ردوپسین کیناز، ۷۹۴
آنزیم فعال‌کننده یوبی‌کوئیتین، ۱۱۳
آنزیم میوزین LC کیناز، ۹۱۵
آنسفالوپاتی اسفنجی شکل، ۹۹
آنکوژن، ۱۱۵۳
آنکیرین G، ۱۲۴۱
آنوپلوئیدی، ۵۰۲
آنوپلوئیدی، ۹۶۲
آنیوپلوئیدی، ۱۳۹۲
آنیون، ۴۷

الف

اثوزین، ۴۸۴
ابرخانواده، ۹۳
ابرخانواده، ۳۴۰
ابرخانواده ABC، ۸۶۳
ابرخانواده GTPase، ۸۴۱
ابرخانواده ایمونوگلوبولینی، ۱۳۰۱
اپت مداخله‌گر، ۳۱
اپراتور، ۳۴۰
اپسونیزاسیون، ۱۲۹۳، ۱۳۰۲
اُپسین آزاد، ۷۹۱
اپی‌تلیا، ۵۰۴
اپی‌تلیا، ۱۱۶۵
اپی‌تلیوم، ۸۷۷
اپی‌توپ، ۱۰۰، ۵۰۵، ۱۳۰۱
اپی ژنتیک، ۳۲۲
اتاقک‌های کشت، ۴۸۴
اتصالات آدهرنس، ۹۹۳
اتصالات سلول ـ سوبسترا، ۹۱۷
اتصالات سلولی، ۴۶۹، ۵۸۷
اتصالات شکاف‌دار، ۴۸۳، ۹۹۳
اتصالات کریستالی، ۶۰۰
اتصالات لنگری، ۹۹۲
اتصالات محکم، ۵۸۷، ۹۹۲
اتصال انتهای غیرهمولوگ، ۱۹۳
اتصال دهنده انتهایی زیر واحدهای غیرهمولوگ، ۱۳۲۹
اتصال‌های پرنیل، ۵۳۰
اتصالی حذفی، ۱۳۰۵
اتصالی وارونگی، ۱۳۰۵
اتم کربن نامتقارن، ۴۲
اتورادیوگرافی، ۱۲۹، ۷۱۷
اتوفاژی، ۴۷۰
اتیل متان سولفونات، ۱۳۹۴
اثر آبگریزی، ۵۱
اثرات مضاعف، ۱۳۶۰
اثر کدورت، ۴۸۶
اثرگر آلوستریک، ۱۱۵
اجسام پایه، ۹۳۵
اجسام پردازش‌کننده RNA سیتوپلاسمی ۴۴۱
اجسام شبه‌جنینی، ۱۱۱۵
اجسام کاژال، ۴۶۲
اجسام متراکم، ۹۷۴
اجسام هسته‌ای، ۴۶۲
اجسام هسته‌ای لوکمی پرومیلوسیت، ۴۶۳
اداکت‌های شیمیایی، ۱۹۲
اُرتولوگ، ۸۶۵
b- ارستین، ۷۹۴
ارگوسترول، ۵۱۹
اریتروسیت‌ها، ۸۱۶
ERM ازرین ـ رادیکسین ـ میوزین، ۸۹۹
اسپرماتوژنز، ۱۱۶۸
اسپرماتوسیت اولیه، ۱۱۶۹
اسپرماتوگونیا، ۱۱۶۹
اسپرماتید، ۱۱۶۹
اسپرمیوژنز، ۱۱۶۹
اسپکتروسکوپی جذبی پیکوثانیه، ۶۴۰
اسپکترین، ۸۹۸
اسپکتینومایسین، ۳۳۹
اسپینوسربلار آتاکسیا، ۲۸۴
استاتین‌ها، ۵۴۰
استحاله‌ای، ۱۶۵
استرئوشیمی، ۱۰۳
استرما، ۶۳۲
استروئیدها، ۵۱۹
استریفیه شدن، ۶۳
استریل، ۱۱۳۳
استگیما/ Stylar، ۱۰۳۷

استوبولاریا، ۱۶۵
استوفن، ۱۱۹۳
استوکیومتری، ۹۲
اسفروتیک، ۸۹۸
اسفنگولیپیدها، ۵۱۹
اسکریبل، ۱۱۴۵
اسکلت سلولی، ۵۱۱، ۸۷۸
اسکلروتوم، ۱۲۱۲
اسکلروز متعدد، ۱۲۳۸
اسکوته، ۱۱۴۰
اسلیت، ۱۲۷۴
اسیل چرب CoA دهیدروژناز، ۶۱۴
افرین‌ها، ۱۲۷۴
افزاینده، ۱۳۶۰، ۳۴۰
اِفس، ۱۲۷۴
اکتودرم، ۱۱۶۴
اکتیل گلوکوزید، ۵۳۳
اکتین، ۸۸۱
اکتیوین، ۸۲۰
اِکدیزون، ۳۴۰
اکستنسین، ۱۰۳۳
b- اکسیداسیون، ۶۱۴
اکسیداسیون هوازی، ۵۹۱
اکسید نیتریک، ۸۰۹
اکسیدوردوکتاز Erp57، ۱۳۲۲
اکلودین، ۹۹۹
اگرین، ۱۰۱۸
اگزون‌ها، ۱۵۸
الکترواسپری، ۱۳۲
الکتروفورز، ۱۲۲
الکتروفورز ژل SDS ـ آکریل‌آمید، ۱۲۲
الکترونگاتیویته، ۴۵
الگوبندی، ۱۱۶۶
الیگودندروسیت‌ها، ۱۲۳۸
الیگوساکاریدهای متصل به N، ۶۷۷
الیگوساکاریدهای متصل به O، ۶۷۷
الیگوساکاریل ترانسفراز، ۶۷۸
اُماتیدیوم، ۸۴۳
امرسون، ۶۴۲
امرین، ۹۷۶
انتاکتین، ۹۸۹
اِنتاموباهیستولیتیکا، ۶
انتشار ساده، ۵۴۶
انتقال اکسونی، ۹۴۴
انتقال الکترونی، ۵۹۳
انتقال پروتئین، ۶۵۶
انتقال پیام، ۷۶۶
انتقال ترانس سلولی، ۵۸۷
انتقال تسهیل شده، ۵۴۷
انتقال درون‌تاژکی، ۹۵۷
انتقال دهنده، ۶۲۸
انتقال‌دهنده‌های تکی، ۵۴۷
انتقال‌دهنده‌های ناهمسو، ۵۴۸
انتقال رو به جلو، ۹۴۴
انتقال فعال، ۵۴۷
انتقال فعال ثانویه، ۵۴۹
انتقال فوتوالکترونی، ۶۳۷
انتقال معکوس، ۶۸۳
انتقال ناهمسو، ۵۸۰
انتقال هسته‌ای سلول سوماتیک، ۱۲
انتقال همزمان با ترجمه، ۶۶۱
انتقال همسو، ۵۸۰
اندام‌زایی، ۱۱۶۶
اندامک، ۴۶۷
اندام کورتی، ۱۲۶۱
اندامک‌ها، ۲
اندوزوم تأخیری، ۷۱۵
اندوسیتوز، ۴۶۹، ۸۹۵
اندوسیتوز با واسطه رسپتور، ۴۶۹
AP اندونوکلئاز، ۱۹۰
انرژی آزاد، ۷۲
انرژی آزاد گیبس، ۷۵
انرژی الکتریکی، ۷۱
انرژی پتانسیل، ۷۱
انرژی پتانسیل شیمیایی، ۷۱
انرژی تابشی، ۷۱
انرژی جنبشی، ۷۱
انرژی حالت گذار، ۱۰۲
انرژی حرارتی، ۷۱
انرژی فعال سازی، ۷۵، ۱۰۲
انرژی مکانیکی، ۷۱
انکرین، ۸۹۸
انکلوزیونهای، ۷۴۴
انکوباتور، ۴۹۸
انگشت روی، ۸۹
انگشت روی C2H2، ۳۴۰
انگشت‌نگاری DNA، ۲۷۱
انگشت‌نگاری جرمی پپتیدی، ۱۳۴
اوگلنا، ۴۱۷
اولترابی توراکس، ۱۱۹۹
اولیگوسارکارید با اتصال N، ۷۱۸
اولیگوساکاریدهای با اتصال -N، ۱۰۱۶
اووژنز، ۱۱۶۸
اووسیت، ۱۱۶۸
اویدیته، ۱۲۹۹
ایده محیط کوچک تومور، ۱۳۵۶
ایزوالکتریک فوکوسینگ، ۱۲۴
ایزوپروترنول، ۷۷۴
ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP)، ۵۴۰
ایزوشکل، ۱۵۹
ایزوفرم‌ها، ۹۹۰
ایماتینیب، ۱۳۸۰
ایمنی، ۱۲۸۶
ایمونوالکترون میکروسکوپی، ۴۸۸
ایمونوفلورسانس، ۳۴۰
ایمونوگلوبولین، ۱۲۹۶
ایمونوگلوبولین‌های متشابه، ۱۳۰۱
این پیام دسته‌بندی YXXF، ۷۴۰
اینترفرون نوع یک، ۱۲۹۳
اینترفرون‌ها، ۸۲۶
اینترلوکین، ۱۱۲۷
اینترون‌ها، ۱۵۸
اینتگراز، ۲۹۱
اینتگرین، ۹۱۷
اینتگرین، ۹۸۹
اینوادوپودیوم، ۱۳۵۳
اینهیبین، ۸۲۰

ب

بارز بودن، ۱۳۵۸
بازآرایی mRNP، ۴۳۲
بازآرایی ژنی سوماتیک، ۱۳۰۴
بازال، ۵۰۵
بازال لامینا، ۲۰، ۵۰۵
بازدارنده، ۲۳
بازسازی‌های دیجیتالی، ۴۷۸
بازیابی فلورسانسی پس از بی‌رنگ شدن توسط نور، ۹۶۴
بازیافت فلورسانس بعد از خاموشی نوری، ۲۰
بازیافت نوکلئوتیدی، ۵۰۸
بافت چربی سفید، ۶۲۹
بافت چربی قهوه‌ای، ۶۲۹
باکتریوفاژ، ۱۹۹
بالادست، ۳۴۰
باند ۴/۱، ۸۹۸
بتاسیکلودکسترین، ۵۲۴
بتا - کاتنین، ۱۱۲۰
بتاگالاکتوزیداز، ۳۴۰
بخش فرودست، ۱۵۴
بخش‌های دورگلژی، ۷۳۸
برات، ۱۱۴۷
برای، ۳
برچسب اپی‌توپ، ۴۸۵
برش بازی، ۱۹۰
برگشت‌پذیری میکروسکوپی، ۶۵
۵ ـ برموموداکسی یوریدین، ۵۰۸
بروموداوکسی یوریدین، ۱۱۱۹
بروموذُرمین، ۳۲۰
بروموذُمین، ۳۴۰
بریتون چانس، ۶۱۵
بلاست، ۳۰۹
بلاستودرم سینسیتیال، ۱۱۸۹
بلاستوسل، ۱۱۷۷

بلوغ سیسترنایی، ۷۱۴، ۷۳۷
بلوغ میل پیوندی، ۱۳۰۸
بلوغ میوزی، ۱۰۴۹
بنومیل، ۱۰۹۴
SIN3 به دُمین مهاری UME6، ۳۴۰
بیان تمایزی ژن، ۳۳
بیان ژن، ۳۴۰
بیان هماهنگ، ۱۵۸
بیکوئید، ۱۱۹۱
بیماری Pelizaeus-merzbacher، ۱۲۳۸
بیماری دیابت بی‌مزه، ۵۵۶
بیماری سلول ـ I، ۷۴۴
بیماری شارکوت – مری – توس، ۱۰۰۵
بیماری کارکوت ـ ماری ـ توس، ۱۲۴۱
بیماری کلیوی پلی‌سیستیک اتوزومی پیشرونده، ۹۵۹
بیماری گزرودرماپیگمنتوزوم، ۱۳۹۶
بین مولکولی، ۴۷
بین نواحی جدا از هم، ۷۲۰
بین واحدهای مجزا، ۷۱۷
بیوانفورماتیک، ۳۰۸
بی‌هوازی، ۵۹۴
بی‌هوازی‌های اختیاری، ۵۹۶

پ

پاپائین، ۹۰۰
پاپیلا، ۱۲۶۳
پارکینسون، ۹۹
پاف، ۳۴۰
پاکت اتصال ویژه زنجیره جانبی، ۱۰۶
پاکت هسته‌ای، ۷۰۲
پایین دست، ۳۴۰
پپتیدهای سیگنالی، ۶۵۸
پپتیدیل ـ پیرول ایزومرازها، ۶۸۱
پتانسیل احیایی، ۷۸
پتانسیل اکسیداسیون، ۷۸
پتانسیل الکتریکی، ۷۲
پتانسیل عمل، ۱۲۲۵
پتانسیل غشاء، ۵۴۷، ۱۲۲۴
پراکسید هیدروژن، ۶۲۱
پراکسیزوم، ۶۰۶
پراکسیزوم‌ها، ۴۷۲، ۶۵۶
پرتوان، ۱۱۱۱
پردازشگر، ۴۵۷
پردازش و عرضه آنتی‌ژن، ۱۳۲۱
پرفورین، ۱۲۹۳، ۱۳۳۷
پرلکان، ۱۰۱۸
پروآنزیم، ۷۴۵
پروب، ۷۴۵
پروپروتئین، ۷۴۵
پروپریوسپتیو، ۱۲۶۱
پروتئاز بوتولینوم، ۱۲۴۸
پروتئوزوم، ۴۷۱
پروتئوزوم‌ها، ۱۱۲
پروتئوم، ۳۲
پروتئومیکس، ۱۳۷
پروتئین Ras، ۱۳۵۸
پروتئین Gag، ۷۵۹
پروتئین Xolloid، ۱۱۸۳
پروتئین آرتمیس، ۱۳۰۷
پروتئین آلوستریک، ۱۱۵
پروتئین اتصالی به عنصر پاسخ‌دهنده به آهن، ۴۵۰
پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال، ۱۱۲۵
پروتئین با فلورسنت سبز، ۴۸۱
پروتئین پروتئولیپیدی، ۱۲۳۸
پروتئین جداکننده میکروتوبولی، ۹۷۱
پروتئین چندبخشی، ۸۹۹
پروتئین دی‌سولفید ایزومراز، ۶۸۰
پروتئین سازش‌دهنده، ۸۰۳
پروتئین سندرم ویسکوت ـ آدریچ، ۸۹۳
پروتئین فسفاتازها، ۷۸۰
پروتئین فعال ـ غالب، ۹۲۱
پروتئین فعال‌کننده ـ GTP، ۷۰۶
پروتئین فلورسانت سبز، ۱۲۷
پروتئین فلورسانس زرد، ۵۴۲
پروتئین فلورسنت سبز، ۲۸
پروتئین فلورسنت سبز ژله ماهی، ۳۷
پروتئین فیبری اسیدی گلیال، ۹۷۴
پروتئین کمک فعال‌کننده، ۳۴۰
پروتئین کیناز Abl، ۱۳۸۰
پروتئین کیناز B، ۱۳۹۲
پروتئین Src کیناز، ۱۳۸۰
پروتئین کیناز G، ۸۱۰
پروتئین کیناز B، ۸۵۶
پروتئین کینازها، ۷۸۰
پروتئین‌کینازهای هترودیمری، ۱۰۴۱
پروتئین گیرنده کاتابولیتی، ۳۴۰
پروتئین متصل شونده به CPE، ۴۴۳
پروتئین متصل‌شونده به ساقه ـ حلقه، ۱۱۷۲
Gپروتئین مونومری کوچک، ۴۴۷
پروتئین مهارگر ترجمه که تومور مغزی، ۱۱۴۵
پروتئین‌های SMC، ۳۲۴
پروتئین‌های Rho، ۹۲۱
پروتئین‌های NCAPs، ۱۰۳۶
پروتئین‌های اتصالی به فیلامنت‌های حد واسط، ۹۷۸
پروتئین‌های انتقالی، ۵۴۴
پروتئین‌های انتقالی غشاء، ۸۰
پروتئین‌های برقرارکننده اتصالات عرضی، ۸۹۸
پروتئین‌های بنس جونز، ۱۲۹۹
پروتئین‌های ترشحی، ۶۵۹
پروتئین‌های تریتوراکس، ۳۴۰
پروتئین‌های تغییردهنده، ۱۱۷
پروتئین‌های تنظیمی، ۸۰
پروتئین‌های چرخه سلولی، ۱۱۳۹
پروتئین‌های چند شانه‌ای، ۳۴۰
پروتئین‌های چند گذره، ۶۶۹
پروتئین‌های حامل غشایی، ۵۱۱
پروتئین‌های حرکتی، ۸۱، ۱۱۰
پروتئین‌های حرکتی، ۸۷۸
پروتئین‌های حفظ ساختار کروموزومی، ۴
پروتئین‌های داربستی، ۸۰
پروتئین‌های دیسک بزرگ، ۱۱۴۵
پروتئین‌های ساختاری، ۸۰
پروتئین‌های سازش‌دهنده، ۸۹۸
پروتئین‌های سویچ، ۸۴۱
پروتئین‌های سیگنال‌دهنده، ۸۱
پروتئین‌های عمل‌گر، ۹۲۱
پروتئین‌های غشایی متصل شده به لیپید،
پروتئین‌های «کارگو»، ۷۱۴
پروتئین‌های کلاهکی، ۸۸۹
پروتئین‌های کیمر، ۴۶۷
پروتئین‌های لنگری، ۸۰۳
پروتئین‌های متصل به میکروتوبول، ۹۳۰
پروتئین‌های متصل شونده به اسیدهای . (FABPs)، ۵۳۶
پروتئین‌های محیطی، ۵۲۶
پروتئین‌های منسوب به اکتین (Arp)، ۴
پروتئین‌های موتوری، ۹۴۴
پروتئین‌های مهاری، ۱۱۳۹
پروتئین‌های نودال، ۱۱۸۰
پروتئین‌های هومئودُمین، ۳۴۰
پروتئین هسته‌ای کننده اکتین، ۸۹۰
پروتئین ـ یوبی‌کوئیتین لیگاز، ۱۱۴
پروتوانکوژن HER2/NEU، ۱۳۸۳
پروتوانکوژن، ۸۶۰
پروزاک، ۱۲۴۹
پروسپرو، ۱۱۴۵
پروستاگلاندین‌ها، ۱۲۹۴
پروفایل هیدروپاتی، ۶۷۵
پروفیلین، ۸۸۷
پروکاریوتها، ۲
پرومتافاز، ۹۶۱
پروموترهای ضعیف، ۳۴۰
پروموترهای قوی، ۳۴۰
پرووپروس، ۲۰۵
پره‌های شعاعی، ۹۵۶
پکتین، ۱۰۳۳
پکسوفاژی، ۷۶۱
پلاتینیوم، ۱۰۳
پلاستوکینون (QB)، ۶۴۲
پلاسماسل‌ها، ۱۳۱۱

پلاسمودسماتا، ۴۴۲
پلاسمودیوم، ۳۰۱
پلاسمودیوم فالسیپاروم، ۶
پلاکوفیلین، ۹۹۷
پلاکوگلوبین، ۹۹۷
پلاکین‌ها، ۹۷۸
پلکتین، ۹۷۸
پلی اسپرمی، ۱۱۷۲
پلی‌پپتیدهای متصل به لامین، ۹۷۶
پلی تنیزاسیون، ۳۳۲
پلی سیسترونیک، ۲۷۴
RNA پلی‌مراز I، ۳۴۰
RNA پلی‌مراز III، ۳۴۰
RNA پلیمراز s70، ۳۴۰
پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، ۳۱۳
پلی‌وینیلیدین دی‌فلورید، ۱۲۷
پمپ‌های مصرف‌کنندهٔ ATP، ۵۴۵
پمفیگوس وولگاریس، ۹۹۷
پودوفیلوتوکسین، ۹۴۰
پورین، ۵۹۹
پورین‌ها، ۱۴۴
پوشش، ۲۰۱
پیامبر ثانویه، ۷۸۱، ۸۰۱
پیامبر ثانویه IP3، ۸۵۳
پیامبرهای ثانویه، ۱۰۰۳
پیام دسته‌بندی، ۷۳۳
پیام دسته‌بندی KKXX، ۷۳۴
پیام دسته‌بندی NPXY، ۷۵۳
پیام دسته‌بندی Tyr-X-X-F، ۷۵۴
پیام دسته‌بندی دی‌اسیدی، ۷۳۲
پیام‌رسان خارج سلولی، ۷۶۵
پیام‌های دسته‌بندی، ۷۲۶
پیرایش ترانس، ۴۱۷
پیرایش متناوب، ۴۲۶
پیروات دهیدروژناز، ۶۰۲
پیروات کیناز، ۵۹۵
پیری، ۱۳۶۰
پیریدوکسین، ۱۰۹
پیری زودرس، ۹۷۷
پیری سلولی، ۵۰۱
پیریمیدین‌ها، ۱۴۴
پیشرونده، ۹۰۸
پیش‌زاد، ۶۲۳
پیش زاد، ۱۱۰۹
پیش‌سومیتی، ۱۱۹۸
RNA پیک، ۹۳، ۱۴۳
پینوسیتوز، ۷۴۹
پیوندهای فسفوانیدرید، ۷۵
پیوندهای کووالان، ۴۲
پیوند هیدروژنی، ۴۷

ت

تئودر شوان، ۴۶۷
تائو، ۹۹
تابع توزیع نقطه‌ای، ۴۸۷
تاپاسین، ۱۳۲۲
تاخوردگی ATPase، ۸۸۳
تاژک، ۵۱۶
تاژک، ۹۵۴
تاکسول، ۹۴۰
تبادل کروموزمی، ۱۳۶۷
تبخیرکننده با خلاء، ۴۹۳
تبدیل نوری، ۴۸۲
تبدیل یافته، ۵۰۲
تتراکسید اسمیوم، ۵۱۴
تتراد، ۱۱۰۱
تتراهیمنا، ۳۰۴
تترودوتوکسین، ۱۲۴۸
تثبیت کربن، ۷۷
تثبیت کربنی، ۶۳۲
تجزیه کردن سلول، ۷۴۷
تحریک اتوکرین، ۱۳۳۲
تحلیل ماهیچه‌ای، ۴۲۹
تحلیل ماهیچه ستون فقرات، ۴۲۰
تخریب پروتئازومی وابسته به یوبیکوئیتن، ۱۳۴۱
تخریب ژن، ۱۲۴۶
تخصصی شدن گونه سلولی، ۱۱۳۰
تخلیه نشر تحریک شده، ۴۸۶
تخم، ۱۱۶۴
ترانسپوزاز، ۲۸۸
ترانسپوزون‌ها، ۴۴۲
ترانستیریتین (TTR)، ۳۴۰
ترانس‌سیتوز، ۷۴۸
ترانسفراز انتهای تلومر، ۳۳۶
ترانس کریپتاز معکوس، ۲۰۵
ترانسلوکون، ۶۶۵
ترانسلوکون غشاء خارجی، ۶۸۹
ترانسیتوزیس، ۱۲۹۹
ترشح پایدار، ۷۴۴
ترشح تنظیم شده، ۷۴۴
ترمواسیدوفیل‌ها، ۲
ترموژنین، ۶۲۹
ترمیم همراه با رونویسی، ۱۹۲
تروپومدولین، ۸۸۹، ۹۱۰
تروپومیوزین، ۹۱۱
تروفکتودرم، ۱۱۱۲
تروفواکتودرم (TE)، ۱۱۷۷
ترومبوپوئیتین، ۸۲۷، ۱۱۲۷
ترومبوسپندین، ۱۲۴۴
ترومبوسپوندین، ۸۲۱
تری آسیل گلیسرول‌ها، ۶۳
تریپانوزوم، ۴۱۷
تریپانوزوما بروسئی، ۶
تریتون X-۱۰۰، ۵۳۳
تریدمیلینگ، ۸۸۷
تریدمیلینگ، ۹۶۶
تریکوموناس واژینالیس، ۶
تری‌گلیسرول، ۶۰۵
تری‌گلیسرید، ۶۰۵
تری‌گلیسیریدها، ۶۳
تست‌های پیوندی، ۱۳۵۵
تسهیم، ۱۱۶۴
تشدید پیام، ۸۰۱
تشدیدشونده موقت (TA)، ۱۱۱۰
تشدیدکننده‌های پیرایش اگزونی، ۴۱۹
تشدید مغناطیسی هسته، ۹۲
تصویربرداری تنزل زمانی، ۳۷
تعادل پایا، ۶۶
تعادل شیمیایی، ۶۵
تعاونی، ۱۲۵۱
تعقیب ضربان، ۹۴۴
تغییر در توالی، ۲۷۹
تغییر شکل، ۱۳۵۸
تغییر قالب، ۱۶۵
تفکیک اتمی، ۱۳۰۱
تفکیک اولیه بار، ۶۳۹
تقاطع اگزون، ۴۱۷
تقویت کننده‌ها، ۲۴
تکامل دسته‌های ژنی Hox، ۱۲۰۱
تکرارهای انتهایی‌بلند، ۲۹۰
تکرارهای پراکنده، ۲۸۳
تکنیک تکه ـ نگهداری، ۵۷۵
تکوین، ۱۱۰۹
تکوین جنین، ۱۱۶۳
تلاطم اگزونی، ۲۹۷
تلنسفال، ۳۴۰
تلوفاز، ۹۶۱
تلومراز، ۳۳۶
تلومرها، ۱۳۹۹، ۳۶
تله‌های نوری، ۹۰۷
تله یونی، ۱۳۳
تمام ترانس، ۷۹۱
تنظیم رشته ضخیم، ۹۱۵
تنظیم رشته نازک، ۹۱۱
تنظیم‌کننده پاسخ، ۳۴۰
تنفس سلولی، ۵۹۷
تنفس نوری، ۶۵۲
تنوع ترکیبی، ۱۰۰۱
توارث سیتوپلاسمی، ۳۰۰
توالی RGD، ۱۰۲۳
توالی اتصال سیگنال، ۶۷۰
توالی اتصالی توقف انتقال، ۶۶۹

توالی تکراری مستقیم، ۲۸۸
توالی ساده، ۲۸۳
توالی سیگنال، ۶۵۸
توالی شاین دالگارنو، ۱۷۵
توالی کوزاک، ۱۷۳
توالی ورود به استروما، ۶۹۵
توالی‌های الحاق، ۲۸۸
توالی‌های توپوژنیک، ۶۶۸
توالی‌های خاموش‌کننده، ۳۴۰
توالی‌های علامت‌دهنده نوترکیبی، ۱۳۰۴
توالی‌های مکان‌یابی هسته‌ای، ۷۰۲
توالی‌های هدف یابی جذب، ۶۵۸
توالی‌های هدف‌یابی ماتریکس، ۶۸۶
توالی‌های همانندسازی خودکار، ۳۳۳
توبول‌های عرضی، ۹۱۱
توبولین، ۲۸، ۹۳۰
توده سلولی داخلی (ICM)، ۱۱۷۷
تورگر، ۴۷۵
تورم‌های کروموزومی بزرگ، ۴۳۳
تولید استیل CoA، ۶۰۲
تومور ویلمز، ۳۴۰
تومورهای full-fledged، ۱۳۹۶
تومورهای بدخیم، ۱۳۵۲
توموگرام، ۴۹۱
تونیکامایسین، ۶۷۹
تیامین، ۱۰۹
تیتان، ۲۷۴
تیتین، ۸۴، ۱۷۰
تیتین، ۹۱۰
تی ـ ساکس، ۴۷۱
تیلاکوئید، ۴۷۷، ۶۹۷، ۶۳۲، ۶۹۷
تیمیدین کیناز، ۳۴۰
تیوردوکسین، ۶۵۰

ث

ثابت تعادل، ۶۵
ثابت سرعت، ۶۵
ثابت میکائیلیس، ۱۰۵

ج

جابه‌جایی، ۱۷۶
جاسپلاکینولید، ۸۹۶
جایگاه اتصال آلوستریک، ۱۱۵
جایگاه اتصال به سوبسترا، ۱۰۳
جایگاه کاتالیزی، ۱۰۳
جایگاه ورود داخلی برای ریبوزوم، ۱۷۴
جایگاههای پلی A، ۲۷۳
جبران مقداری، ۳۲۱، ۱۱۷۴
جداسازی بخش‌ها، ۲۹
جداسازی / یونیزاسیون لیزری با کمک ماتریکس، ۱۳۲
جذب‌کننده‌های شیمیایی، ۹۲۵
جریان اسمزی، ۵۵۳
جریان خطی الکترونی، ۶۴۲
جریان سیتوپلاسمی، ۹۱۵
جستجو و به دام اندازی، ۹۳۹
جسم افزایش‌دهنده، ۳۴۰
جسم بار، ۳۲۱
جسم پایه، ۹۵۴
جعبه TATA، ۳۴۰
جعبه تخریب، ۱۰۵۴
جنون گاوی، ۹۹
جنین مرحلهٔ بلاستوسیست، ۱۱۷۷
جوانه عضوی، ۱۲۱۷
جهش اهداء عملکردی، ۱۳۶۷
جهش تبدیلی، ۱۳۹۵
جهش جانشینی، ۱۳۰۸
جهش حذفی، ۵۴۰
جهش حساس به حرارت، ۳۱
جهش‌زا، ۳۱
جهش نقطه‌ای، ۱۳۶۷
جهش‌ها، ۱۷
جهش‌های پویشگر واصل، ۳۴۰
جهش‌های خارج از قالب با معنی اشتباه، ۴۵۱
جهش‌های سوماتیک، ۱۳۵۰
جهش‌های سوماتیک، ۱۳۰۸
جهش‌های فقدان عملکرد، ۱۳۷۱
جهش‌های نقطه‌ای، ۱۸۸
جهش یافته‌های هتروکرونیک، ۱۱۱۵

چ

چاپرون، ۱۷۷، ۴۷۳
چاپرون‌ها، ۹۷
چاپرون‌های مولکولی، ۹۷
چاپرونین‌ها، ۹۷، ۹۸
چادر معکوسی، ۵۷۴
چرخ-پره‌مانند، ۹۰۱
چرخه Q، ۶۱۹
چرخه اسید سیتریک، ۵۹۳
چرخه پل عرضی، ۹۱۰
چرخه تعمیر آسیب پروتئین D1، ۶۴۷
چرخه سلولی، ۹۵۹
چرخه کالوین، ۶۴۹
چرخه Q محرکه پروتونی، ۶۱۵
چرخه وظیفه‌ای کوتاه، ۹۱۰
چسبندگی‌های کانونی، ۸۸۱
چگالی پس سیناپسی، ۱۲۴۴
چنگال همانندسازی فروپاشیده، ۱۹۵

ح

حالت گذار، ۷۵
حالت گذار حدواسط، ۷۵
حامل، ۵۴۷
حامل‌های الکترون، ۶۰۲
حباب نسخه‌برداری، ۱۵۶
حد واسط چهار وجهی، ۱۰۸
حد واسط‌های متابولیکی، ۵۹۴
حذف آللی، ۱۳۱۰
حرکت چرخ دنده‌ای، ۱۲۷۳
حساسیت زدایی، ۷۷۷
حفره اکسی آنیون، ۱۰۶، ۱۰۸
حفره پوشش‌دار، ۴۶۹
حلقوی الگانس، ۱۱۱۱
حلقه c، ۶۲۸
حلقه T، ۱۰۶۱
حلقه انقباضی، ۸۸۱، ۹۶۸
حلقه بالبیانی، ۴۳۳
حلقه -مارپیچ‌های بازی، ۸۹
حلقه‌های تصادفی، ۱۴۹

خ

خارج کننده، ۴۳۱
خال‌های هسته‌ای، ۴۶۳
خاموش کردن siRNA، ۴۴۲
خاموش‌کننده، ۶۴۶
خاموش کننده‌ها، ۲۴
خانواده، ۹۳
خانواده ATP ـ آزهای AAA،
خانواده ژنی، ۲۷۷
خانوادهٔ پروتئینی، ۱۳
خردل‌های نیتروژن، ۱۳۹۴
خودایمنی، ۱۲۸۶
خودپیرایش پروتئین، ۱۱۹
خود پیراینده، ۴۲۰
خوش‌خیم، ۱۳۵۲

د

دأکسی کولات، ۵۳۳
دانیورریو، ۳۵
دایسر، ۴۳۹
داینئین، ۹۵۰، ۹۴۴
داینا کتین، ۹۵۰
داینامیتین، ۹۵۱
داینامین، ۱۲۵۰
دپلاریزاسیون، ۷۹۱، ۱۲۲۵
دراوون، ۴۴
در سلول‌های کبدی، ۵۹۶
درماتودرم، ۱۲۱۲
دروزوفیلا، ۳۴۰
دروزوفیلا ملانوگاستر، ۳۵
دروشا، ۴۳۹
درون مولکولی، ۴۷
درون همزیست‌ها، ۳۰۰

دساچوراز، ۵۳۶
دست EF، ۸۹
دستگاه میتوزی، ۱۰۴۲
دسته‌بندی پروتئین، ۷۱۴
دسته‌بندی‌کننده سلولی فعال شده با فلورسانس، ۴۹۶
دسته‌جات انقباضی، ۹۱۱
دسموپلاکین، ۹۹۷
دسموزوم‌ها، ۹۷۸، ۹۹۳
دسموکولین، ۹۹۷
دسموگلین، ۹۹۷
دسمین، ۹۷۴
دسیپرامین، ۱۲۴۹
دکانولوشن، ۴۸۶
دگردیسی، ۱۱۶۶
دمای ذوب، ۱۴۹
دم‌های هیستونی، ۳۴۰، ۳۱۷
دُمین fish، ۳۴۰
دُمین انتقال‌دهنده، ۳۴۰
دُمین انتهای کربوکسیل، ۳۴۰
دُمین پری‌پلاسمی، ۳۴۰
دُمین دریافت‌کنندهٔ، ۳۴۰
دُمین ساختاری، ۸۹
دُمین طعمه، ۳۴۰
دُمین عملکردی، ۸۹
دُمین گلوبولار، ۳۴۰
دمین متصل شونده به RNA، ۴۱۲
دُمین ملخ‌شکل ـ b، ۷۵۲
دُمین‌های SH2، ۸۳۹
دمین‌های توپولوژیکی، ۹۲
دناتوره‌کننده‌ها، ۹۶
دنباله‌ی توالی بیان شده، ۳۱۱
دندریت‌ها، ۱۲۲۳
دوایر متحدالمرکز، ۱۲۵۷
دوربین جفت شده به بار، ۴۸۹
دورگه fish میانکنش‌دهنده، ۳۴۰
دوره مقاومت، ۱۲۳۱
دوک میتوز، ۹۶۱
دو لایه فسفولیپیدی، ۵۱۳
دولیکول فسفات، ۶۷۸
دیپلوئید، ۱۱۶۴
دیپلوئیدی، ۲۵
دی تیونیت، ۵۶۹
دیستروفی عضلانی آمری- درفوس، ۹۷۷
دیستروفی میتونیک، ۲۸۴
دیستروفین، ۸۹۹
دیستروگلیکان، ۱۰۲۹
دیسک Z، ۹۱۰
دیکتیوستلیوم دیسکوئیدومی، ۴۹۱
دیگوکسین، ۵۶۳
دی متیل آلیل پیروفسفات (DMPP)، ۵۴۰
دی متیل سولفات، ۱۳۹۴
دیوسکورید، ۶۲۹

ذ

ذره تشخیص ـ سیگنال (SRP)، ۶۶۱
ذره شناسایی کنندهٔ پیام پپتیدی، ۳۴۰

ر

راپامایسین، ۴۴۶
رادیو ایزوتوپ، ۱۲۸
راندم کویل، ۳۴۰
راندوم کویل، ۸۴
رتروترانس پوزون‌ها، ۲۰۵
رتروترانسپوزون‌های غیرویروسی، ۲۹۴
رتروویروس، ۷۵۹
رتروویروس‌های منتقل‌کننده، ۱۳۷۰
رتینال، ۷۹۱
رتینوبلاستوما، ۱۳۷۲
رتینوبلاستومای ارثی، ۱۰۸۶
رتینوبلاستومای انفرادی، ۱۳۷۲
رُدامین، ۳۴۰
ردوپسین، ۷۹۱
HMG-CoA ردوکتاز، ۵۴۰
رده‌بندی، ۱۱۰۹
رده سلولی، ۵۰۲
ردهٔ جنسی (زایا)، ۱۷
رسوب، ۴۹۵
رشته‌های ضخیم، ۹۱۰
رشته‌های نازک، ۹۱۰
رشتهٔ پیرو، ۱۸۲
رشتهٔ رهبر، ۱۸۲
رَفتهای لیپیدی، ۵۲۴، ۷۴۸
رکلیناموناس آمریکانا، ۳۰۴
رنگ‌آمیزی فلورسنت، ۴۸۱
روبو، ۱۲۷۴
روبیسکو، ۶۴۹
روبیسکو اکتیواز، ۶۵۰
رودوپسین، ۱۲۵۶
روکفورت، ۳
رونویسی کلروپلاستی، ۳۴۰
رونویسی میتوکندریایی، ۳۴۰
رهاشدن، ۱۳۹۸
ریبوزوم، ۱۵
RNA ریبوزومی، ۱۴۳
ریبوزیم، ۱۰۱
ریبوفلاوین، ۱۰۹
ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز، ۶۴۹
ریبونوکلئوپروتئین ناهمگن، ۴۱۱
ریخت زایی، ۹۸۷
ریزآرایه‌های اپ‌آ، ۳۱
ریز سازنده، ۵۱۰
ریزماهواره، ۲۸۳
ریسک، ۴۴۰
زائده‌های موج‌دار غشایی، ۹۲۰
زمان پرواز، ۱۳۳
زنجیره انتقال الکترون، ۵۹۳
زنجیره تنفسی، ۶۰۸
زنجیره سبک تنظیمی میوزین (LC)، ۹۱۴
زنوپوس لوئیس، ۱۰۵۲
زوناپلاسیدا، ۱۱۷۱
زیپ لوسین، ۸۹
زیپ لوسین، ۳۴۰
زیرواحد شبه w، ۳۴۰
زیرواحد نامتشابه شبه a، ۳۴۰
زیرواحدهای مرکزی، ۳۴۰
زیگوت، ۱۱۱۱
زیموژن، ۱۱۸

ژ

ژن p53، ۱۳۶۲
ژن HO ، ۳۴۰
ژن Pax6، ۳۴۰
ژن گزارشگر، ۳۴۰
ژن گزارشگر، ۸۳۱
ژنومیک، ۳۱
ژنهای Hox، ۳۴۰
ژن‌های جفت-قاعده‌ای، ۱۱۹۶
ژن‌های شکاف، ۱۱۹۳
ژن‌های قطبیت بند، ۱۱۹۷
ژن‌های کاذب، ۲۷۹
ژن‌های کاذب، ۸۸۲
ژن‌های کاذب پردازش شده، ۲۹۷
ژن‌های کارتاکر، ۱۳۵۰
ژن‌های میوژنی، ۱۱۳۵
ژن‌های هویت اندام گل، ۱۲۰۵
ژول، ۷۲

س

ساب و نتریکولار، ۱۱۲۴
ساختار هالیدی، ۱۹۷
ساختارهای ساقه ـ حلقه، ۱۵۱
ساختمان فضایی، ۸۰
سارکولما، ۹۱۱
سارکوما، ۱۳۵۲
سارکومر، ۹۱۰
سارین، ۱۰۹
سازمان دهنده اسپمن، ۱۱۸۱
سازمان دهنده هستکی، ۴۵۵
سازمان‌یابی فوق مولکولی، ۶۴۸
ساکارومایسس سرویزیه، ۳۴۰
سانتروزوم، ۹۳۲، ۱۲۷۳
سانترومر، ۹۶۴

سانتریفوژ افتراقی، ۱۲۱
سانتریفوژ سرعت ـ منطقه‌ای، ۱۲۱
سانتریفوژ شیب ـ چگالی تعادلی، ۱۲۱
سانس، ۱۲۶۳
سایتوکاین، ۱۲۹۳
سایه، ۴۸۱
سایه‌دهی فلزی، ۴۹۱
ستون DEAE – سفادکس، ۳۴۰
سدیم دودسیل سولفات، ۵۳۳
سرطان، ۱۳۵۲
سرعت حداکثر، ۱۰۳
سرکوب‌گر تومور، ۱۰۸۶
سروزی، ۵۸۷
سطح آبلومینال، ۹۹۲
سطح اگزوپلاسمی، ۵۱۴
سطح بازولترال، ۵۸۷
سطح خارجی، ۵۱۴
سطح داخلی، ۵۱۴
سطح سیتوزولی، ۵۱۴
سطوح رأسی، ۵۰۵
سکرتوگرانین II، ۷۴۵
سلکتین‌ها، ۱۰۳۰
سلکسا، ۴۴
سلول اولیه، ۴۹۹
سلول بنیادی، ۱۱
سلول پرستار، ۱۱۶۸
سلول مادری گانگلیون، ۱۱۴۴
سلول مویی، ۱۲۶۱
سلول‌های B، ۱۲۸۷
سلول‌های T، ۱۲۸۷
سلول‌های اکسینتیک، ۵۸۸
سلول‌های T التهابی، ۱۳۳۹
سلول‌های اولیه، ۴۹۶
سلول‌های بنیادی، ۱۰
سلول‌های بنیادی، ۱۱۱۱
سلول‌های بنیادی جنینی، ۱۱، ۱۱۷۷
سلول‌های بنیادی خون‌ساز، ۱۱۲۵
سلول‌های بنیادی عصبی، ۱۱۲۴
سلول‌های بنیادی لایه زایشی، ۱۱۱۹
سلول‌های پانت، ۱۱۲۳
سلول‌های پیش‌ساز، ۱۱۰۹
سلول‌های T تنظیمی، ۱۳۳۹
سلول‌های توموری بنیادی، ۱۳۵۵
سلول‌های T خاطره، ۱۳۳۸
سلول‌های دندریتیک، ۱۲۹۰
سلول‌های دوقطبی، ۱۲۵۷
سلول‌های زایا، ۱۱۰۹
سلول‌های زاینده اولیه، ۱۱۶۸
سلول‌های سوماتیک، ۱۷، ۱۱۶۴
سلول‌های سیاره‌ای، ۵۰۱
سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن حرفه‌ای، ۱۳۱۸
سلول‌های غیرچسبنده، ۵۰۱
سلول‌های کومولوس، ۱۱۷۱
سلول‌های لانگرهانس، ۱۳۴۱
سلول‌های لایه زایا، ۱۱۶۴
سلول‌های مزوفیل، ۶۵۲
سلولی نامتقارن، ۱۱
سمافُرین‌ها، ۱۲۷۴
سمی کوئینون، ۷۹
ATP سنتاز، ۶۲۲
سنتیلاسیون، ۱۳۰
سنجاق سرها، ۱۵۱
سنجش پلاک، ۲۰۱
سنجش تحرک و جابجایی الکتروفورزی، ۳۴۰
سنجش‌های آنتی‌بادی، ۱۲۷
سندرم Guillain-Barr (GBS)، ۱۲۳۹
سندرم اوشر نوع ۱، ۱۲۶۳
سندرم پیری کودکی هاچیسون ـ گیلفورد، ۹۷۷
سندرم داون، ۱۰۹۱
سندروم کرنر–سایرک، ۳۰۶
سوئیچ، ۱۱۷
سوپراکسید، ۶۲۰
سوپرخانواده ABC، ۵۵۸
سوش سلولی، ۵۰۱
سوش‌های، ۴۶۸
سوش‌های سلولی، ۵۰۱
سومیت، ۱۱۹۸
سومیت‌های جنینی میوبلاست‌ها، ۱۱۳۵
سونیکاسیون، ۴۹۲
سه لایه زایا، ۱۱۶۴
سیتالوپرام، ۴۴
سیتوتوکسیسیتهٔ سلولی وابسته به آنتی‌بادی، ۱۳۰۳
سیتوزول، ۴۶۸
سیتوکالازین D، ۸۹۵
سیتوکروم، ۶۱۱
سیتوکروم c اکسیداز، ۶۱۵
سیتوکینز، ۹۶۲
سیتوکین‌ها، ۸۱۶
سیسترنا، ۴۷۲، ۴۷۳
سیسترنای، ۷۱۴
سیستم ایمنی سازش‌پذیری، ۸۹۳
سیستم ترمیمی برش عدم تطابق، ۱۹۱
سیستم فاقد سلول، ۹۴۶
۱۱ـ سیس رتینال، ۱۲۵۶
سیکلو سپورین، ۱۳۳۲
سیکلین E، ۱۱۲۰
سیکلین‌ها، ۱۱۳۹
سیکلین‌های تیپ D، ۱۳۸۷
سیکلین CDK-های میتوزی، ۱۰۴۴
سیگنال پپتیداز، ۶۶۴
سیلکین CDK9-T، ۳۴۰
سیناپسین، ۱۲۴۶
سین‌پلی‌داکتیلی، ۱۲۱۷
سینتنی، ۳۲۹
سینسیتیا، ۱۱۶۹

ش

شاتل الکترونی، ۶۰۳
شاخص، ۵۰۵
شاخص هیدروپاتی، ۶۷۵
شایسته، ۱۱۶۵
شبکه آندوپلاسمی، ۲۰، ۴۷۲
شبکه آندوپلاسمی خشن، ۴۷۳، ۴۷۳
شبکه اندوپلاسمی صاف، ۴۷۳
شبکه ترانس گلژی، ۷۱۴
شبکه خروج میتوزی، ۱۰۹۶
شبکه سارکوپلاسمی، ۵۵۸
شبکه ندوپلاسمی صاف، ۴۷۲
شرایط هیپوکسیک، ۳۴۰
شکست نمونه‌های فریزشده، ۹۹۸
شمارشگرهای، ۱۲۹
شوگوشین، ۱۱۰۵
شیار تقسیم، ۹۷۰
شیب الکتروشیمیایی، ۵۴۷
شیب چگالی، ۴۹۵
شیمیواسمزیس، ۵۹۳
شیمیولومینسانس، ۱۲۸

ص

صفحات فرضی، ۱۱۹۰
ضد فولات‌ها، ۵۰۸
ضربه بازیابی، ۹۵۶
ضربه ـ تعقیب، ۱۳۰
ضربه قوی، ۹۰۵
ضربه مؤثر، ۹۵۶
ضریب شکست، ۴۸۰
ضعیف شدن، ۱۳۴۴

ط

طیف‌سنج تاندوم، ۱۳۷
طیف‌سنجی، ۱۳۵

ظ

ظرفیت بافری، ۶۹

ع

عاری از ژن، ۲۸۲
عامل ضدخاتمه، ۳۴۰
عامل عمومی نسخه‌برداری، ۱۵۴
عدد تبدیل، ۱۰۵
عرضه‌کننده آنتی‌ژن، ۱۲۹۱
عرضه متقاطع، ۱۳۲۲

عملکرد پروتئین کینازی، ۳۴۰
عناصر Alu، ۲۹۶
عناصر IS، ۲۸۸
عناصر پاسخ، ۳۴۰
عناصر شبه رتروویروس، ۲۹۱
عناصر متحرک، ۱۸
عنصر انتقال ساختاری، ۴۳۷
عنصر پاسخ به Rev، ۴۳۷
عنصر پروموتری پایین دست، ۳۴۰
عنصر پلی‌آدنیلاسیون سیتوپلاسمی، ۴۴۳
عنصر نزدیک پروموتر مرکب، ۳۴۰
عوامل آغاز ترجمه، ۱۷۲
عوامل رونویسی عمومی، ۳۴۰
عوامل سیگما، ۳۴۰
عوامل طویل‌سازی، ۱۷۵

غ

غالب منفی، ۱۳۹۰
غالبیت منفی، ۸۳۹
غشاپایه، ۱۰۰۸
غشای پلاسمایی، ۲
غشای تیلاکوئیدی، ۶۳۲
غلاف آوندی، ۶۵۲
غلاف میلین، ۱۲۲۳، ۱۲۳۷
غلط‌گیری، ۳۰۶
غلظت بحرانی، ۸۸۶
غلظت بحرانی، ۹۳۶
غلظت بحرانی میسل، ۵۳۳
غنی از ژن، ۲۸۲
غیر جفت‌کننده، ۶۲۹
غیرقطبی، ۴۵

ف

فاز حالت پایدار، ۸۸۵
فاز طویل شدن، ۸۸۵
فاز هسته‌ای شدن، ۸۸۵
فاکتور اختصاصیت برش و پلی آدنیلاسیون، ۴۲۳
فاکتور ادامه‌دهنده منفی، ۴۱۰
فاکتور برش I، ۴۲۳
فاکتور برش II، ۴۲۳
فاکتور پراکنده، ۹۲۵
فاکتور پیش برنده بلوغ، ۱۰۵۰
فاکتور تبادل نوکلئوتید گوانین، ۷۷۹
فاکتور تحریک کلونی، ۱۱۲۷
فاکتور تعویض کننده نوکلئوئید گوانین، ۴۴۸
فاکتور تغییر دهنده رشد b، ۸۱۹
فاکتور a جفت‌یابی، ۷۳۲
فاکتور خارج‌کننده RNA، ۴۳۱
فاکتور خارج‌کننده هسته‌ای، ۴۳۱
فاکتور خروج، ۴۱۷
فاکتور رشد اپی‌درمی، ۹۲۰
فاکتور رشد تغییر شکل دهنده، ۱۱۲۷
فاکتور رشد مشتق از پلاکت، ۹۲۰
فاکتور رشد هپاتوسیتی، ۱۱۴۰
فاکتور سلول بنیادی، ۱۱۲۷
فاکتور محرک برش، ۴۲۳
فاکتور محرک هیپوکسی (HIF-1)، ۱۳۵۶
فاکتور مشتق از سلول استرومایی، ۱۱۲۷
فاکتور نکروزتوموری، ۱۱۲۷
فاکتورهای تروفیک، ۱۱۴۹
فاکتورهای تنظیمی ماهیچه، ۱۱۳۶
فاکتورهای رشد شبه انسولین ۱ و ۲ IGF-2 و IGF-1، ۷۷۱
فاکتورهای رونویسی، ۱۱۱۰
فاگوزوم، ۷۴۹
فاگوسیتوز، ۴۷۰
فاگوسیتوز، ۷۴۹
فاگوسیت‌ها، ۱۲۹۰
فتوسنتز، ۷۷
فتوسنتز، ۵۹۱
فتوسیستم I، ۶۳۴
فتوفسفریلاسیون چرخه‌ای، ۶۴۷
فراگموپلاست، ۹۷۱
فرایند پایان، ۱۵۷
فرضیه درون همزیست، ۵۱۶
فرضیه شیمیو اسموتیک، ۶۲۲
فرضیه همزیستی درونی، ۶۲۳
فرمامید، ۱۴۹
فرمین، ۸۹۰
فروگشت، ۹۳۹
فرومون‌ها، ۷۶۵
فسفاتاز PTEN، ۱۳۹۲
فسفریلاسیون در سطح سوبسترا، ۵۹۴
فسفوانول پیروات کربوکسیلاز، ۶۵۳
فسفواینوزیتیدها، ۹۲۵
فسفوتیروزین فسفاتاز، ۸۳۳
فسفوریلاسیون اکسیداتیو، ۵۹۳
فسفوریماگرها، ۱۳۰
فسفوفروکتوکیناز ـ 1، ۵۹۵
فسفوگلیسریدها، ۵۱۷
فسفولیپاز C، ۸۵۴
فسفولیپازها، ۵۲۴
فشار تورگر، ۵۵۳
فشار تورگور، ۱۰۲۰
فشار هیدرواستاتیک، ۴۷۵
فشردگی، ۱۱۷۷
فضای بین غشایی، ۵۹۹
فعال‌سازی پیش نوردی، ۵۹۶
فعال‌کننده آلوستریکی، ۵۹۶
فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی، ۹۱
فعال کنندهٔ، ۲۳
فعال‌گر کاتابولیتی، ۳۴۰
فعالیت غلط‌گیری، ۱۶۸
فعالیت ATPse فعال شده توسط اکتین، ۹۰۰
فعالیت هلیکازی، ۳۴۰
فلامین، ۸۹۸
فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید، ۵۹۴
فلس‌های جلبکی، ۷۳۷
فلورسین، ۳۴۰
فلوسایتومتری، ۴۹۸
فلوکسیتین، ۱۲۴۹
فنرتیغه‌ای، ۸۹۸
فورین، ۷۴۶
فولگن، ۳۲۷
فولیکول، ۱۱۶۸
فیبروبلاست، ۵۰۱
فیبروبلاست‌ها، ۵۰۰
فیبرونکتین، ۱۶۰، ۱۰۲۱
فیبرهای استرسی، ۸۸۱
فیبرین، ۱۶۰
فیلامنت‌های حد واسط، ۸۷۸
فیلامنت‌های حد واسط، ۹۷۲
فیلوپودیا، ۸۸۱، ۹۱۷
فیلوپودیا، ۱۲۷۱
فیلوژنتیک، ۲۸۲
فیلیپاز، ۵۲۴
فیلیپاز، ۵۶۷
فیمبرین، ۸۹۸

ق

قابلیت غلط‌گیری، ۱۳۹۸
قالب خواندن، ۱۶۵
قرارداد اصلی، ۱۴۳
قطب حیوانی، ۱۱۸۰
قطب گیاهی، ۱۱۸۰
قطبی، ۴۵
قطبیت، ۹۳۰
قطبیت سلولی، ۸۷۸
قطبین دوکی، ۹۳۲
قطعات اوکازاکی، ۱۸۲
قطع شده، ۹۲۷
قوس انعکاسی، ۱۲۳۷

ک

کاتابولیسم، ۷۷
کاتابولیسم، ۵۹۳
کاتالاز، ۶۰۷
کاتالیزور، ۶۵
کاتپسین‌ها، ۱۳۲۶
کادهرین، ۹۹۳
E ـ کادهرین، ۱۱۷۷
کارا، ۹۱۵

کارتاژنر، ۱۱۷۰
کاردیولیپین، ۵۴۱
کارسینوماها، ۱۳۵۲
کارسینومای سلول‌های پوششی، ۱۹۲
کارکوآل، ۱۰۳
کاروتنوئیدها، ۶۳۵
کاریوفرین، ۷۰۸
کاسپاز اثرگذار، ۱۱۵۶
کال رتیکولین، ۶۸۱
کالرتیکولین، ۱۳۲۲
کالری، ۷۲
کالمودولین، ۱۱۷
کالمودولین، ۵۶۳
کال‌نکسین، ۶۸۱
کالنکسین، ۱۳۲۲
کامبرت، ۳
کامیلوگلژی، ۴۷۳
کانال انتقالی، ۶۵۸
کانال‌های بدون دریچه، ۵۴۷
کانال‌های پتاسیمی در حال استراحت، ۵۷۲
کانال‌های دریچه‌دار، ۵۴۷
کانال‌های K+ غیردریچه‌دار، ۱۲۲۸
کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند، ۷۶۶
کاتتکتین، ۱۲۴۱
کاندنسین، ۱۰۶۵
کانکسین، ۴۸۳
کانورا بدیتیس الگانس، ۳۵
کاهش هتروزیگوسیتی، ۱۳۷۳
کایرال، ۴۴
کایرالیته، ۴۲
کایمریک، ۱۳۶۷
کُتامر، ۷۳۳
کراتین‌ها، ۹۷۳
کراسینگ‌آور، ۱۹۴
کراسینگ آور، ۱۱۰۱
کرامبین، ۵۰
کریبت، ۱۱۲۳
کرسنت، ۱۱۸۱
کرموزوم اتوزومی، ۲۵
کروماتوگرافی ایمونوافینیتی، ۱۲۶
کروماتوگرافی تعویض یونی، ۱۲۶
کروماتوگرافی تمایلی، ۱۲۶
کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی، ۱۲۴
کروماتوگرافی مایع، ۱۲۴
کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، ۱۳۳
کروموزوم، ۱۶
کروموزوم دو جهته، ۹۶۶
کروموزوم‌های پلی‌تن، ۳۳۰
کروموگرانین A، ۷۴۵
کروموگرانین B، ۷۴۵
کرومونما، ۳۲۵
کریستا، ۵۹۹
کریستالوگرافی اشعه X ، ۹۱
کریستالوگرافی اشعه x، ۴۹، ۱۳۴
کریستالوگرافی اشعه X، ۵۲۹
کسر پس زمینه‌ای، ۹۲۵
کشت دادن، ۴۶۸
کُشلا، ۱۲۶۱
کلاترین، ۴۹۶
کلاستر، ۷۲۶
کلامیدوموناس رینباردتی، ۳۰۷
کلامیدوموناس رینباردی، ۶۴۶
کلاه آکروزومی، ۱۱۶۹
کلاهک '۵، ۳۴۰
کلاهک جانوری، ۱۱۸۳
کلروپلاست‌ها، ۶۵۶
کلروفیل، ۴۷۷
کلروفیل a، ۶۳۷
کلروفیل b، ۶۳۵
کلروفیل سه‌گانه، ۶۴۶
کلسترول بد، ۵۴۰
کلشی سین، ۵۶۶
کلشی‌سین، ۹۴۰
کلودین، ۹۹۹
کلوفیبرات، ۶۰۶
کلون، ۲۰۱
کلون، ۴۶۸
کلون‌سازی، ۳۱
کمپلکس SWI/SNF، ۳۴۰
کمپلکس I، ۶۱۱
کمپلکس II، ۶۱۱
کمپلکس III، ۶۱۱
کمپلکس Arp2/3، ۸۹۰
کمپلکس پیش آغازی، ۳۴۰
کمپلکس پیش‌برنده آنافاز، ۹۶۱
کمپلکس توبروز اسکلروزیس، ۴۴۷
کمپلکس تولیدکننده اکسیژن، ۶۴۴
کمپلکس حلقه g- توبولین، ۹۳۴
کمپلکس حمله‌کننده به غشاء، ۱۲۹۱
کمپلکس حمله کننده به غشاء، ۱۳۳۷
کمپلکس خاموش‌کننده توسط RNA، ۴۴۰
کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین، ۴۱۰
کمپلکس سازگاری نسجی اصلی (MHC)، ۱۳۱۴
کمپلکس شناسایی درون آگزونی، ۴۲۰
کمپلکس Ca2+/کالمودولین، ۸۰۸
کمپلکس گلژی، ۴۷۳
کمپلکس محموله‌ای دو مولکولی، ۷۰۶
کمپلکس محموله‌ای سه مولکولی، ۷۰۷
کمپلکس منافذ هسته‌ای، ۴۳۱
کمپلکس منفذ هسته‌ای، ۷۰۲
کمپلکس‌های SWI/SNF، ۱۳۸۸
کمپلکس‌های پروتئینی چندشانه‌ای، ۳۲۲
کمپلکس‌های پیش آغازی رونویسی، ۳۴۰
کمپلکس‌های جمع‌کننده نور، ۶۳۵
کمپلکس هسته‌ای متصل‌شونده به کلاهک، ۴۲۴
کمپلمان، ۱۲۹۶
کم‌خونی داسی شکل، ۹۳
کمربند اتصالی، ۸۸۱، ۹۱۱
کمک فعال‌کننده، ۳۴۰
کمک مهارگر، ۳۴۰
کمندمانند، ۴۱۳
کموتاکسی، ۹۲۳
کموکاین، ۱۲۹۳
کموکاین ها، ۱۰۳۰
کموکاین‌های لانه گزینی، ۱۳۳۹
کنترل تنفسی، ۶۲۹
کنترل ژنی، ۳۴۰
کنترل کیفی، ۴۳۳
کوآنزیم، ۱۰۹
کوآنزیم Q، ۶۱۲
کوچاپرون، ۹۸
کوچاپرونین، ۹۹
کورتکس سلولی، ۸۸۱
کوردین، ۱۱۸۰
کوفاکتور، ۱۰۷
کوفیلین، ۸۸۷
کولین استیل ترانسفراز، ۱۲۴۶
کونژوگه‌کننده یوبی‌کوئیتین، ۱۱۴
کونوتوکسین‌ها، ۱۲۵۰
کوهسین، ۱۰۶۸
کویل کویل، ۸۵
کیاسماتا، ۱۱۰۱
کیمری، ۴۷۸
کیناز ATM، ۱۳۹۰
کیناز MAP/ Ras، ۸۴۱
کیناز MAP/RTK/Ras، ۸۴۱
کیناز وابسته به سیکلین، ۹۴۳
کینازها، ۷۹۴ - GPCR
کینازها، ۸۶۶ MMP
کینازهای، ۸۲۵ JAK
کینازهای وابسته به سیکلین، ۱۰۴۴ ، ۱۱۳۹ ، ۱۸۵
کینزین ۱-، ۹۴۶
کینزین‌ها، ۹۴۴
کینه‌توکورها، ۹۶۱

گ

گاستدیوسین، ۱۲۶۴
گاسترولاسیون، ۱۱۶۴، ۱۱۷۸
گامت‌های نر و ماده، ۱۱۶۴

گرآنزیم، ۱۲۹۳، ۱۳۳۷
گرانولوسیت‌ها، ۱۱۲۶
گردهمایی، ۹۶۱
گرماده، ۷۳
گرماگیر، ۷۳
گروه با تحرک بالا، ۳۲۶
گروه پروستاتیک، ۱۰۷
گروه پروستتیک، ۶۱۱
گروه سولفیدریل، ۵۵
گرههای کاذب، ۱۵۱
گزرودرما پیگمینتوزوم، ۱۹۲
گزنوپوس، ۱۱۴۱
گزنوپوس گوسه کوئید، ۱۱۸۱
گزنوپوس لویس، ۳۴۰
گلوتامات یا استیل‌کولین، ۱۲۲۶
گلوکز تخمیر، ۵۹۶
گلیا، ۱۲۲۳
گلیکوزآمیوگلیکان ها، ۱۰۱۶
گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول، ۶۷۴
گلیکوژن، ۲۳
گلیکولیز، ۵۹۳
گلیومدین، ۱۲۴۱
گلیویک، ۱۴۰۳
گوانیدین هیدروکلراید، ۹۶
گیرنده، ۴۶۹
گیرنده جفت شده با G- پروتئین، ۷۶۶
گیرنده خروج از ـ هسته، ۷۰۷
گیرنده گلوکوکورتیکوئید، ۳۴۰
گیرنده ورود ـ هسته‌ای، ۷۰۶
گیرنده‌ها، ۵۱۱
گیرنده‌های استروژنی و گلوکوکورتیکوئیدی، ۳۴۰
گیرنده‌های تیروزین کیناز، ۱۳۷۷
گیرنده‌های تیروزین کینازی یا RTKs، ۸۱۲
گیرنده‌های سیتوکین‌ها، ۸۲۵
گیرنده‌های شبه - تول، ۱۳۲۵
گیرنده‌های مکانیکی، ۱۲۶۰
گیرنده‌های هسته‌ای، ۳۴۰

ل

لاترال، ۵۰۵
لاترونکولین، ۸۹۵
لاملی‌پودیوم، ۸۸۱، ۹۱۷، ۱۲۷۱
لامین، ۴۷۶
لامین‌ها، ۹۷۳
لامین هسته‌ای، ۷۰۳
لامینین، ۹۸۹
لایه، ۵۱۳
لایه آبپوشی، ۴۷
لایه پایه، ۹۷۴
لایه زایشی، ۱۱۱۲
لبه پیشرو، ۸۸۱
لبه رأسی اکتودرم، ۱۲۱۵
لکتین اتصالی مانوز، ۱۲۹۲
لکوترین‌ها، ۱۲۹۴
لکه عدسی، ۳۴۰
لکه‌گذاری وسترن، ۱۲۷
لنفوسیت‌ها، ۱۲۸۹
لنفوما، ۱۳۵۲
لوپوس اریتماتوس سیستماتیک، ۴۱۸
لوکمی، ۱۳۵۲
لوکمی پرمیلوسیت، ۴۶۳
لوکوس tat، ۳۴۰
لومن، ۴۶۹
لیپوزوم، ۵۱۳
لیزوزوم، ۷۱۵
لیزوزوم‌ها، ۲۰، ۴۶۹
لیزوژنی، ۲۰۵
لیستریا مونوسیتوژن، ۸۹۳
لیگاند گیرنده تیروزین کینازی ۳ شبه fms، ۱۱۲۷

م

ماتریکس خارج سلولی، ۲۰
ماتریکس خارج سلولی، ۴۶۹
ماتیاس شلایدن، ۴۶۷
ماچوراز، ۴۲۲
ماده‌پری سانتریولی، ۹۳۳
مادین ـ داربی کانین کلیه، ۷۴۷
مارپیچ ـ دور ـ مارپیچ، ۸۹
مارپیچ دو شروعه، ۳۱۶
مارکرهای زیستی، ۱۳۸
ماسکین، ۴۴۴
ماشین چینش و تجمع، ۶۹۵
ماشین‌های مولکولی، ۸۱
ماکروفاژها، ائوزینوفیل‌ها، ۱۱۲۷
DNA ماهواره‌ای، ۲۸۳
ماهیچه‌ای دوشن، ۱۰۲۷
متازون‌ها، ۹۸۳
متافاز، ۹۶۱
متالوپروتئازهای ماتریکس، ۸۷۰
مترادف، ۱۶۵
مثل استیگماسترول، ۵۱۹
مثل اوآباین، ۵۶۳
مثل فیلیپین، ۵۲۴
مجموعه آهن ـ سولفور، ۶۱۱
محدودیت MHC، ۱۳۱۸
محلول خام، ۴۹۶
محلول رقیق، ۵۵۴
محلول روبی، ۴۹۵
محلول‌های غلیظ، ۵۵۴
محیط گزینش، ۵۰۶
مخمر جوانه‌زن، ۹۰۳
RNA مداخله‌گر، ۴۰۹
RNA مداخله‌گر کوتاه، ۴۳۸
مدل multi-hit، ۱۳۵۹
مدل اویدیتی انتخابی سلول‌های T، ۱۳۳۴
مدل قطره روغن، ۸۶
مدل کرم خاکی، ۹۰۸
مراکز سازمان‌دهنده میکروتوبول‌ها، ۹۳۲
مرحله انباشت CO2، ۶۵۲
مرحله رهایش، ۹۳۷
مرحله لاروی، ۱۱۸۹
مرحلهٔ شفیرگی، ۱۱۸۹
مرکز نیوکوپ، ۱۱۸۰
مرگ برنامه‌دار سلول، ۱۱۵۰
مرگ سلولی برنامه‌دار، ۱۱۱۰
مرومیوزین سبک، ۹۰۰
مرومیوزین سنگین، ۹۰۰
مریستم انتهایی اندام هوایی، ۱۱۲۹
مزانشیم، ۱۱۶۵، ۱۱۷۷
مزوتلیوما، ۱۳۹۵
مزودرم، ۱۱۶۴
مزودرم حد واسط، ۱۲۱۵
مژک، ۵۱۶
مژک، ۹۵۴
مژک‌های شنوایی، ۱۲۶۳
مسیر C4، ۶۵۲
مسیر JAK/STAT ۱۳۳۸
مسیر اندوسیتوزی، ۷۱۴
مسیر اندونوکلئولیتیک، ۴۴۶
مسیر ترشحی، ۶۵۷
مسیر فرعی، ۱۲۹۲
مسیر کلاسیک، ۱۲۹۱
مسیر PI-3/PKB کیناز، ۸۵۷
مسیر وابسته به دآدنیلاسیون، ۴۴۵
مسیر وابسته به NAD(P)H دهیدروژناز، ۶۴۷
مسیر هجهوگ (Hh)، ۸۶۲
معادله هندرسون - هاسلباخ، ۶۸
مغلوب، ۱۳۷۱
مکانیسم، ۱۳۰۵
مکانیسم برش و اتصال، ۲۸۸
مکانیسم تغییر ناشی از اتصال، ۶۲۶
مکانیسم جبران مقداری، ۱۱۷۴
مکانیسم کپی و اتصال، ۲۸۸
مکانیسم‌های نظارت RNA، ۴۰۷
مکمل سازی ژنتیکی، ۲۷۵
مکمل شدن مولکولی، ۵۱
مگاکاریوسیت، ۸۲۷
ملانوزوم، ۹۵۱
ملانوفورها، ۹۵۱
ملانوما، ۱۹۲

ممان دو قطبی، ۴۶
منافذ هسته‌ای، ۴۷۵
منافذ هسته‌ای، ۷۰۲
منشأهای همانندسازی، ۱۸۲
منفذ ورودی عمومی، ۶۸۹
منفی ـ غالب، ۹۲۱
منوسدیم گلوتامات، ۱۲۶۳
موالونات، ۵۴۰
موانع، ۱۳۷۱
موتیف توالی، ۸۸
موتیف ساختاری، ۸۸
موتیف شناسایی RNA، ۴۱۲
موتیف مارپیچ ـ دور ـ مارپیچ، ۳۴۰
مورفوژن، ۱۱۸۱
موسکارینیک، ۷۸۹
موش‌های سوش کانژنیک، ۱۳۱۴
موقعیت باز لرزان، ۱۶۷
مولکول حرکتی، ۱۱۰
مولکول‌های جاروکننده، ۶۴۶
مولکول‌های چسبندگی سلول، ۲۰
مولکول‌های چسبنده سلولی، ۴۹۹
مونتژاک Reeves، ۳۲۷
مونتژاک هندی، ۳۲۷
مونوسیستروئیک، ۲۷۴
مهاجرت سلولی، ۹۱۷
مهار آنتی‌سنس، ۴۴۱
مهار با محصول نهایی، ۱۱۶
مهار با نور، ۶۴۶
مهار با واسطه کروماتین، ۳۴۰
مهار پس نورد، ۱۱۶
مهار جانبی، ۱۲۱۲
مهارکننده تنظیمی با هم، ۴۵۰
مهارکننده جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین، ۹۲۲
مهارکننده‌های آنزیمی، ۱۰۹
میاستنی‌گراویس، ۱۲۵۰
میانکنش‌های غیرکووالان، ۴۲
میانکنش‌های یونی، ۴۷
میتوز، ۹۵۹
میتوژن‌ها، ۱۳۸۷
میتوکندری، ۶۵۶
میتوکندری‌های، ۵۹۱
میراندا، ۱۱۴۵
میسل‌های کروی، ۵۱۳
میکرو RNA، ۱۵۴
میکرو RNA، ۴۳۸
میکرو RNA، ۱۱۱۵
میکروب، ۱۲۸۸
میکروتوبول، ۹۳۰
میکروتوبول واحد، ۹۳۱
میکروتوبول‌ها، ۸۷۸
میکروزوم‌های خشن، ۶۵۹
میکروسکوپ الکترونی کرایو، ۴۹۰
میکروسکوپ الکترونی نگاره، ۴۹۲
میکروسکوپ ترکیبی، ۴۷۸
میکروسکوپ مروری، ۴۸۱
میکروسکوپ نیروی اتمی، ۱۰۱
میکروسکوپی اختلاف تداخلی افتراقی، ۴۸۰
میکروسکوپی الکترونی کرایو، ۴۹۰
میکروسکوپی ایمونوفلورسانس، ۴۸۵
میکروسکوپی تداخلی نومارسکی، ۴۸۰
میکروسکوپی کانونی، ۴۸۶
میکروسکوپی کرایوالکترون، ۱۳۵
میکروسکوپی ویدئو فلورسانس، ۸۸۴
میکروفیلامنت‌ها، ۸۷۸
میکروگراف کرایوالکترونی، ۷۳۹
میکروویلی، ۸۷۸
میکروویلی‌ها، ۸۸۰
میلین التهابی حاد، ۱۲۴۱
مینی ماهواره، ۲۸۴
میوبلاست، ۵۰۰
میوتوم، ۱۲۱۲
میوتیوب، ۵۰۰
میوز، ۲۵
میوز، ۱۱۶۴
میوزین، ۹۰۰
میوفیبریل‌های، ۹۱۰

ن

نئو، ۹۱
ناپایداری دینامیکی، ۹۳۷
ناحیهٔ فعالیت قطبی، ۱۲۱۵
ناقل خروج از هسته I، ۴۳۱
ناقل غشایی فیبروزسیستیک، ۵۶۷
نام اگزوسیتوز، ۷۱۴
نام میکروویلی، ۵۸۷
نانوس، ۱۱۹۳
RNA ناهمگن هسته‌ای، ۴۱۱
نبولین، ۹۱۰
نترین ها، ۱۲۷۴
نُج، ۹۱
نسبت وظیفه‌ای، ۹۰۷
نشاسته، ۶۳۱
نشانه‌گذاری pulse-chase، ۷۱۷
نظارت mRNA، ۴۵۱
نقش‌پذیری ژنومی، ۱۱۷۲
نقشه چگالی الکترونی، ۱۳۵
نقشه رتینوتکتال، ۱۲۷۳
نقشه هیدروپاتی، ۶۷۵
نقطه انشعاب، ۴۱۳
نقطه ایزوالکتریک، ۱۲۴
نقطه کنترلی دوک تقسیم، ۹۶۷
نقطه محدودکننده، ۱۳۸۷
نقطه‌ی محدودکننده، ۱۰۸۳
نکروزسیس، ۱۱۵۱
نواحی اتصال به ماتریکس، ۳۲۳
نواحی تشدید کننده، ۲۷۳
نواحی شاخه‌دار، ۹۷۹
نواحی مرتبط به داربست، ۳۲۳
نوارهای G، ۳۲۸
نوترکیبی سوماتیک، ۱۳۰۴
نوترکیبی همولوگ، ۱۹۳
نوتروفیل‌ها، ۱۲۹۳
نوروپاتی چشمی وراثتی لبر، ۳۰۶
نوروتروفین‌ها، ۱۱۵۱
نوروفاسین ۱۵۵، ۱۲۴۱
نوروفاسین، ۱۲۴۱
نوروفیبروماتوزیس ۱، ۳۰۹
نوروفیبروماتوزیس، ۳۰۹
نوروفیلامنت‌ها، ۹۷۳
نوسیسپتورها، ۱۲۶۰
نوکلئوپورین، ۴۷۵
نوکلئوپورین‌ها، ۴۳۱
نوکلئوتید، ۱۴۴
نوکلئوزوم، ۳۴۰
نوکودازول، ۹۴۰، ۱۱۰۸
نوگین، ۱۱۸۰
نوماراسکی، ۱۱۱۳
نووارد، ۴۴
نیاسین، ۱۰۹
نیتروسلولز، ۱۲۷
نیتلا، ۹۱۵
نیدوژن، ۹۸۹
نیروگاه انرژی، ۴۷۷
نیروی محرکه پروتون، ۶۹۳
نیروی محرکه پروتونی، ۵۹۳
نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید، ۵۹۴
orexin-A و orexin-B، ۸۱۴

و

واحد رونویسی، ۲۷۴
واحد رونویسی ساده، ۲۷۵
واحدهای رونویسی پیچیده، ۲۷۵
وارون‌سازی ژنی، ۱۹۸
واسطه‌گر کمپلکس رونویسی، ۳۴۰
واکنش آکروزومی، ۱۱۷۲
واکنش انرژی‌خواه، ۷۳
واکنش انرژی‌زا، ۷۳
واکنش دهیدراسیون، ۵۳
واکنش‌های تاریکی، ۶۳۴
واکنش‌های ردوکس، ۷۸
وایمنتین، ۹۷۴
۲ و ۴ـ دی نیتروفنول (DNP)، ۶۳۰
وزیکول ترشحی، ۷۱۵

وزیکول‌های COPI، ۷۲۳
وزیکول‌های COPII، ۷۲۳
وزیکول‌های کلاترین، ۷۲۳
ویبریوکلرا، ۷۸۸
ویرایش RNA، ۴۳۰
ویروس تشکیل دهنده فوکوس طحال (SFFV)، ۱۳۷۷
ویروس سارکومای راس، ۷۶۰
ویروس لوکمیای تیره موشی، ۷۶۰
ویریون، ۱۹۹
وین بلاستین، ۵۶۶

هـ

هاپلوئید، ۲۵
هاپلوئید، ۱۱۶۴
هارمونین، ۱۲۶۳
هالوفیل‌ها، ۲
هانچ‌بک، ۱۱۹۳
RNA های راهنما، ۴۳۰
RNA های کوچک هستکی، ۴۵۵
هپارین، ۱۰۱۷
هتروپلاسمی، ۳۰۵
هتروکروماتین، ۳۴۰، ۴۷۶
هدف راپامایسین، ۴۴۶
هدف‌یابی پروتئین، ۶۵۶
هستک، ۴۷۶
هسته، ۴۷۵
هگزوکیناز، ۵۹۵
هماتوزایلن، ۴۸۴
هماگلوتینین، ۹۲
هم انتقال‌دهنده، ۵۴۹
هموژنات، ۴۹۲
همی دسموزمها، ۹۹۳
هوازی، ۵۹۴
هوازی اجباری، ۵۹۶
هومونکلوس، ۱۲۶۱
هومیوسیز، ۱۲۰۰
هیبریداسیون درجا، ۲۸۴
هیبریدوما، ۵۰۶
هیبریدوما، ۱۳۰۲
هیپرکرومیسیتی، ۱۴۹
هیپوتالاموس، ۸۱۴
هیپوتونیک، ۴۶۹، ۴۹۲
هیپوکسی، ۳۴۰
هیپوگزانتین، ۵۰۷
هیدروفوب، ۴۱
هیدروفیلیک، ۴۱
هیدرولازهای اسیدی، ۴۷۱
هیستون H3، ۳۴۰
هیستون استیلاز، ۳۴۰
هیستون استیلازها، ۳۱۹
هیستون داستیلاز، ۳۴۰

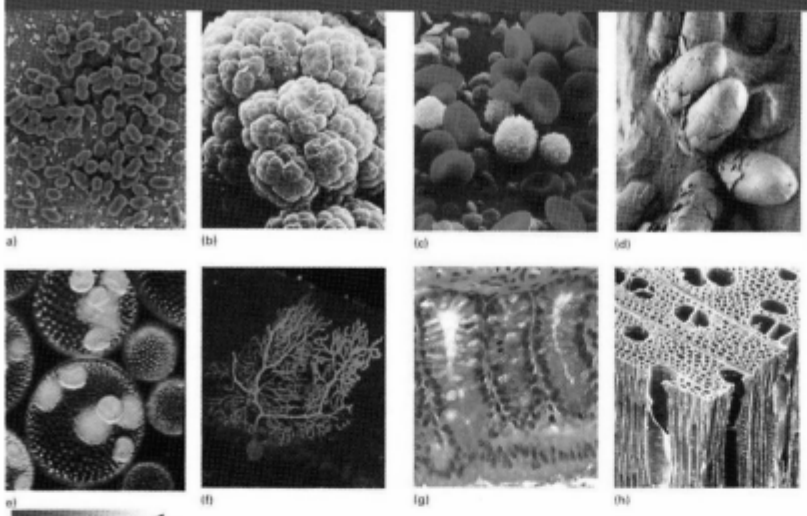
ی

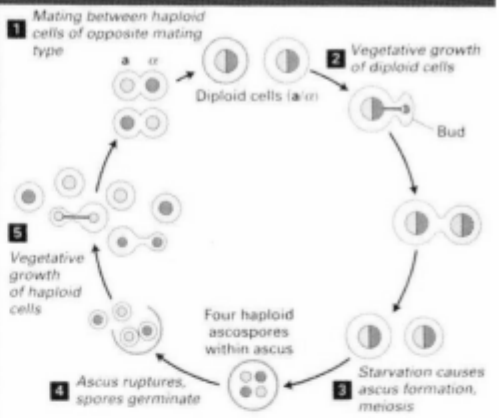
یاگیمسا، ۳۲۷
یک اپرون، ۱۵۸
یک پروتئین اتصال شونده به جعبه TATA، ۳۴۰
یک روش رله‌ای، ۱۱۸۱
یوبیکوئیتین لیگاز E3، ۸۴۰
یوبی‌کیتون، ۶۱۲
یوکروماتین، ۳۴۰

ADAM، ۸۷۰
ADAM9، ۸۷۱
AIF، ۱۱۵۶
AIRE، ۱۳۳۵
AP1، ۳۴۰
AUG، ۱۷۳
Apaf-1، ۱۱۵۵
Arm، ۱۱۱۹
Ash1، ۱۱۴۳
Ash1p، ۱۱۴۷
B DNA، ۱۴۸
BCECF، ۶۵۵
BDNF، ۱۱۵۲
BMP، ۸۱۹
BPP، ۱۱۴۴
BRCA-1، ۱۳۸۹
BRF، ۳۴۰
Bazooka، ۱۱۴۴
Bcl-2، ۱۱۵۳
Bcr-Abl، ۱۳۸۰
Boss، ۸۴۳
CAP، ۳۴۰
CBP، ۳۴۰
CDK9، ۳۴۰
COPII، ۸۷۳
CRE، ۸۵۹
CREB، ۳۴۰
CRP، ۳۴۰
CTD، ۳۴۰
Catabolite activator protein، ۳۴۰
Catabolite receptor protein، ۳۴۰
Ci، ۸۶۵
Co-Smad، ۸۲۲
Comm، ۱۲۷۹
Cos2، ۸۶۵
DAG، ۸۰۸
DNAse I، ۳۴۰
DSL، ۱۱۴۵
Dishevelled، ۸۶۱
Dkk، ۱۱۲۲
Dnmt1، ۱۱۱۶
Dpp، ۸۲۰
Dsh، ۸۶۱
E.Coli، ۲۸۸
E2A، ۱۱۳۶
EGF، ۸۳۹
EGR1، ۳۴۰
EMS، ۱۱۱۳
EMSA، ۳۴۰
ERE، ۳۴۰
ES، ۱۱۷۷
Emc، ۱۲۱۱
FADD، ۱۱۶۰
FGF، ۸۵۳
Fas، ۱۱۶۰
Frzb-1، ۱۱۸۱
Fu، ۸۶۵
Fus3، ۸۵۰
GATC، ۳۴۰
GCN4، ۳۴۰
GFAP، ۱۱۲۵
GLUT4، ۸۱۳
GLi3، ۱۲۱۷
GM-CFC، ۱۱۲۷
GRB2، ۸۴۳
GRE، ۳۴۰
Gai، ۷۸۸
Gas، ۷۸۸، ۷۹۵
Gat، ۷۹۴
Germ line، ۱۱۱۲
Gs، ۷۸۸
HB-EGF، ۸۳۶، ۸۷۱
HER1، ۸۳۶
HER1,2,3، ۸۳۸
HER3، ۸۳۶
HER4، ۸۳۶
HGPRT، ۸۳۲
HIS3، ۳۴۰
HIV، ۳۴۰
HLA-A، ۱۳۱۹
HLA-B، ۱۳۱۹
HLA-C، ۱۳۱۹
HMGI، ۳۴۰
HML، ۳۴۰
HMR، ۳۴۰
HP1، ۳۴۰
Hog1، ۸۵۱، ۸۵۲

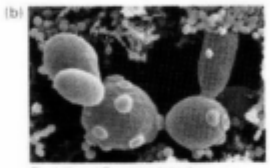
Hoxa10، ۱۲۰۳
Hoxc10، ۱۲۰۳
Hoxd 11، ۱۲۱۷
Hoxd 13، ۱۲۱۷
Hoxd 13، ۱۲۱۷
Hoxd10، ۱۲۰۳
Htra2/omi، ۱۱۵۶
IFN-g، ۱۳۳۹
IFT، ۸۶۵
IP3/DAG، ۸۵۴
IPLG، ۱۱۴۴، ۱۱۴۷
Igf-2، ۱۱۷۴
Igf-2r، ۱۱۷۴
Imp-b، ۸۲۳
Insig-1، ۵۴۰
Insig-2، ۵۴۰
Izumo، ۱۱۷۲
JAK/STAT، ۸۳۴
JAK2، ۸۳۲
Jagged-1، ۸۷۰
Jagged-2، ۸۷۰
Jun/ATF2، ۳۴۰
KAP1، ۳۴۰
Ksr، ۸۵۱
L'sc، ۱۱۴۰
LAP، ۸۲۰
LOCO، ۱۱۴۷
LTRs، ۲۹۰
Lacz، ۳۴۰
Limeys، ۱۰۱۴
Lunatic Fringe، ۸۷۰
MADS، ۱۱۳۱، ۱۱۳۸
MAT، ۳۴۰
MATa، ۱۱۳۱
MCM1، ۱۱۳۱
MEF، ۱۱۳۸
MEF1، ۱۱۳۹
MH2، ۸۲۲
MHC، ۱۲۸۸
MLH1، ۱۹۱
MMTV، ۸۶۰
MRF، ۱۱۳۸
MSH2، ۱۹۱
Manic Fringe، ۸۷۰
NELF، ۳۴۰
NF-AT، ۱۳۳۲
NF-kB، ۸۶۸
NF-kb، ۳۴۰
NFAT، ۳۴۰
NFAT، ۸۰۸
NO، ۸۰۹
NPC1، ۸۶۳
NPC1LI، ۸۶۳
NT-3، ۱۱۵۲
Nanog، ۱۱۱۶
Nicastrin، ۸۷۰
Niches، ۱۱۱۶، ۱۱۱۸
Nkx2.5، ۱۱۸۴
Noggin، ۱۱۲۳
NtrB، ۳۴۰
NtrC، ۳۴۰
ORN، ۱۲۶۶
Oct4، ۱۱۱۶
P21/P27، ۱۱۲۰
P300، ۳۴۰
PAI-1، ۸۲۳
PCNA، ۱۸۴
PDGF، ۸۵۳
PDK1، ۸۵۶
PDK2، ۸۵۶
PIP2، ۸۵۴
PKA، ۷۹۶
PKB، ۸۵۶
PRC1، ۳۴۰
PRC2، ۳۴۰
PTB، ۸۴۴
Par6، ۱۱۴۴
Pbs2، ۸۵۱
PhoB، ۳۴۰
PhoR، ۳۴۰
Pins، ۱۱۴۷
Pitx2، ۱۱۸۷
Piwi، ۱۱۳۰
R-Smad، ۸۲۲
RAG1، ۱۳۰۴
RAG2، ۱۳۰۴
RAP1، ۳۴۰
RGS، ۷۸۵
RI، ۸۲۲
RIII، ۸۲۲
RNA، ۵۰۵
RPB1، ۳۴۰
RPB2، ۳۴۰
RPD3، ۳۴۰
RXR، ۳۴۰
RXR-RAR، ۳۴۰
RXR-VDR، ۳۴۰
Rab3، ۱۲۴۶
Rad51، ۱۹۵
Radical fringe، ۸۷۰
Ras، ۸۴۱
Rfc، ۱۸۴
SAGA، ۳۴۰
SALL1، ۳۴۰
SAM، ۱۱۳۹
SCAP، ۸۷۲
SCAP/SREBP، ۸۷۳
SET، ۳۴۰
SF/HGF، ۱۱۴۰
SH3، ۸۴۴
SHP1، ۸۳۳
SIN3-RPD3، ۳۴۰
SIR2، ۳۴۰
SIR3، ۳۴۰
SIR4، ۳۴۰
SMAC/DIABLO، ۱۱۵۶
SNAP-25، ۱۲۴۸
SOCS، ۸۳۳
SOP، ۱۲۱۳
SP1، ۳۴۰
SPT4، ۳۴۰
SPT5، ۳۴۰
SRE، ۸۴۹
SREBP، ۸۷۱
SREBP-1a، ۸۷۴
SREBP-1c، ۸۷۴
SRF، ۳۴۰
SRP، ۳۴۰
STAT، ۸۲۵
SW15، ۳۴۰
SWI/SNF، ۱۳۸۸
SWI5p، ۱۱۴۳
Samd3/Smad4، ۸۲۳
Ski، ۸۲۴
Slimb، ۸۶۴
Slit، ۱۲۷۹
Smad، ۸۱۹
Smad2، ۸۲۲
Smad2/Smad4، ۸۲۳
Smad3، ۸۲۲
Smoothened، ۸۶۵
SnoN، ۸۲۴
Sop، ۱۲۱۱
Sos، ۸۴۳
Sox2، ۱۱۱۶
Ste11، ۸۵۱
Ste7، ۸۵۰
Su(H)، ۸۷۰
T1R1، ۱۲۶۶
TBP، ۳۴۰
TCF، ۳۴۰
TCF، ۸۶۱
TFIIA، ۳۴۰

TFIIB، ۳۴۰
TFIID، ۳۴۰
TFIIE، ۳۴۰
TFIIF، ۳۴۰
TFIIH، ۳۴۰
TFIIIA، ۳۴۰
TFIIIB، ۳۴۰
TFIIIC، ۳۴۰
TGFb، ۸۱۹
TNF، ۱۳۳۹
Transmitter، ۳۴۰
Trk، ۱۱۵۲
TrkB، ۱۱۵۲
TrkC، ۱۱۵۲
Trophectoderm، ۱۱۱۲
Tsix، ۱۱۷۴
URS، ۱۱۳۱
Unc40، ۱۲۷۸
Unc5، ۱۲۷۸
VASP، ۸۹۴
WT1، ۳۴۰
Wif، ۱۱۲۲
Wnt، ۸۶۰
Wnt، ۱۲۸۲
Xist، ۱۱۷۴
ZP1، ۱۱۷۱
ZP2، ۱۱۷۱
ZP3، ۱۱۷۱
Zpg، ۱۱۱۹
Zwille/Pinhead، ۱۱۳۹
aniridia، ۳۴۰
aph_۱، ۸۶۹
bulge، ۱۱۲۰
c-myc، ۱۳۶۰
cGMP، ۸۱۰
ced-9/ced-3، ۱۱۵۵
egl-1، ۱۱۵۵
eve، ۱۱۹۶
even-skipped، ۱۱۹۶
glnA، ۳۴۰
hes7، ۱۱۹۹
insig-1، ۸۷۲
insig-2، ۸۷۲
knirps، ۱۱۹۴
kruppel، ۱۱۹۴
let-7، ۱۱۱۵
lin-14، ۱۱۱۵
lin-4، ۱۱۱۵
linin-1، ۸۶۹
minichromosom، ۱۸۵
mtDNA، ۳۴۰
myf5، ۱۱۴۰
myoD، ۱۱۳۹
oskWT، ۱۲۲۱
oskX، ۱۲۲۱
oskar، ۱۲۲۰
p21CIP، ۱۳۹۰
p300/CBP، ۱۱۳۸
p53–/p53–، ۱۳۹۰
p75NTR، ۱۱۵۲
pen_۲، ۸۶۹
vanilla plain، ۱۱۶۰
pre-rRNA، ۳۴۰
presenilin، ۸۷۰
ptc، ۸۶۳
rRNA، ۳۴۰
rasV12، ۱۳۶۰
rp49، ۱۲۲۱
sFRP، ۱۱۲۲
sFRP2، ۱۱۸۱
sc، ۱۱۴۰
sevenless، ۸۴۳
she2p، ۱۱۴۳
she3p، ۱۱۴۳
smo، ۸۶۳
stump، ۸۷۰
t-SNARE، ۷۲۲
tailles، ۱۱۹۴
tectum، ۱۲۸۲
tinman، ۱۱۸۴
umami، ۱۲۶۳
v-SNAREs، ۷۲۲
wingless، ۸۶۲
zebrafish، ۱۱۸۸
Na+/K+ ATPase، ۵۶۴
HP1 ، ۳۴۰
Wnt-1 ، ۸۶۰
giant ، ۱۱۹۴
nonsense-mediated (NMD) ، ۴۵۱

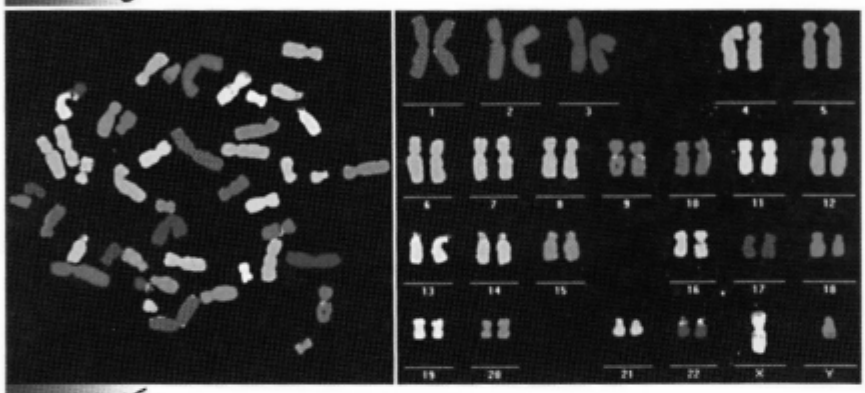




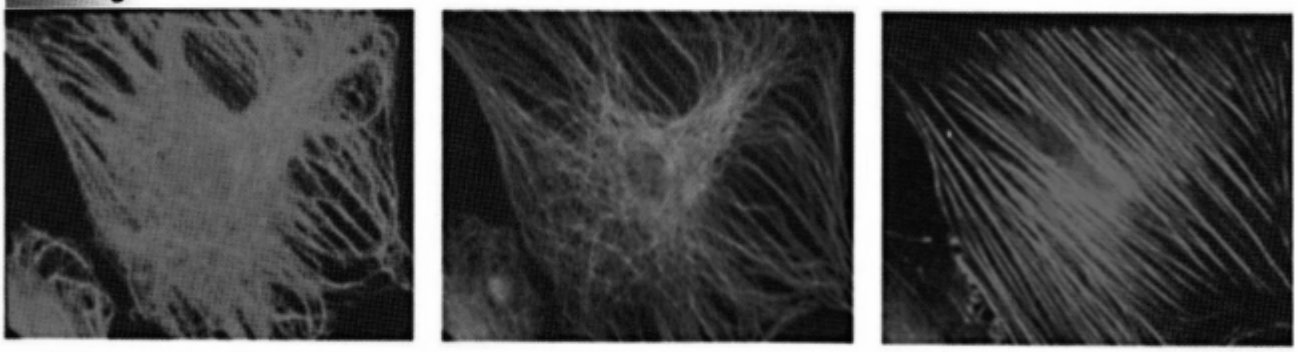
شکل ۱-۱



شکل ۶-۱

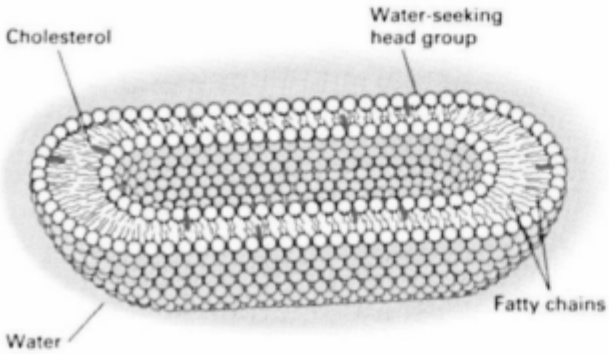


شکل ۱۲-۱



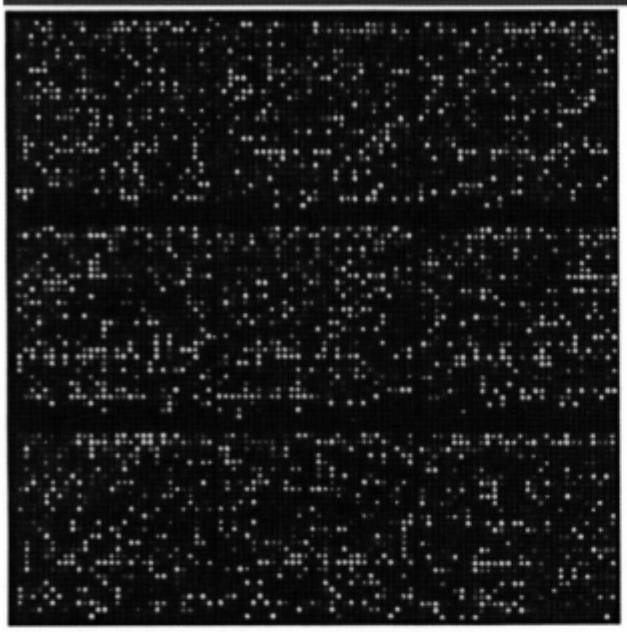
Intermediate filaments **Microtubules** **Microfilaments**

شکل ۱۵-۱

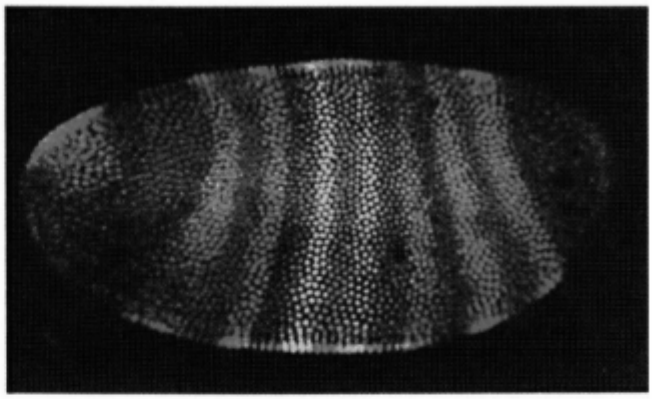


شکل ۱۳-۱

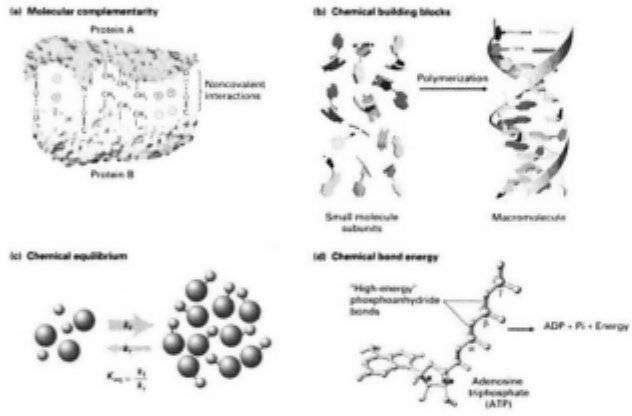
شکل ۲۱-۱



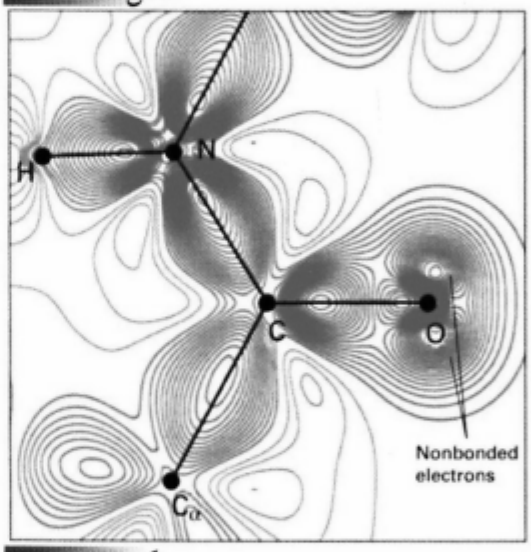
شکل ۲۳-۱



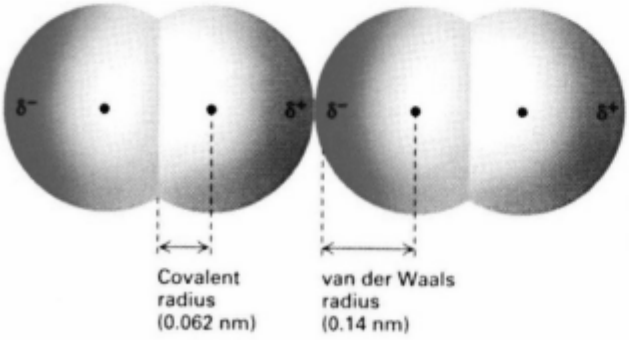
شکل ۲۴-۱



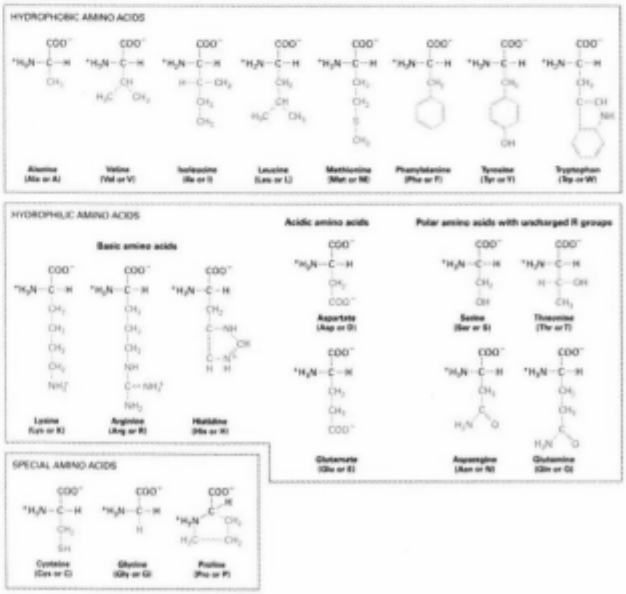
شکل ۱-۲



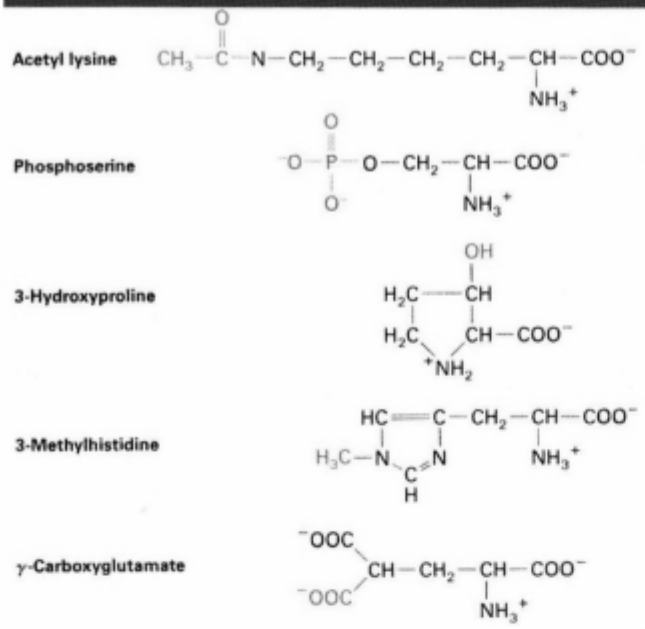
شکل ۹-۲



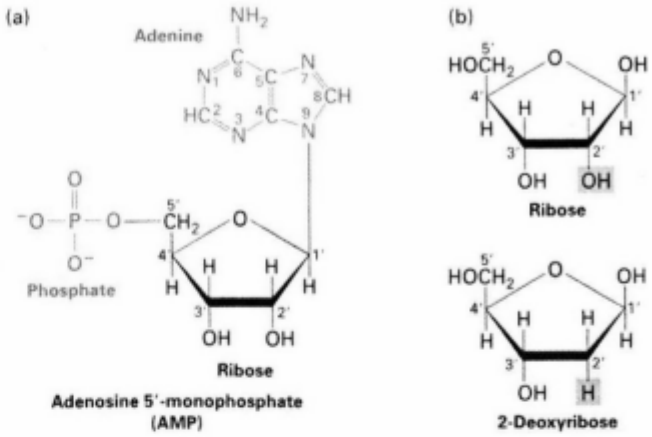
شکل ۱۰-۲



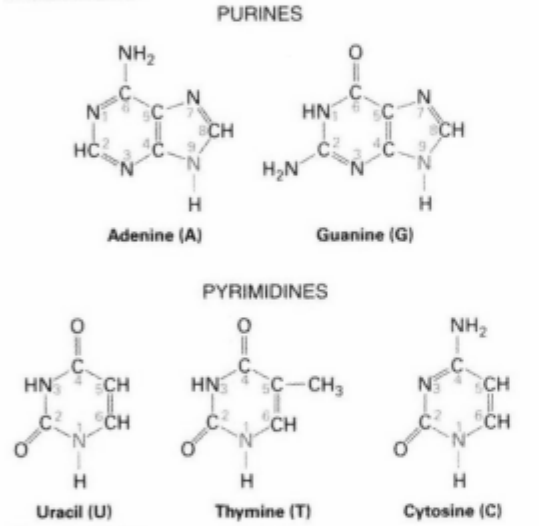
شکل ۱۴-۲



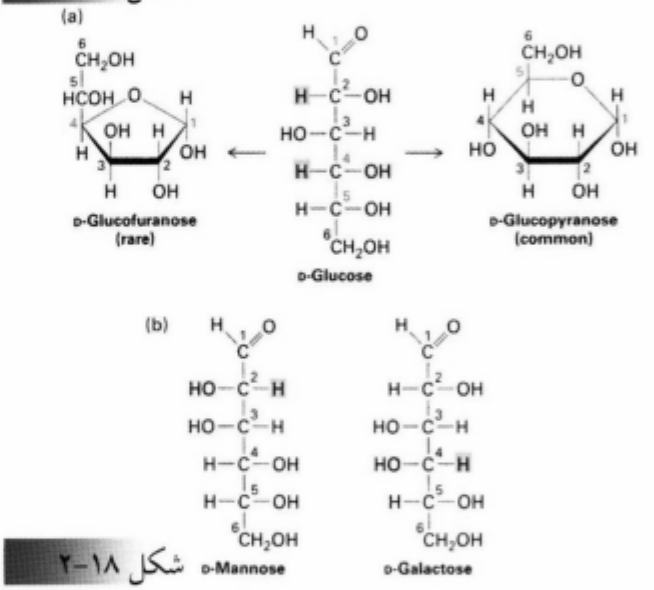
شکل ۲-۱۵



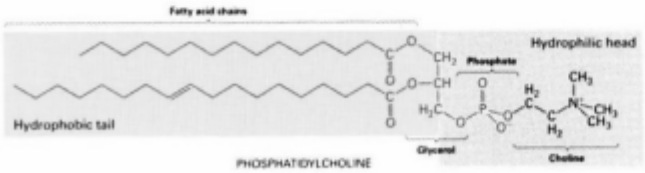
شکل ۲-۱۶



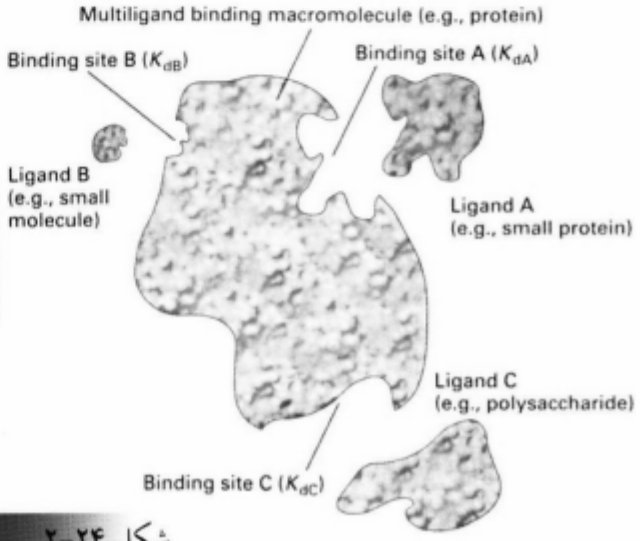
شکل ۲-۱۷



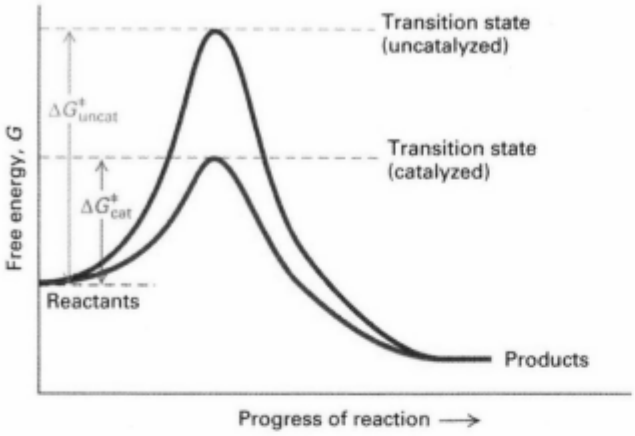
شکل ۲-۱۸



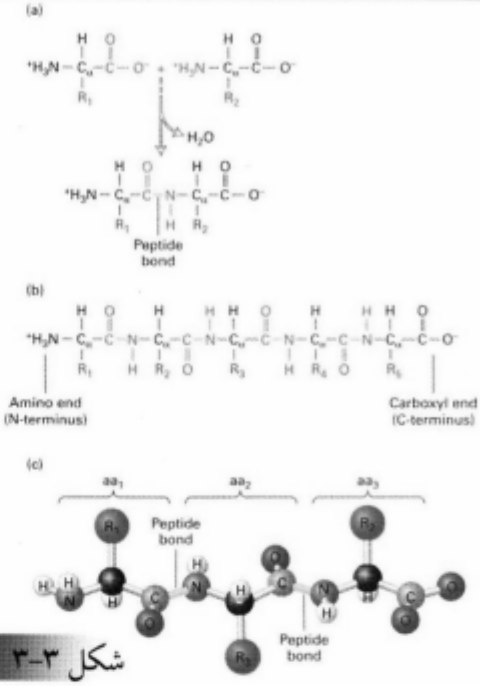
شکل ۲-۲۰



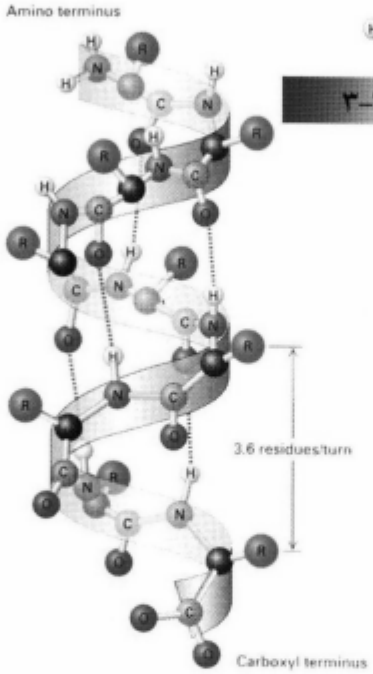
شکل ۲-۲۴



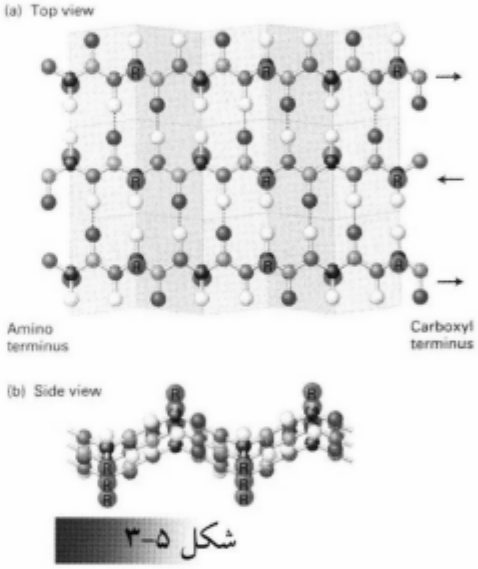
شکل ۳۰-۲



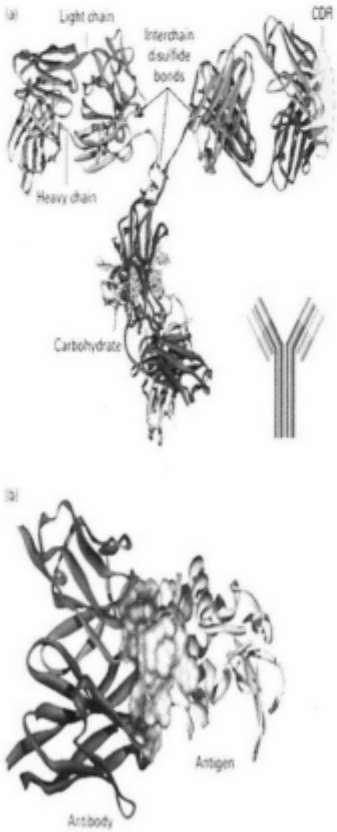
شکل ۳-۳



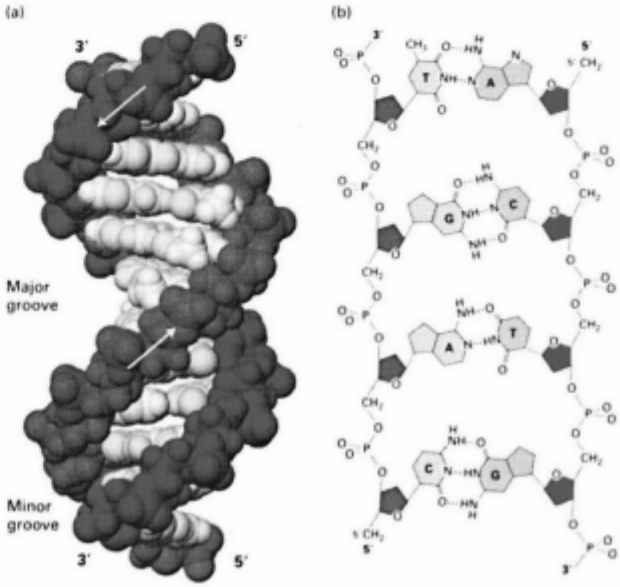
شکل ۳-۴



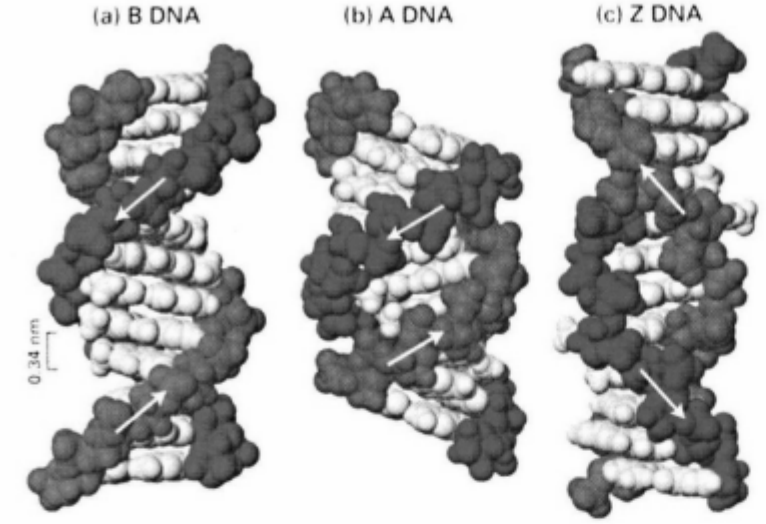
شکل ۳-۵



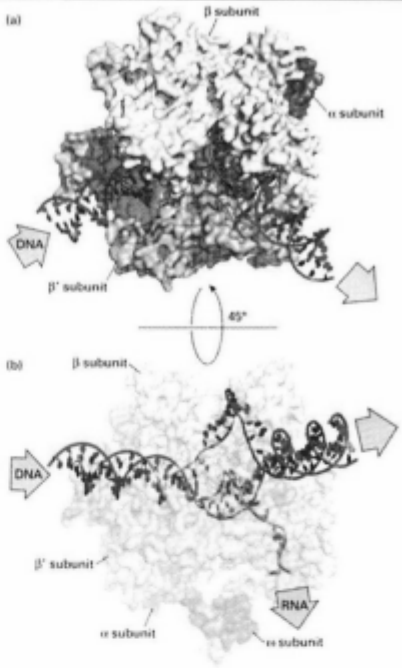
شکل ۳-۱۹



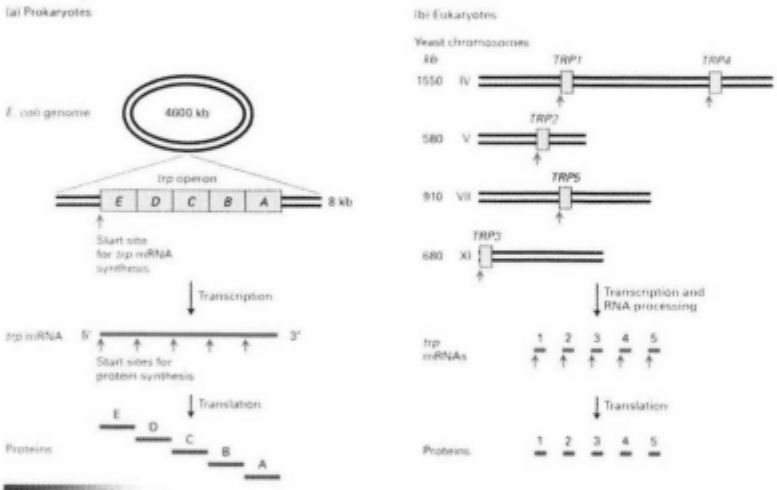
شکل ۳-۴



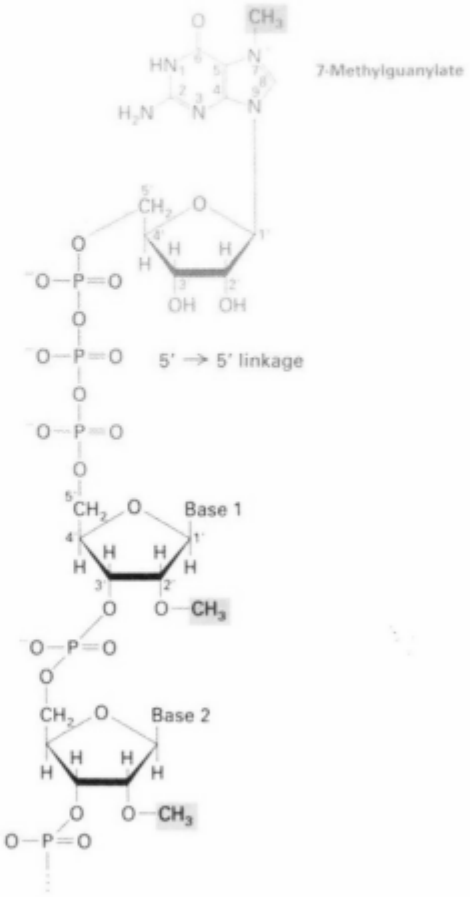
شکل ۴-۴



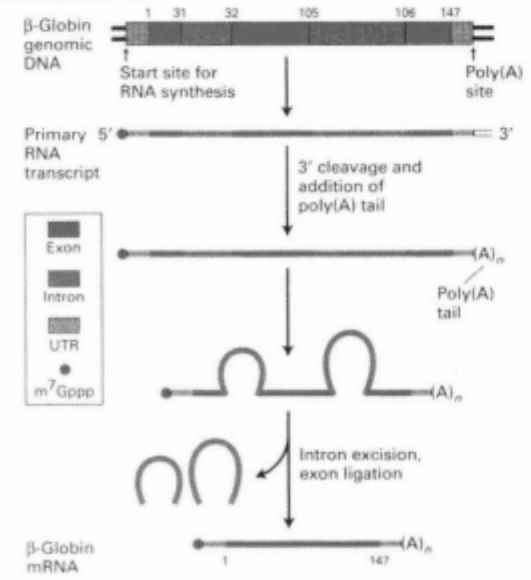
شکل ۴-۱۲



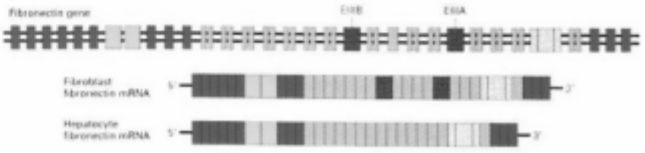
شکل ۴-۱۳



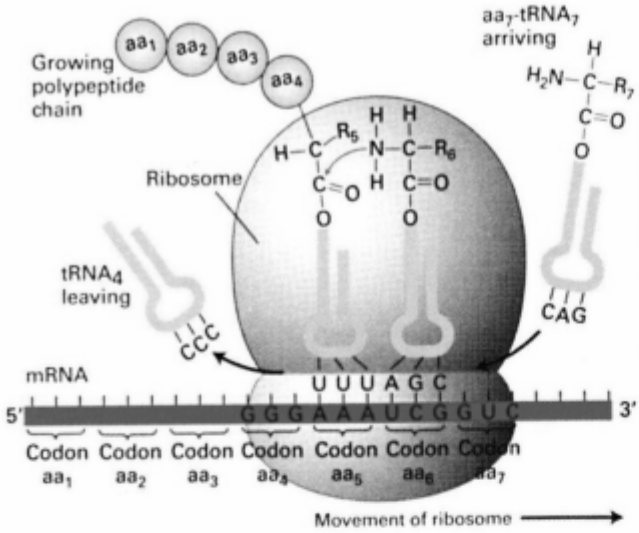
شکل ۴-۱۴



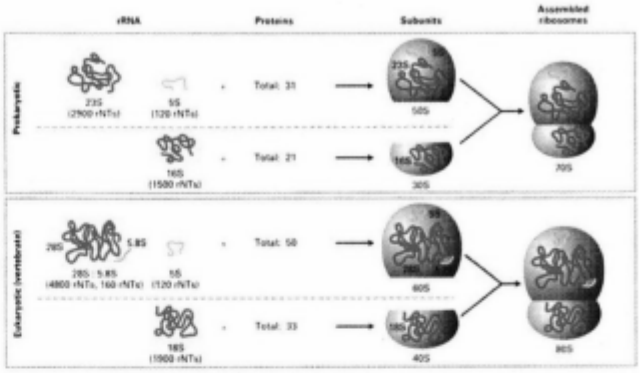
شکل ۴-۱۵



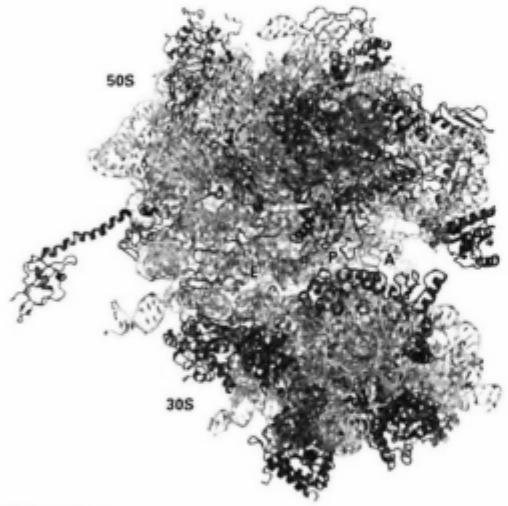
شکل ۴-۱۶



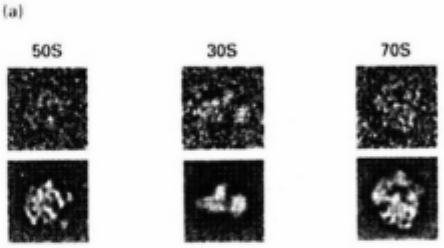
شکل ۴-۱۷

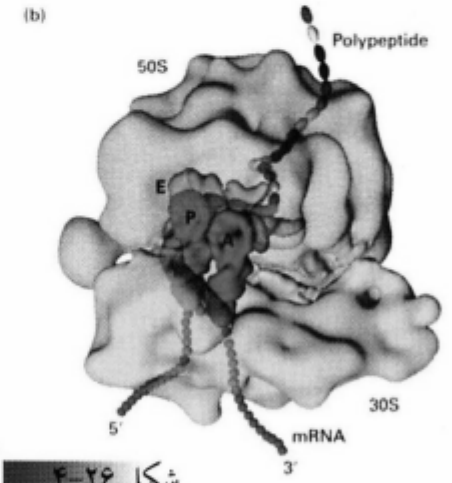


شکل ۴-۲۲

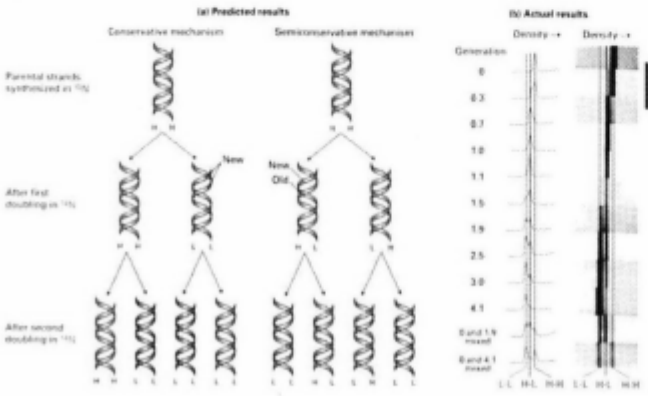


شکل ۴-۲۳

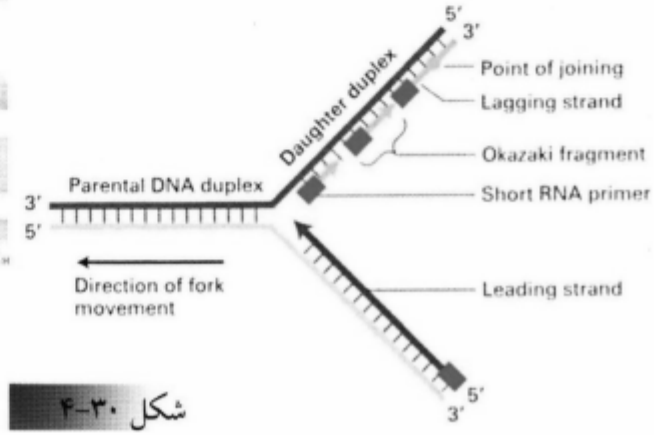




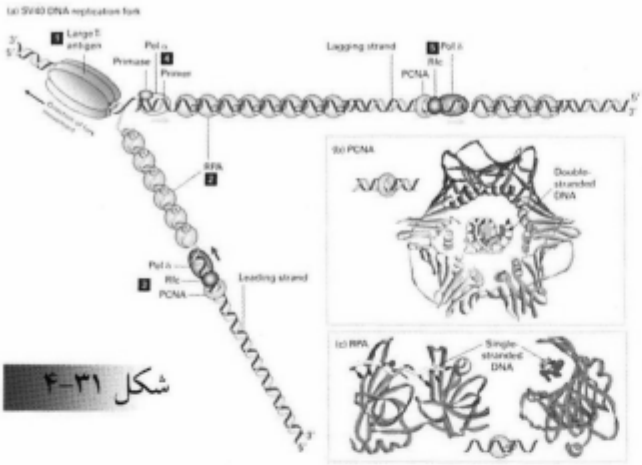
شکل ۴-۲۶



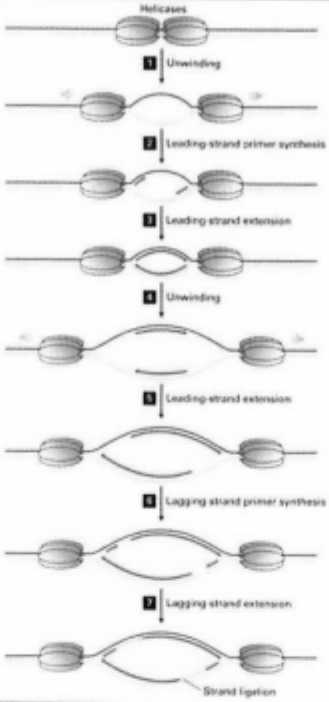
شکل ۴-۲۹



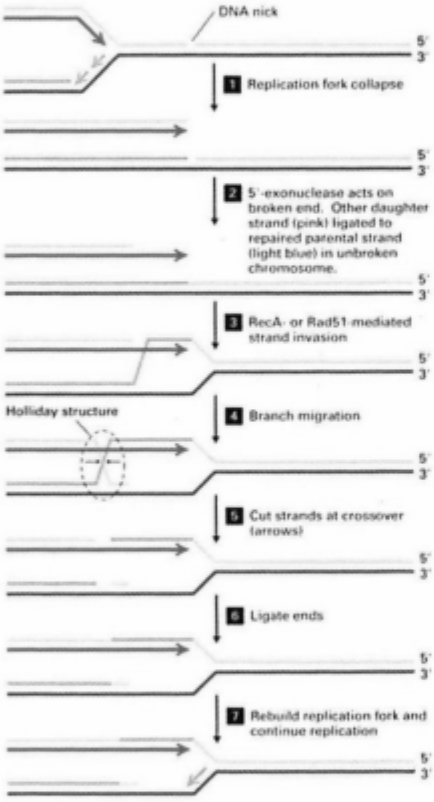
شکل ۴-۳۰



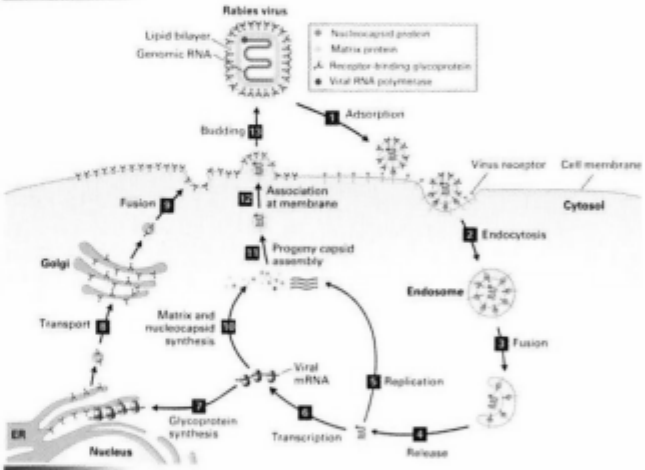
شکل ۴-۳۱



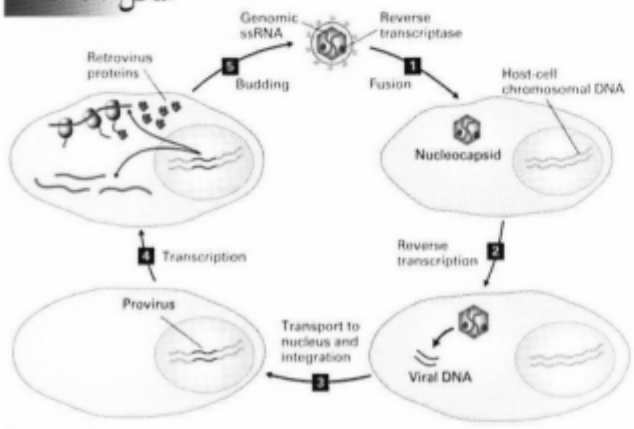
شکل ۴-۳۳



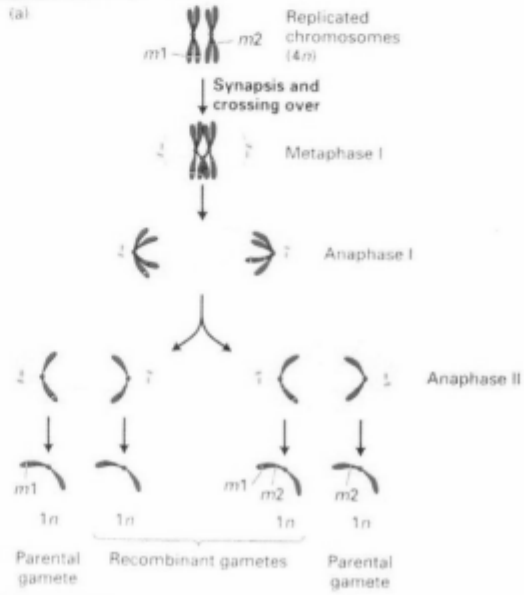
شکل ۴-۴۱



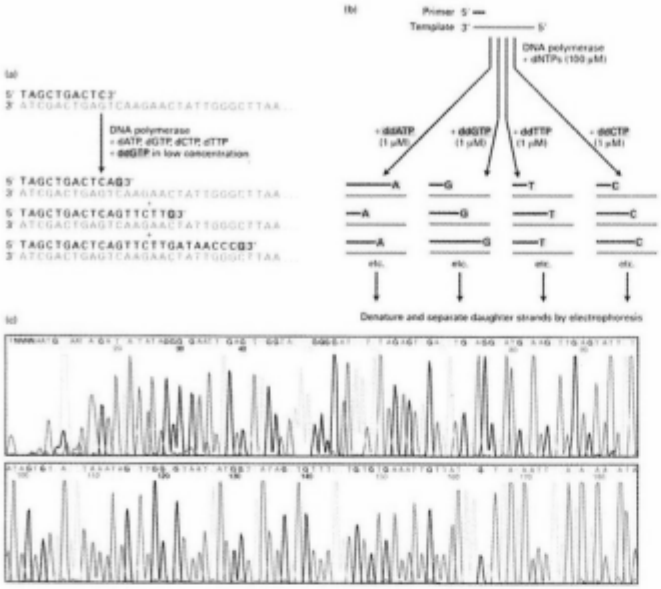
شکل ۴-۴۷



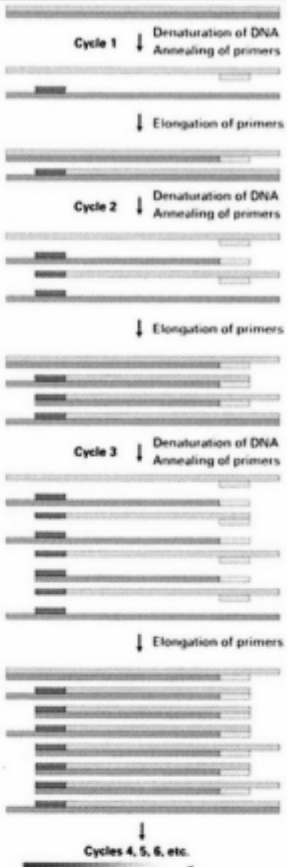
شکل ۴-۴۹



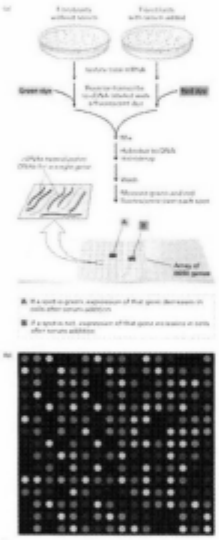
شکل ۵-۱۰



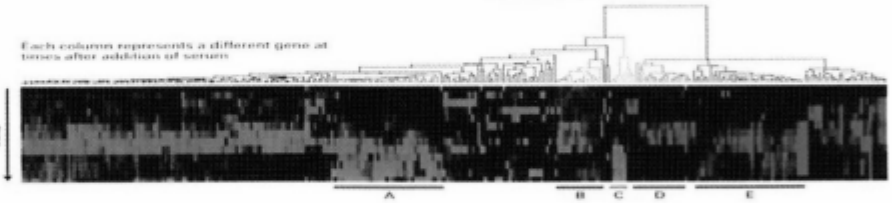
شکل ۵-۲۱



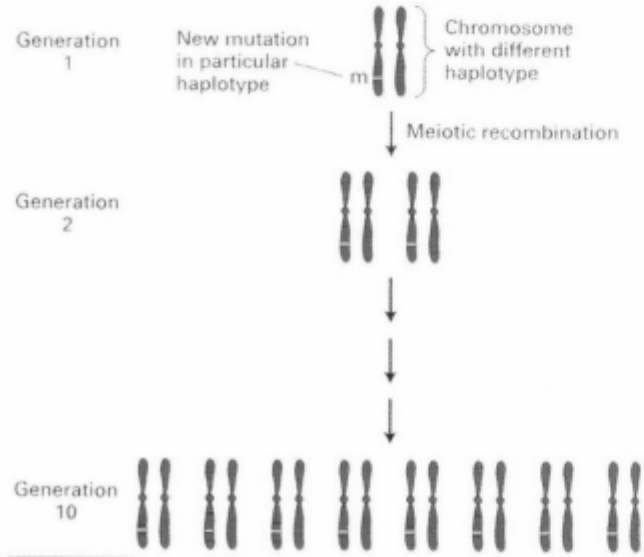
شکل ۵-۲۳



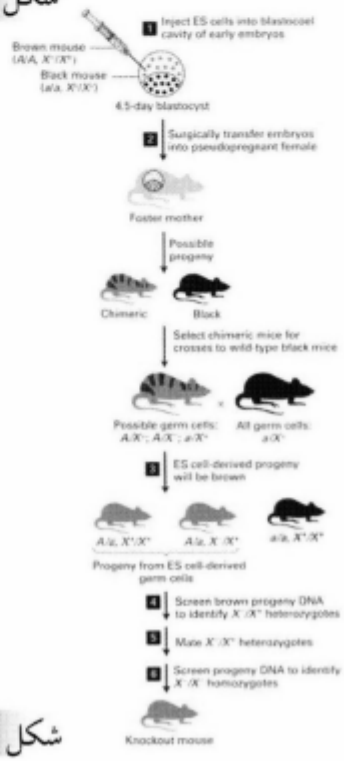
شکل ۵-۲۹



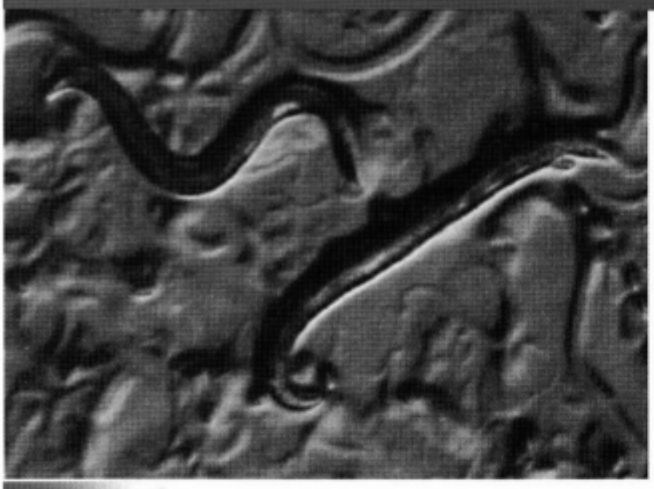
شکل ۵-۳۰



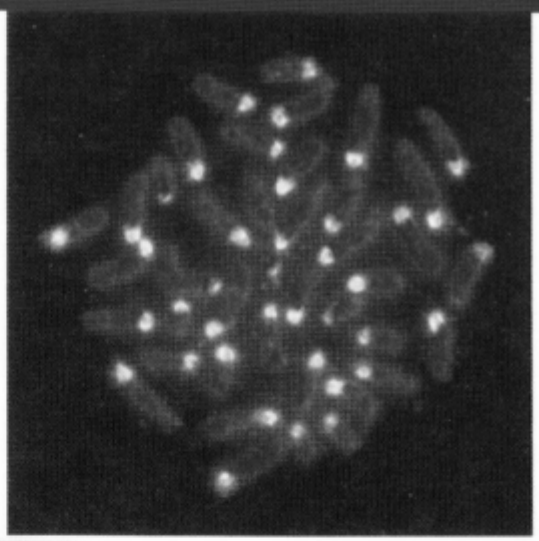
شکل ۵-۳۷



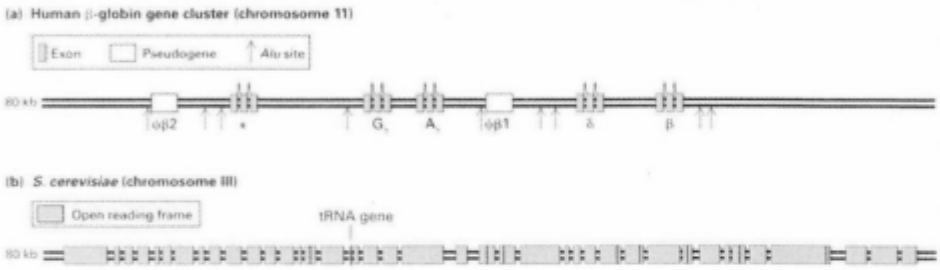
شکل ۵-۴۱



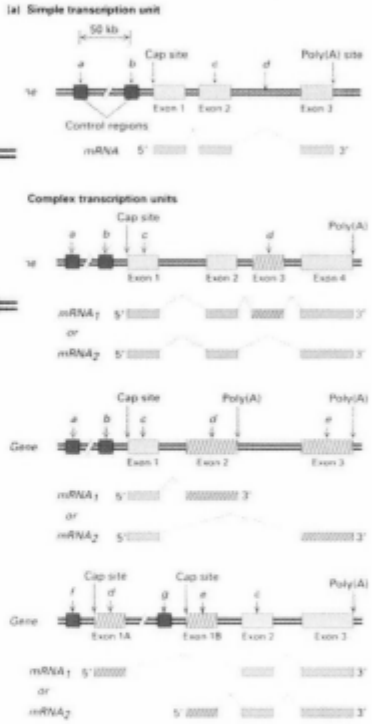
شکل ۲۰۹



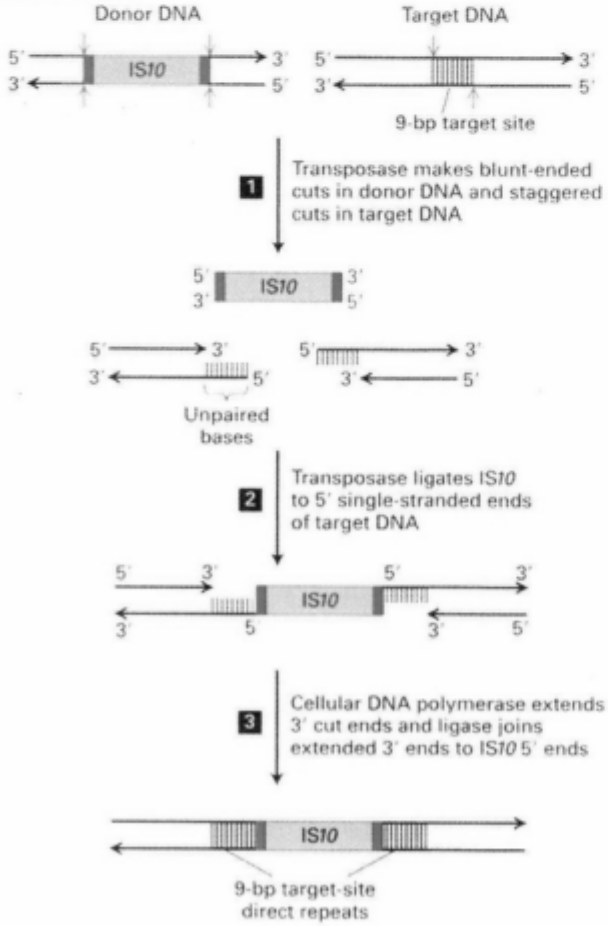
شکل ۶-۶



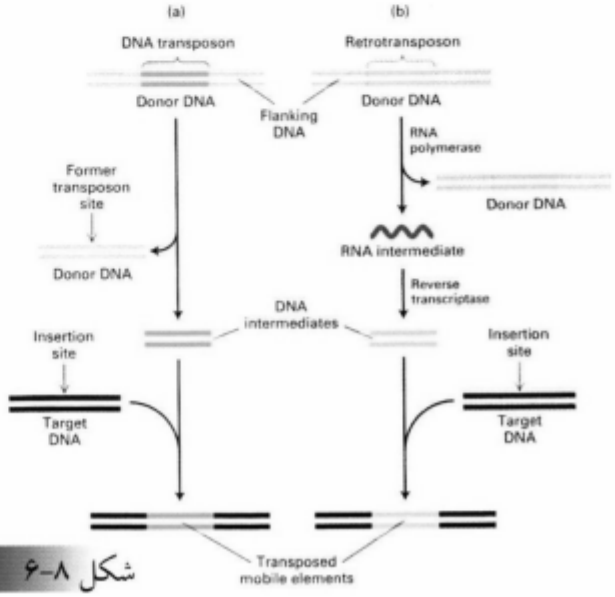
شکل ۶-۴



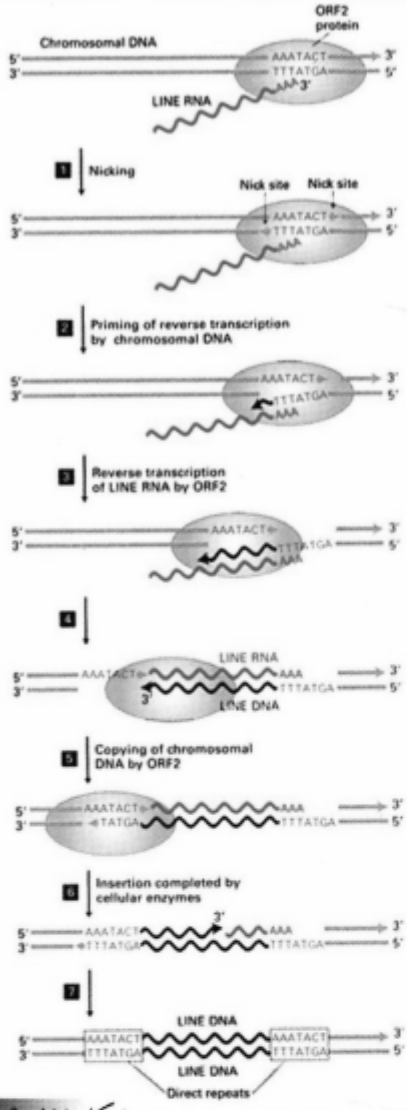
شکل ۶-۳



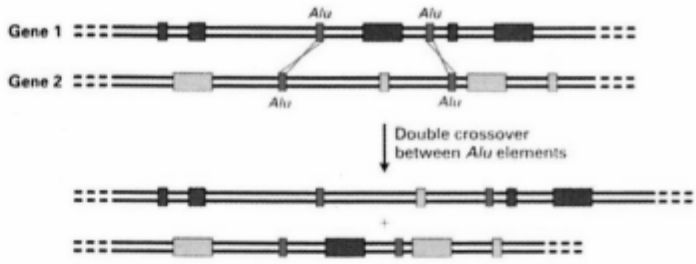
شکل ۶-۱۰



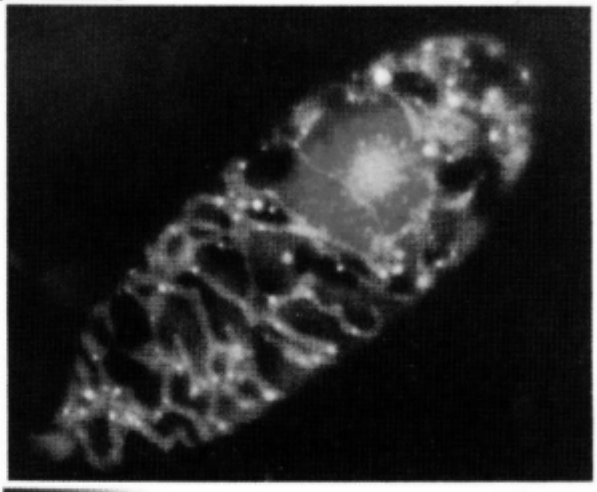
شکل ۶-۸



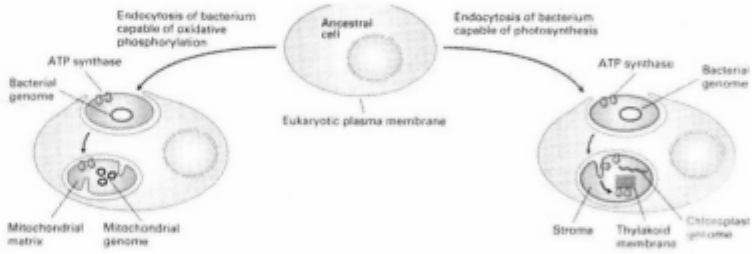
شکل ۱۷-۶



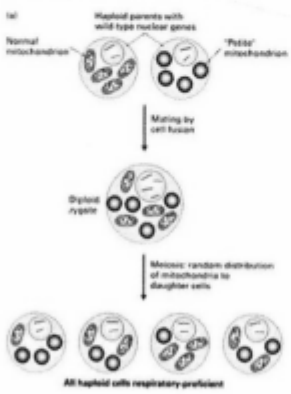
شکل ۱۸-۶

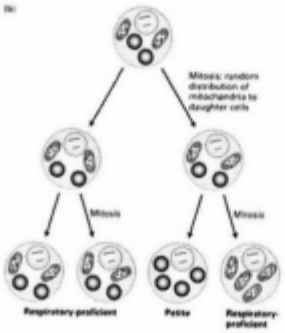


شکل ۲۱-۶



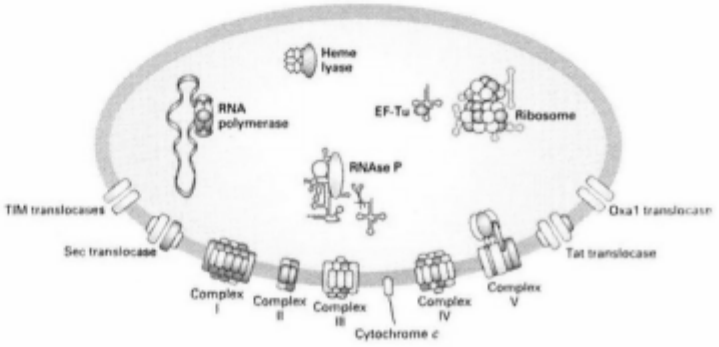
شکل ۲۰-۶



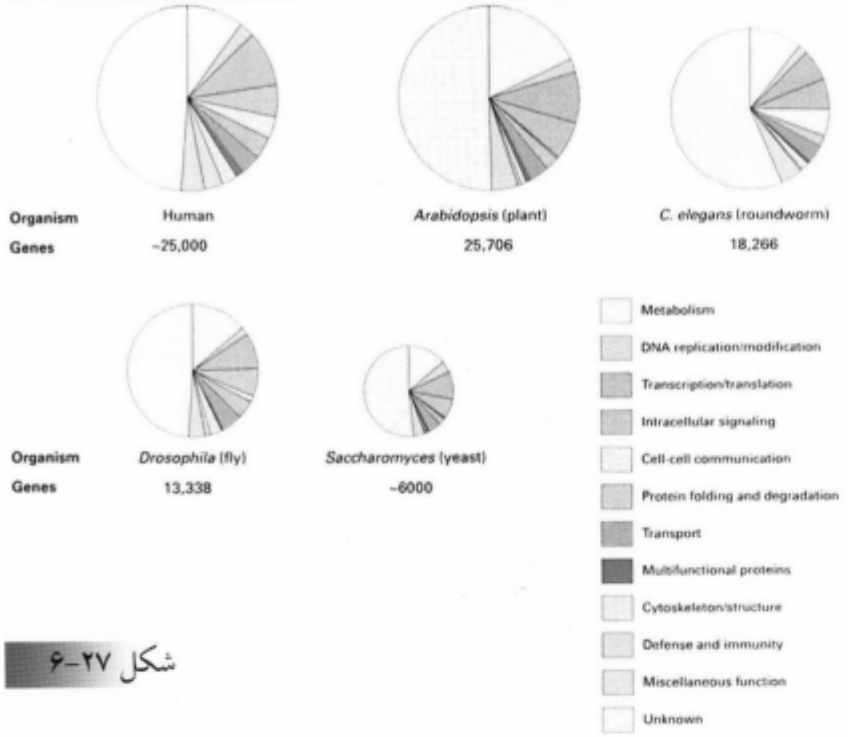


شکل ۲۲-۶

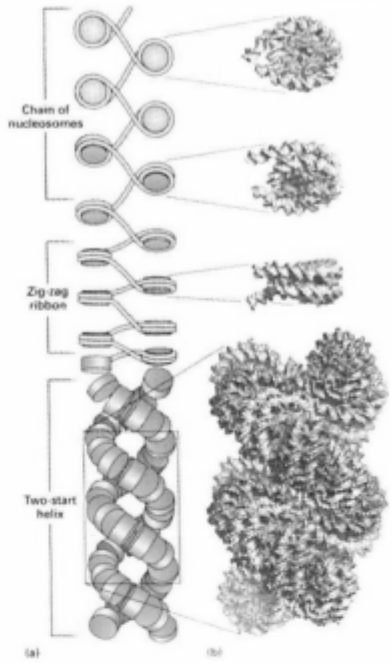
Lipid metabolism	Carbohydrate metabolism	Ubiquinone synthesis	Chaperones
Nucleotide metabolism	Heme synthesis	Co-factor synthesis	Signaling pathways
Amino acid metabolism	Fe-S synthesis	Proteases	DNA repair, replication, etc.



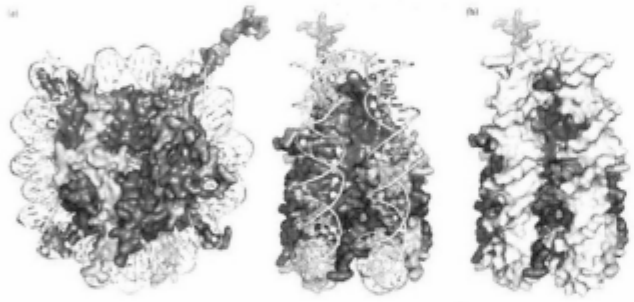
شکل ۲۳-۶



شکل ۲۷-۶

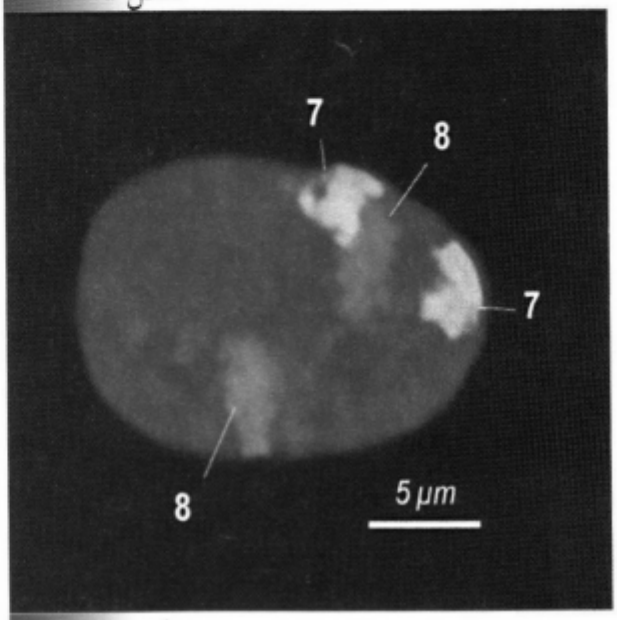


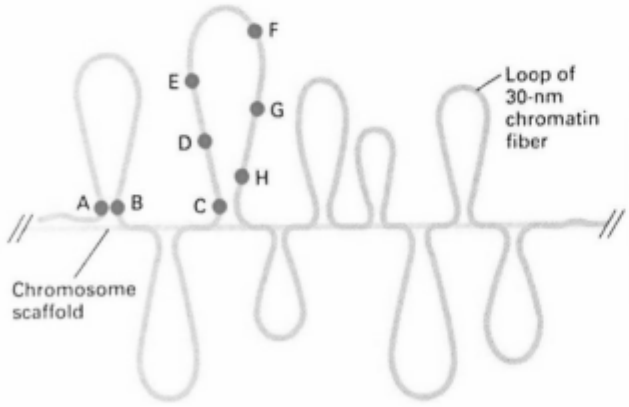
شکل ۳۰-۶



شکل ۲۹-۶

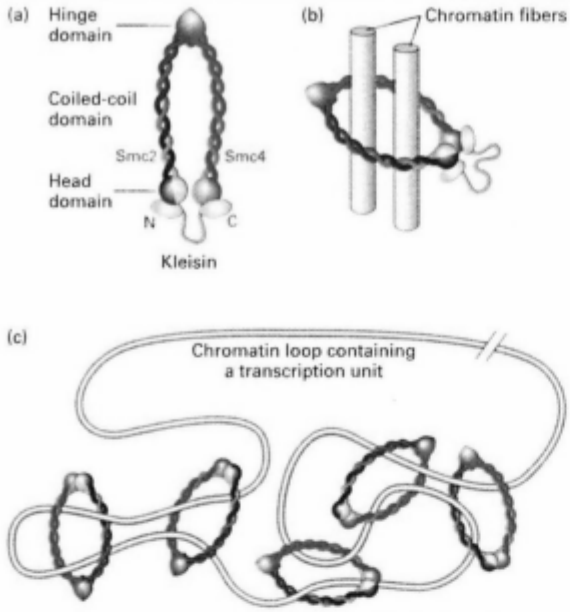
شکل ۲۵-۶



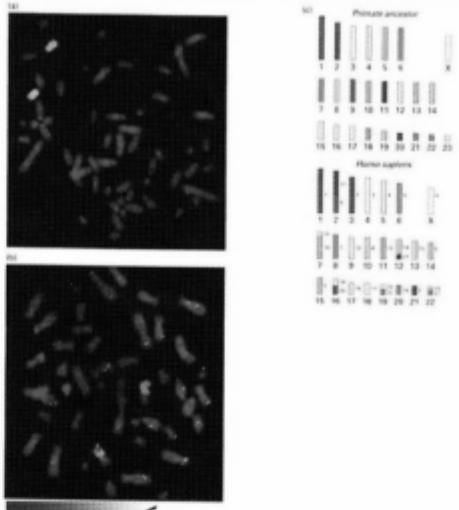


شکل ۳۶-۶

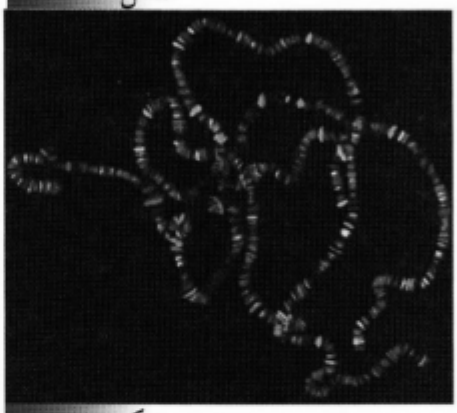
شکل ۳۷-۶



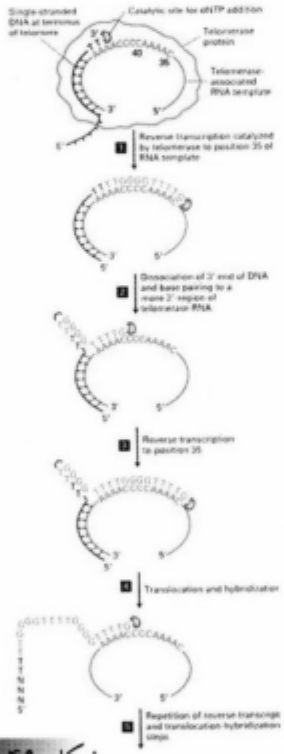
شکل ۶-۳۸



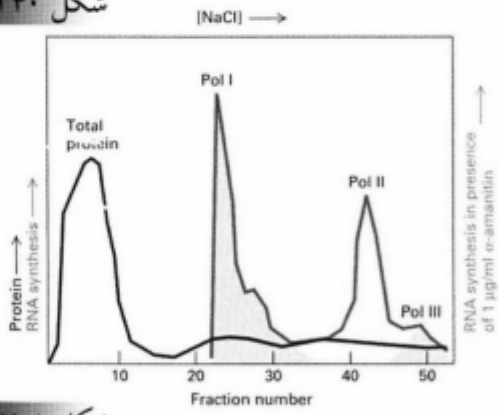
شکل ۶-۴۳



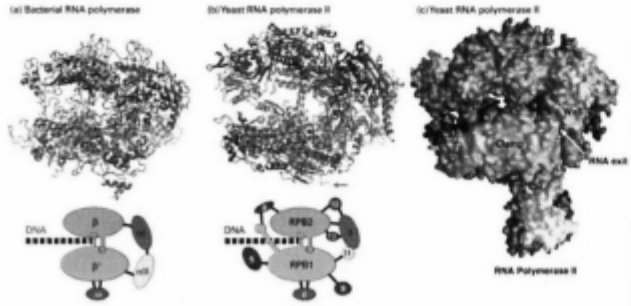
شکل ۳۴۰



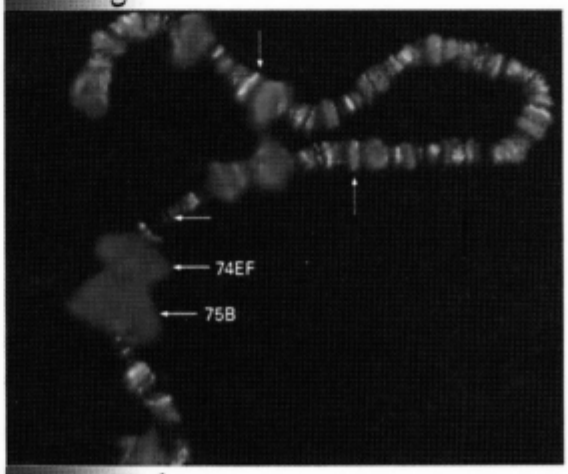
شکل ۶-۴۹



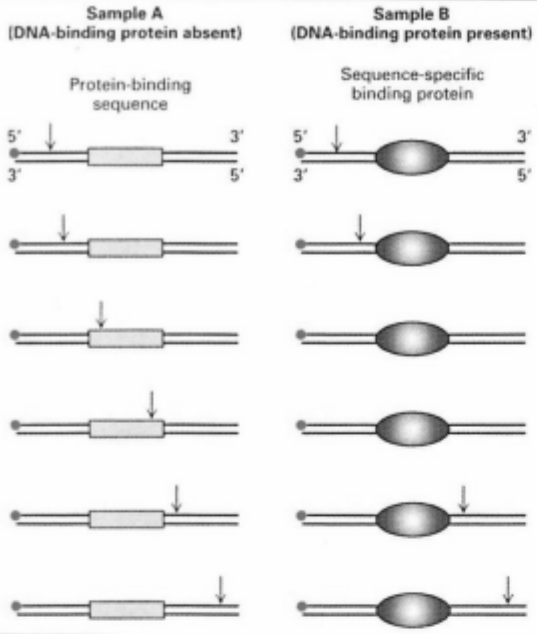
شکل ۷-۸



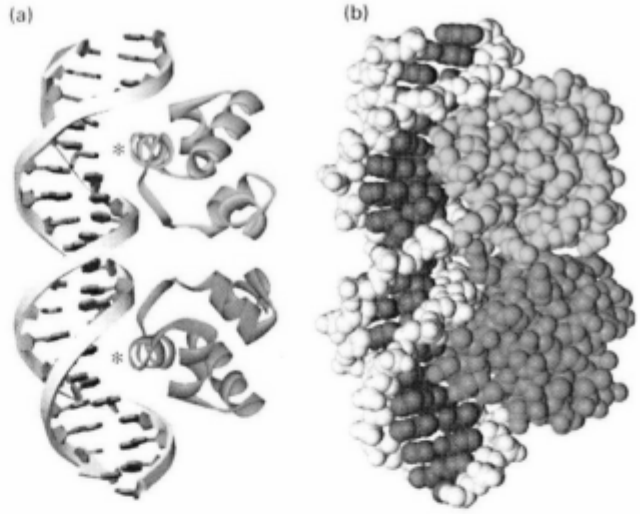
شکل ۷-۹



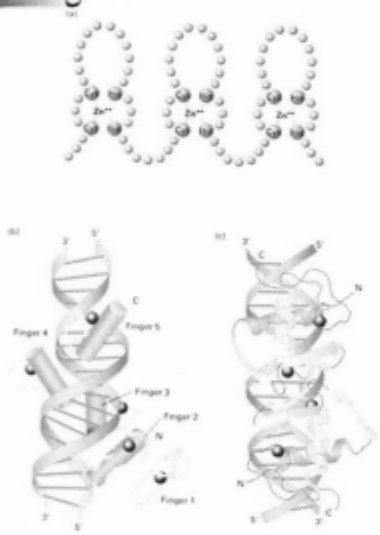
شکل ۷-۱۱



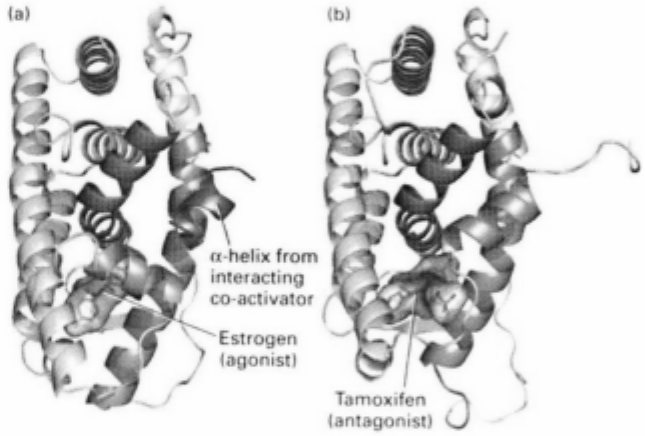
شکل ۷-۱۷



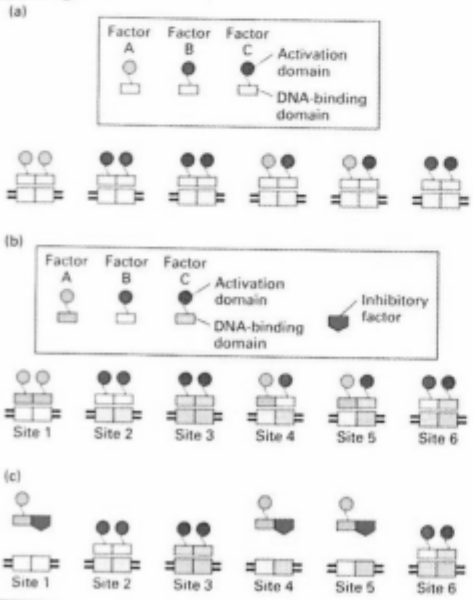
شکل ۷-۲۴



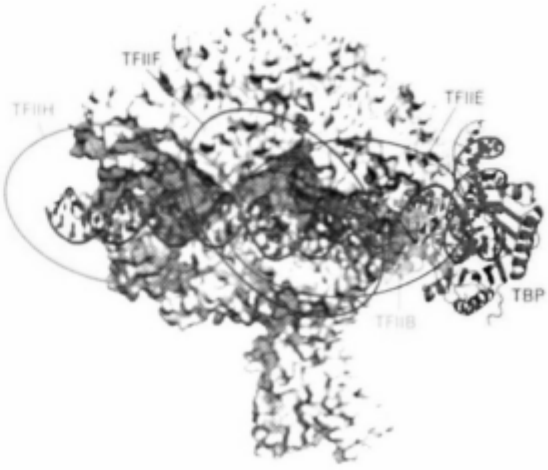
شکل ۷-۲۵



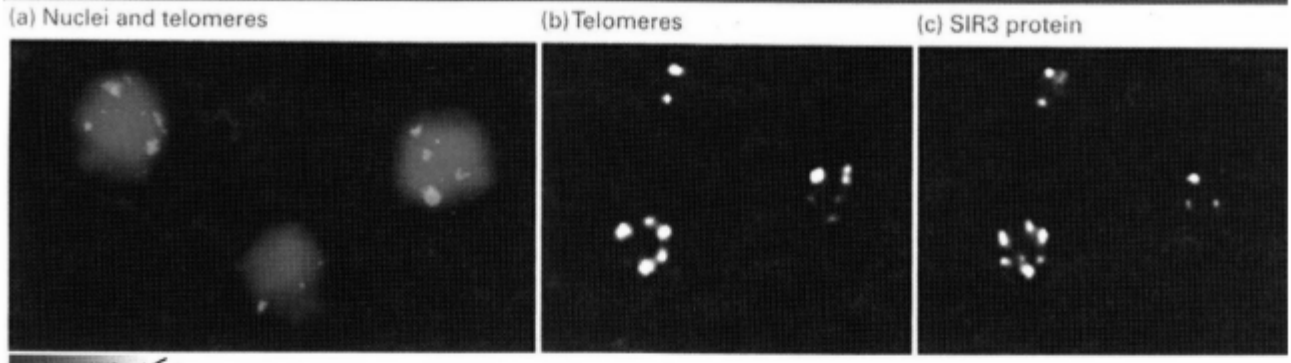
شکل ۷-۲۷



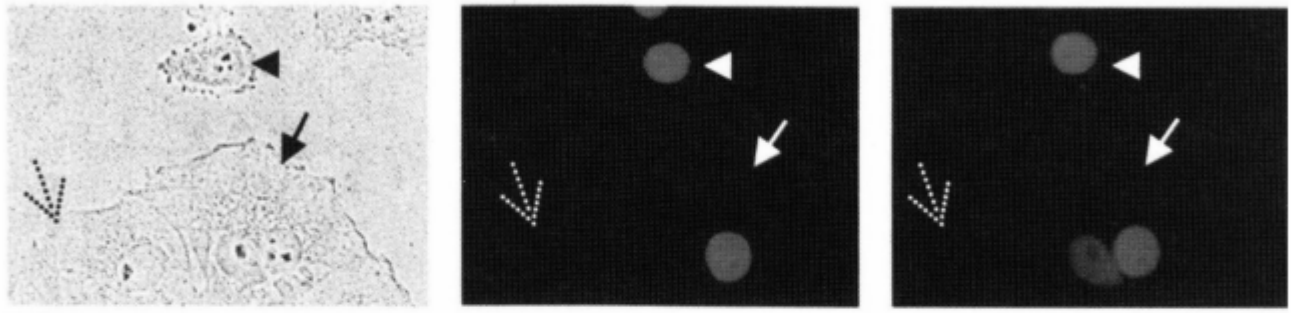
شکل ۷-۲۸



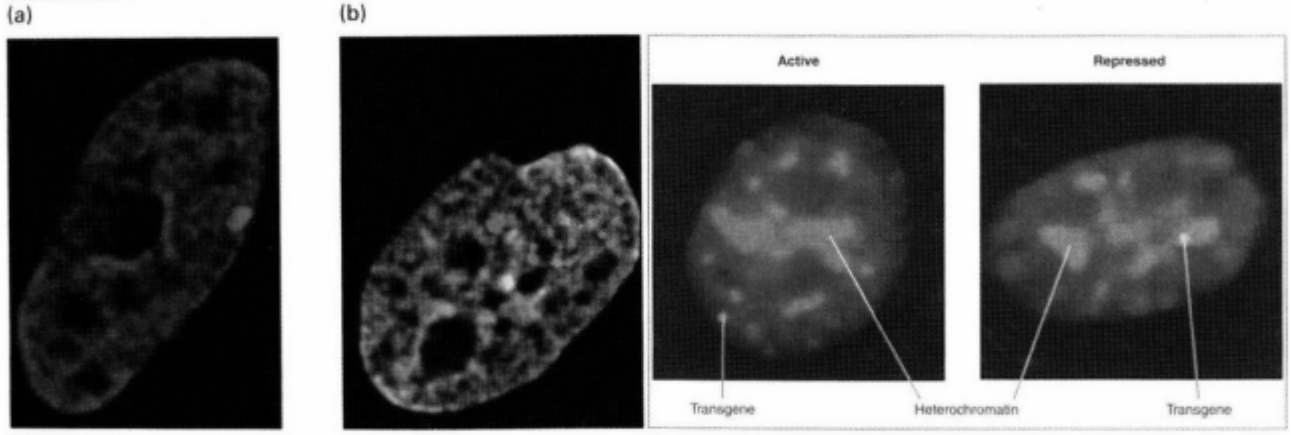
شکل ۷-۳۲



شکل ۷-۳۴

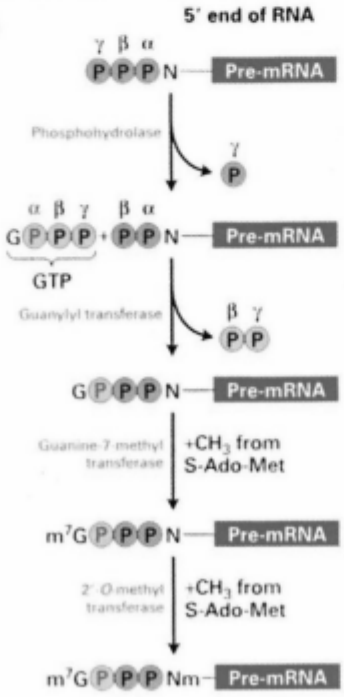


شکل ۸-۴

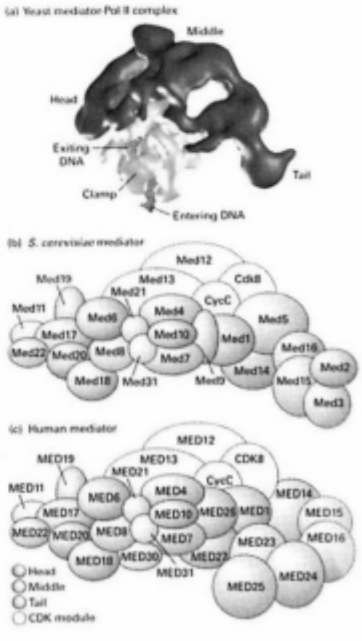


شکل ۷-۴۰

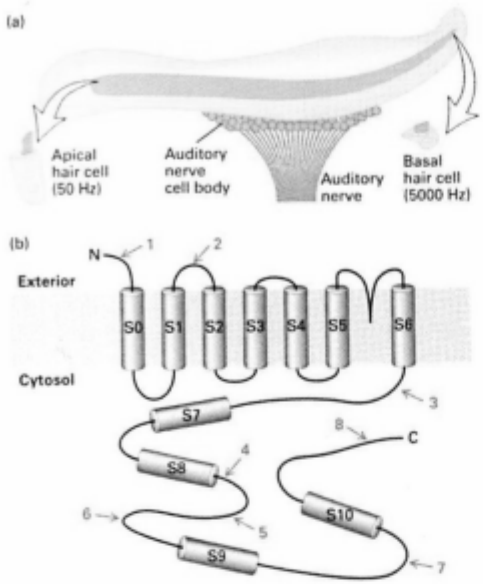
شکل ۷-۳۹



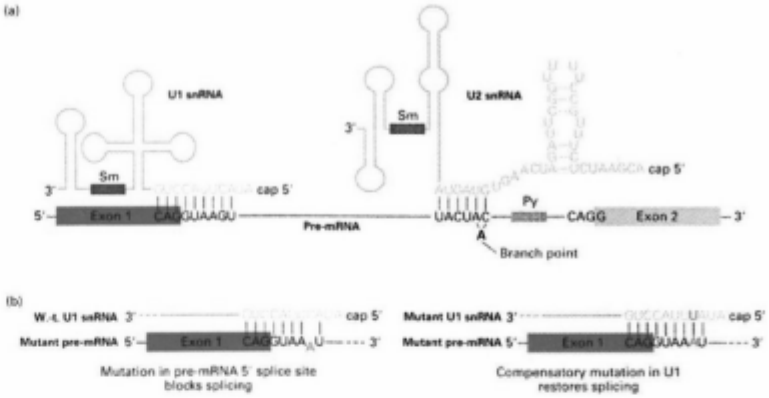
شکل ۸-۳



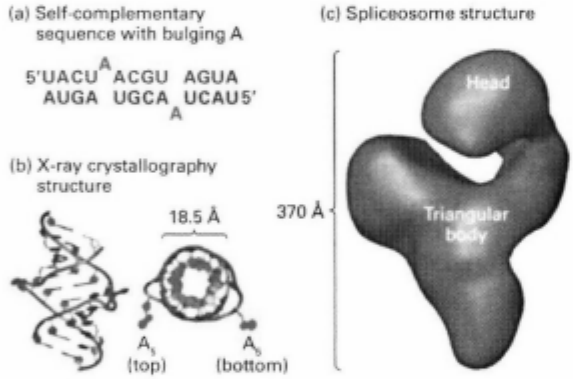
شکل ۷-۴۱



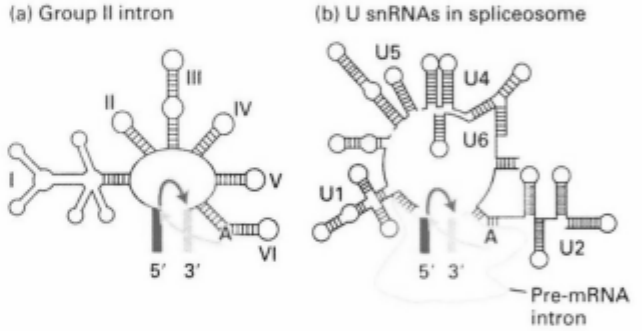
شکل ۸-۱۸



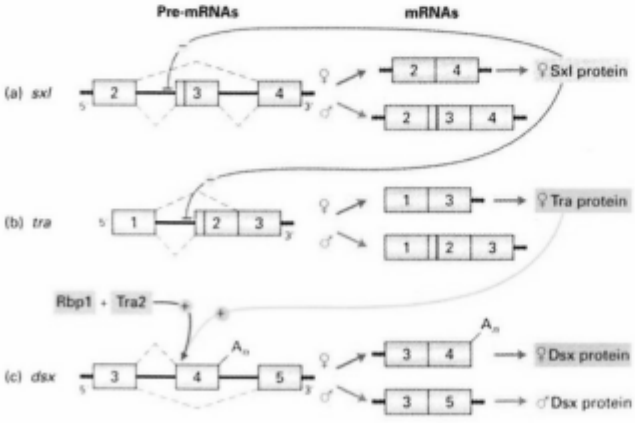
شکل ۸-۹



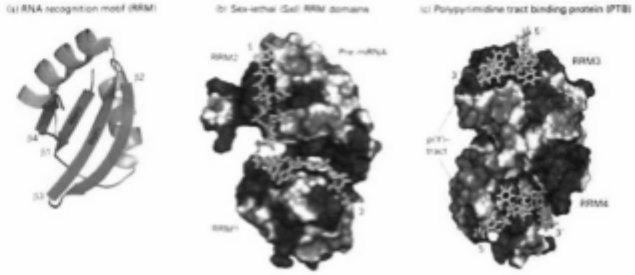
شکل ۸-۱۰



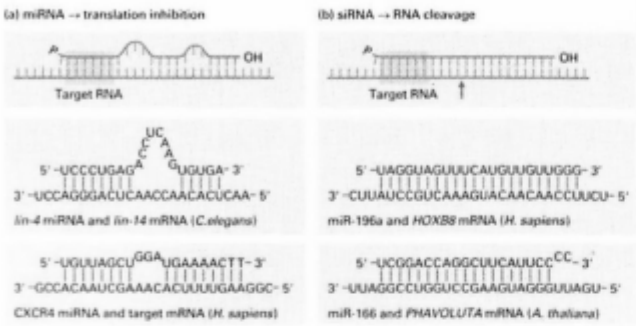
شکل ۸-۱۴



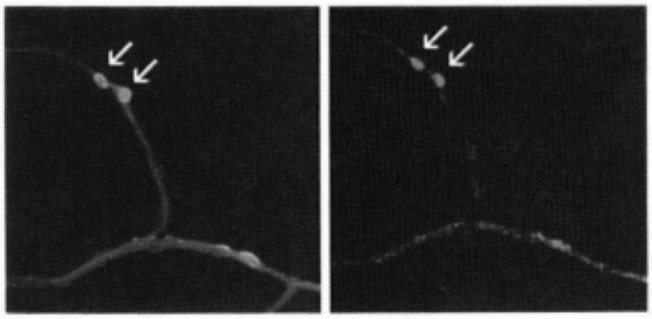
شکل ۸-۱۶



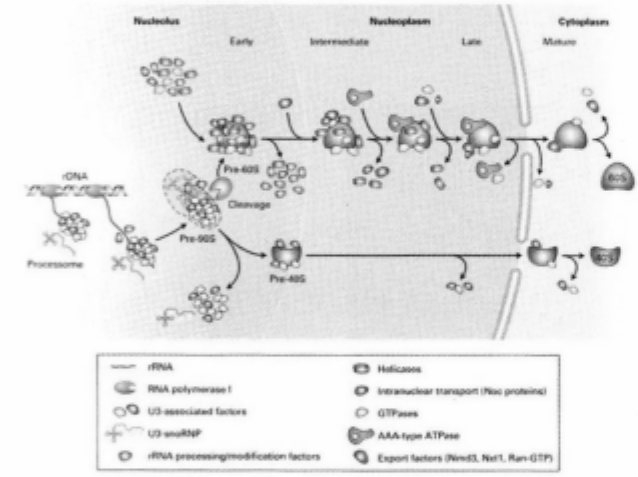
شکل ۸-۵



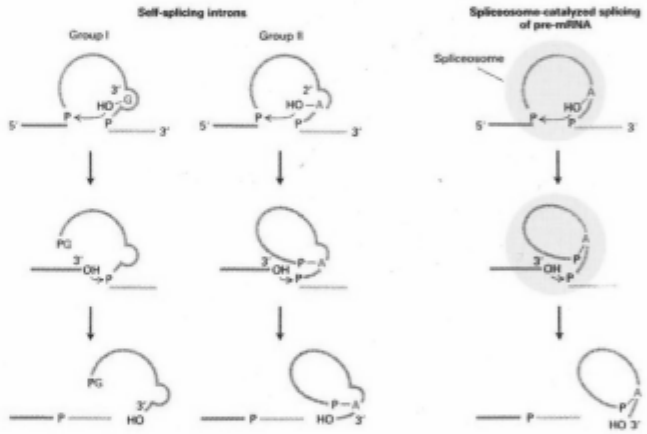
شکل ۸-۲۵



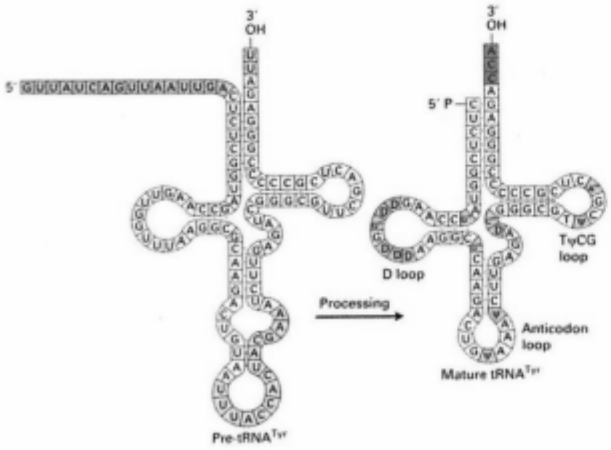
شکل ۸-۳۲



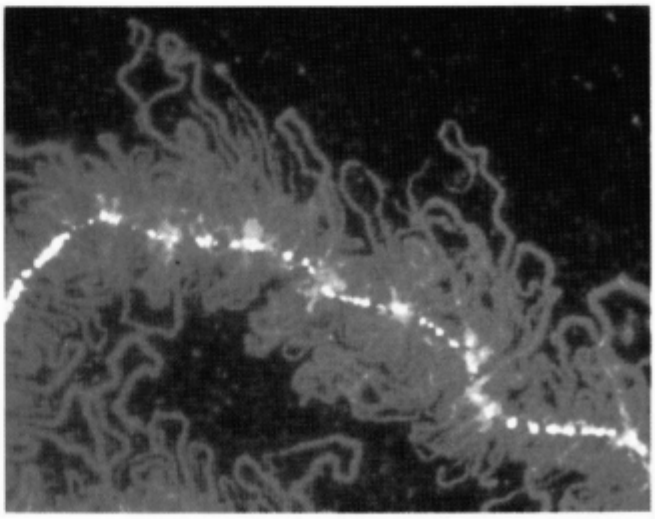
شکل ۸-۳۷



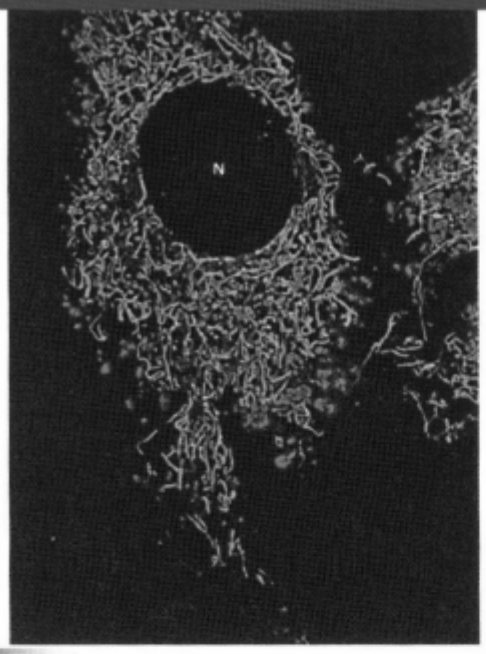
شکل ۸-۳۸



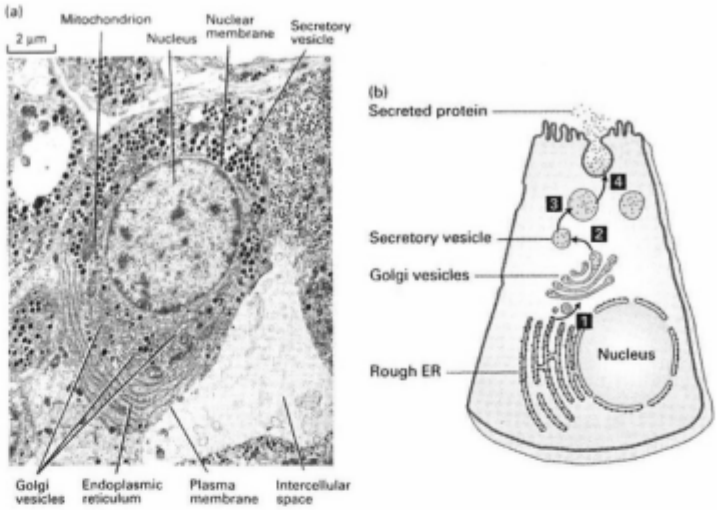
شکل ۸-۳۹



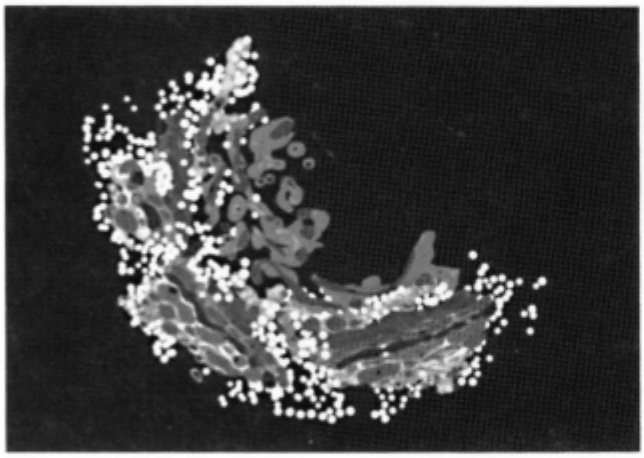
شکل ۳۲۳



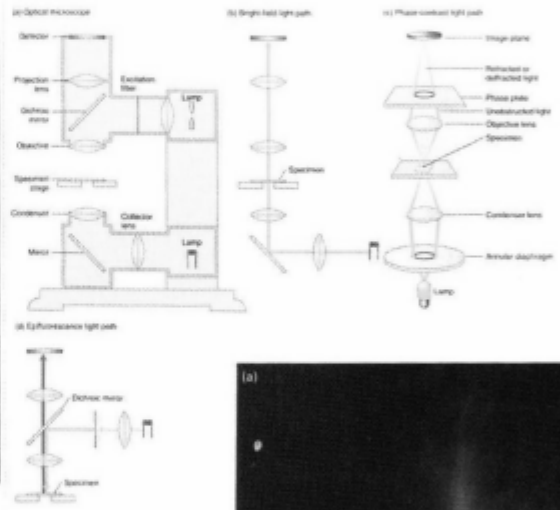
شکل ۳-۹



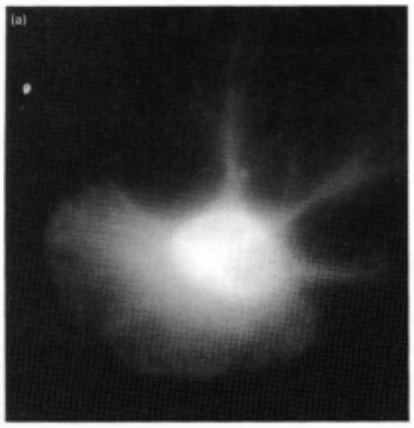
شکل ۵-۹

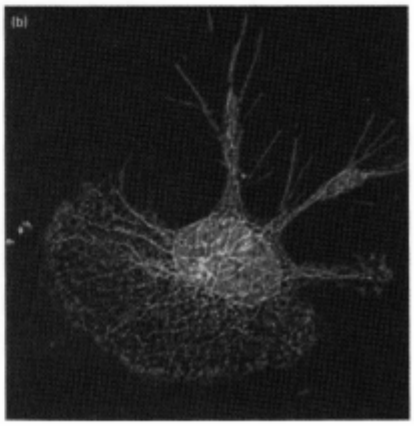


شکل ۶-۹

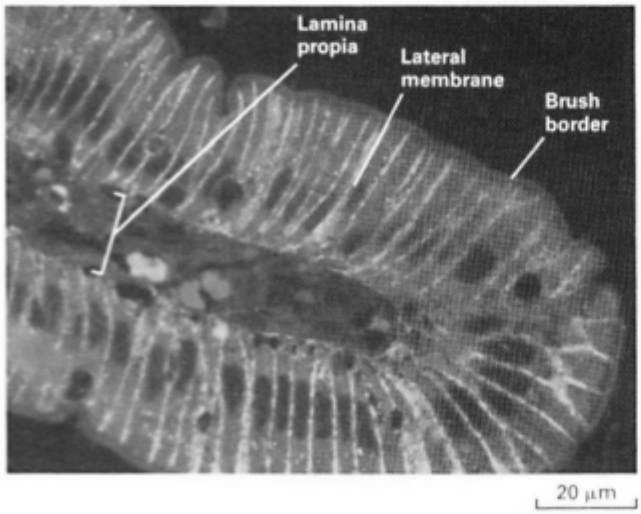


شکل ۱۰-۹

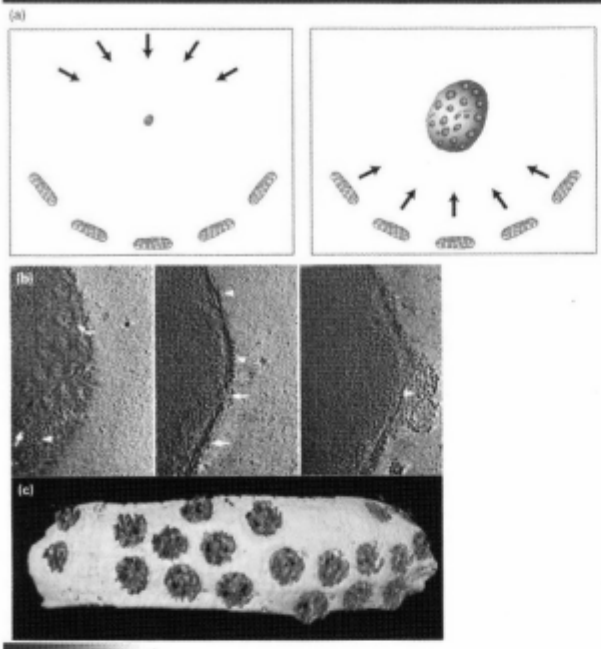




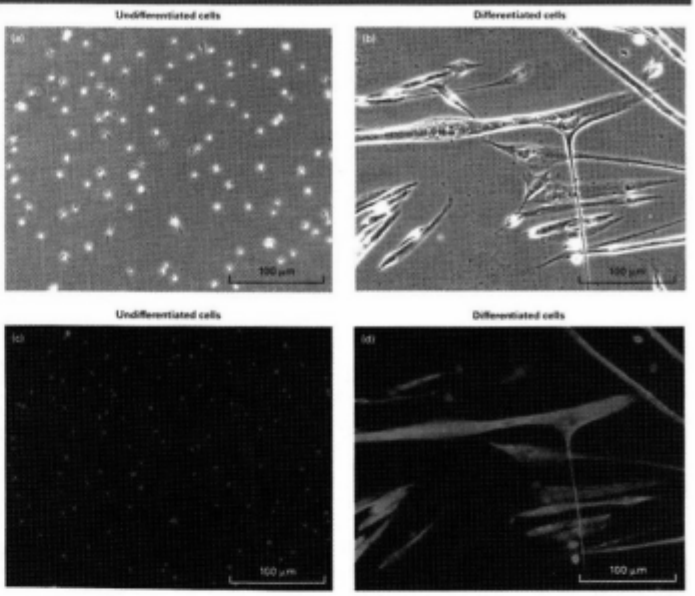
شکل ۱۹-۹



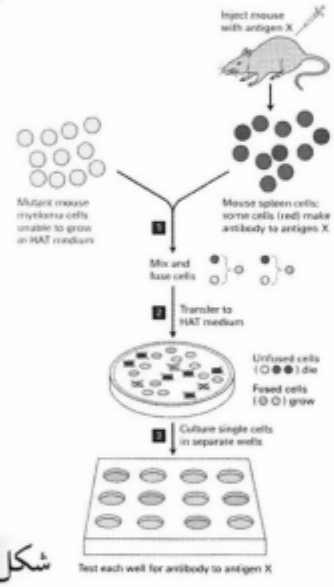
شکل ۱۷-۹



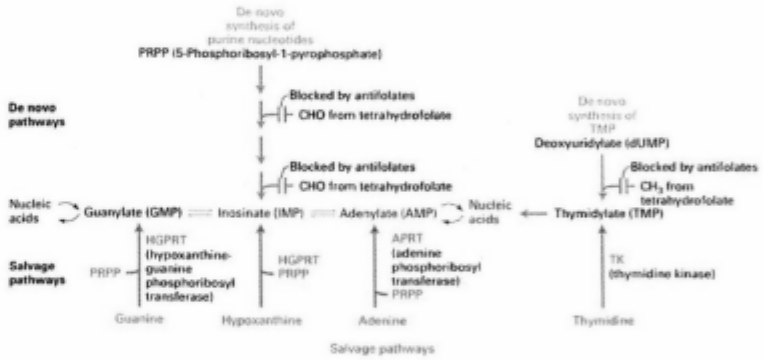
شکل ۲۲-۹



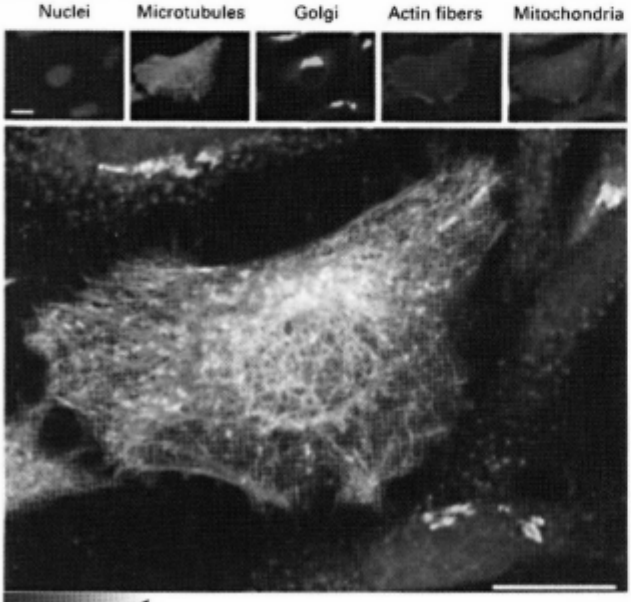
شکل ۳۰-۹



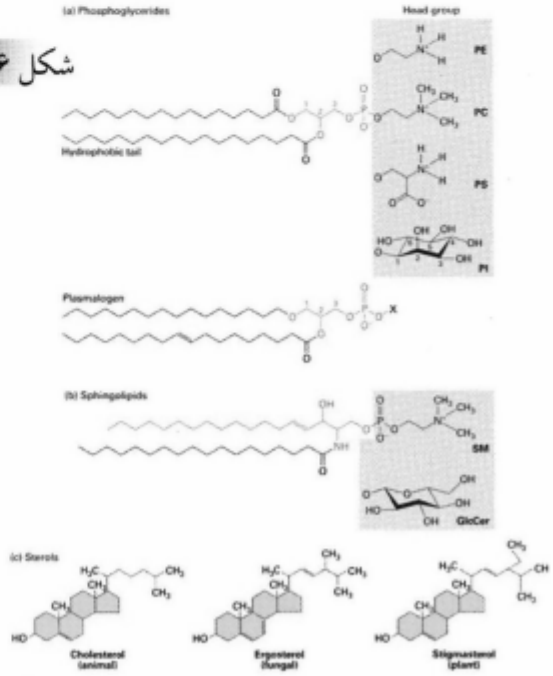
شکل ۳۵-۹



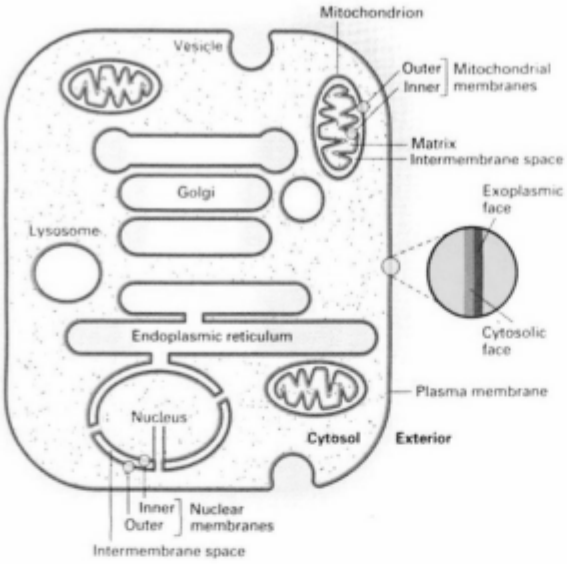
شکل ۳۶-۹

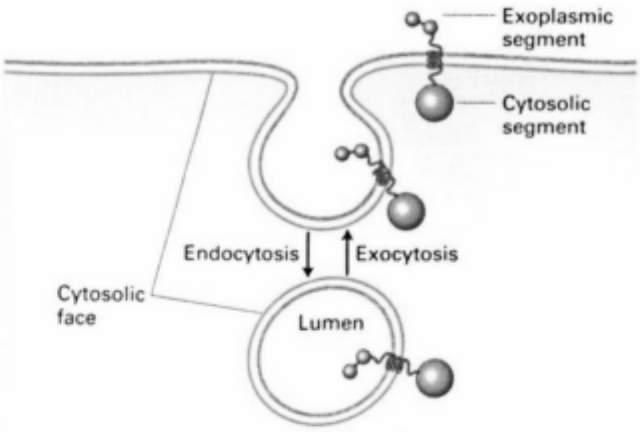


شکل ۴۶۷



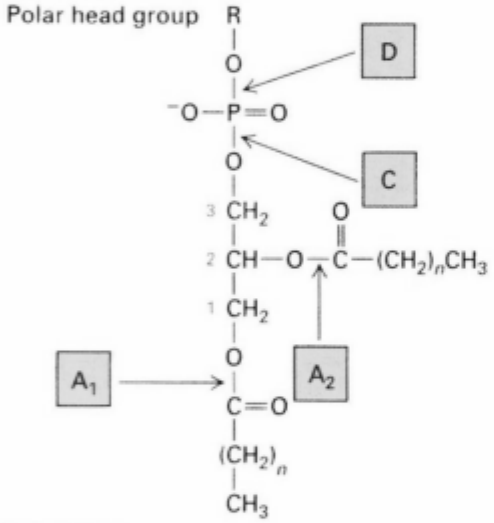
شکل ۵-۱۰

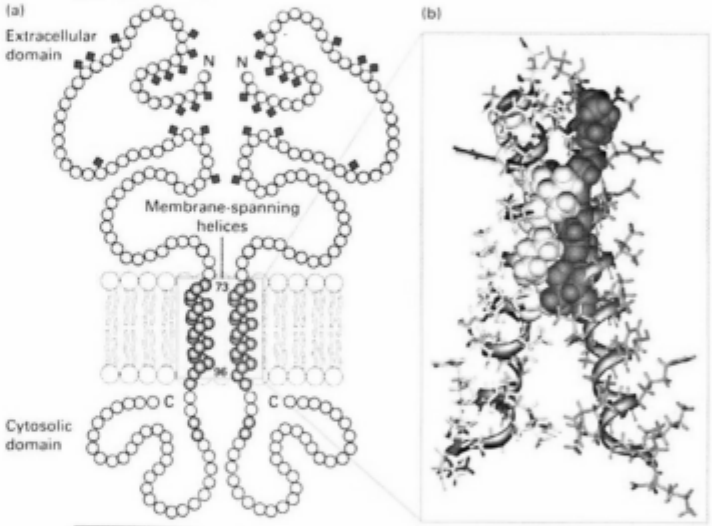




شکل ۹-۱۰

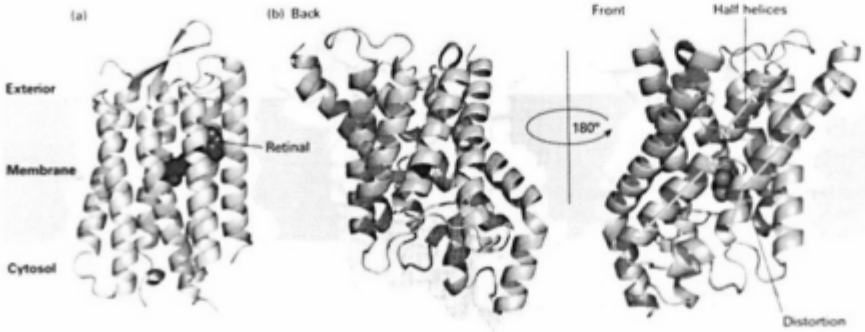
شکل ۸-۱۰

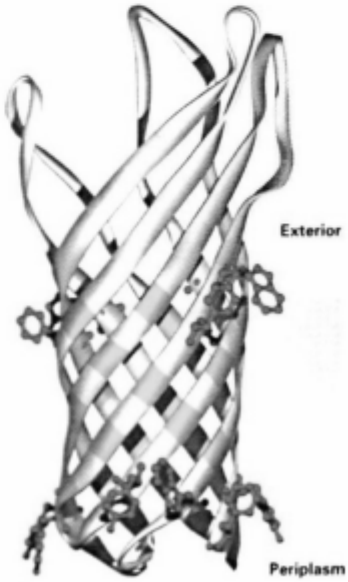




شکل ۱۵-۱۰

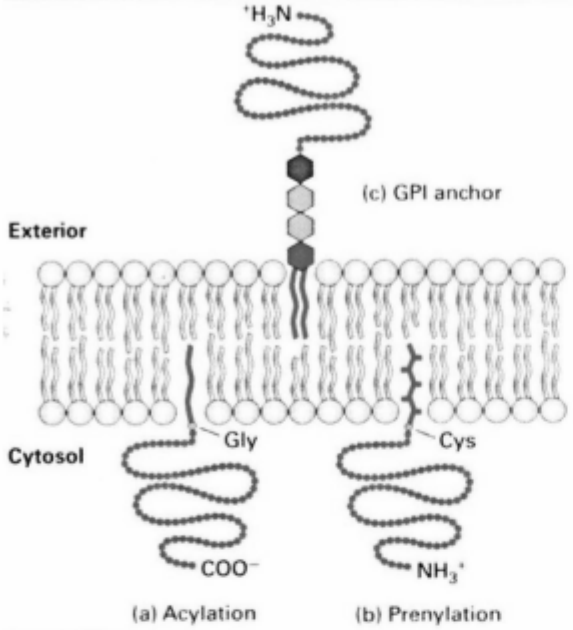
شکل ۱۴-۱۰



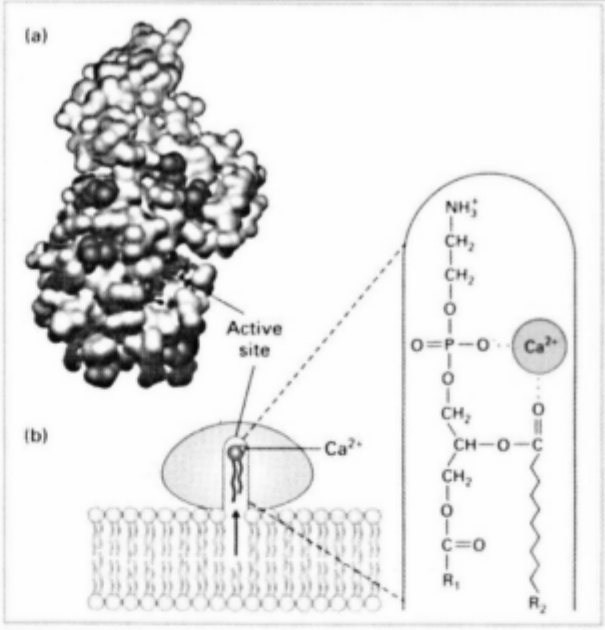


شکل ۱۶-۱۰

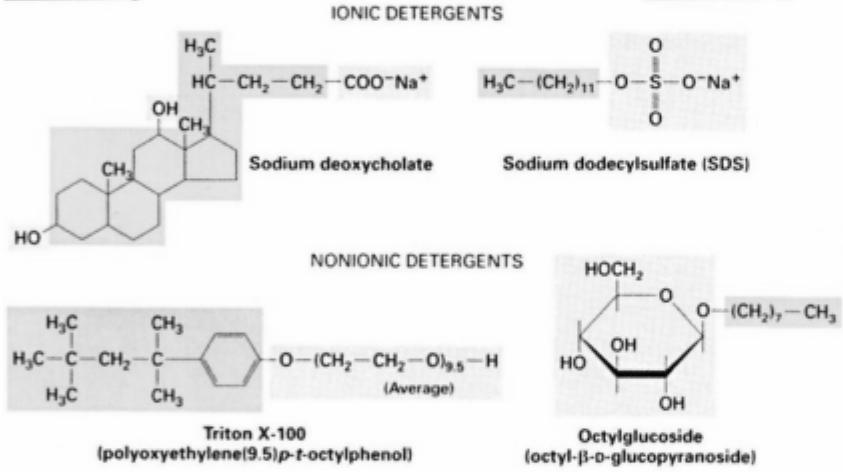
شکل ۱۸-۱۰



شکل ۱۰-۱۹

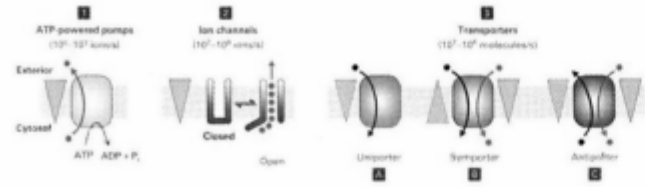


شکل ۱۰-۲۱

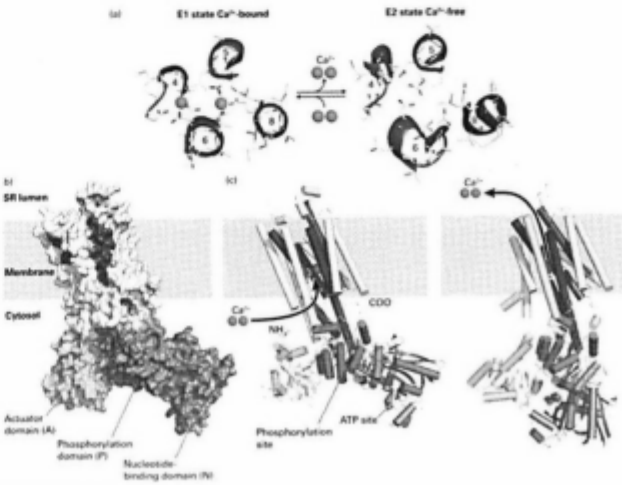


شکل ۱۰-۲۲

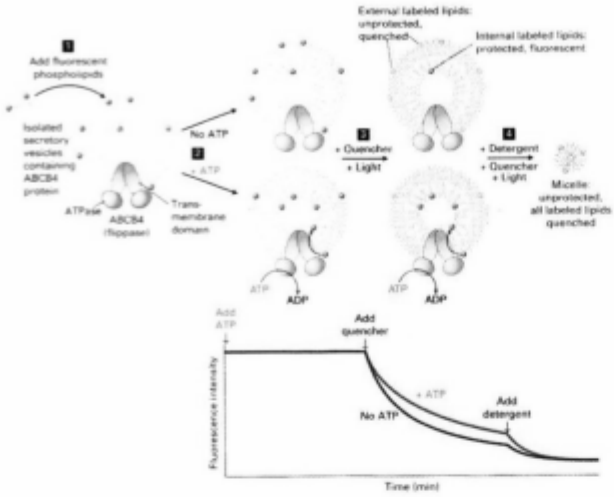
شکل ۱۰-۲۴



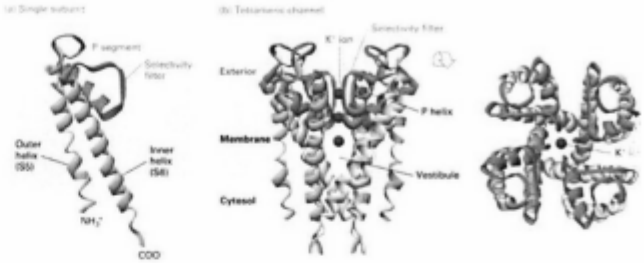
شکل ۱۱-۳



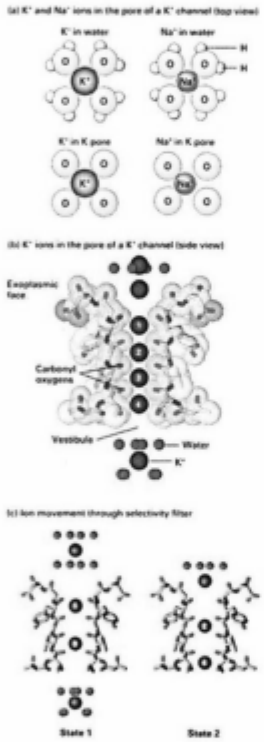
شکل ۱۱-۱۱



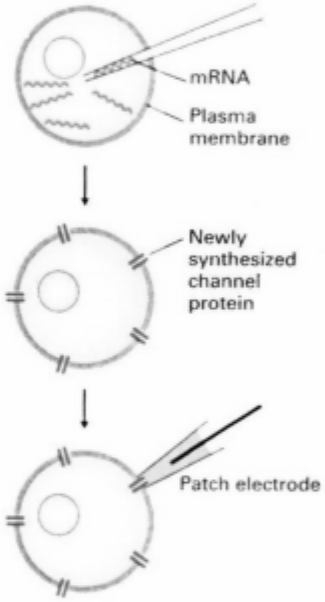
شکل ۱۱-۱۶



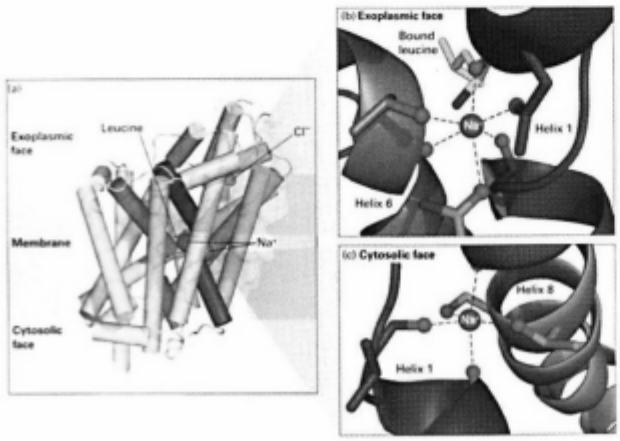
شکل ۱۱-۱۹



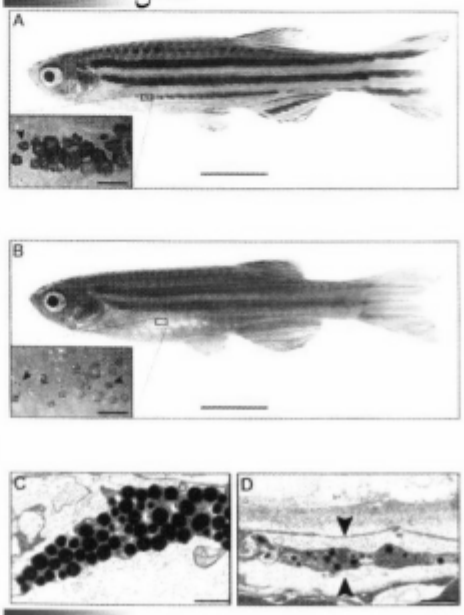
شکل ۱۱-۲۰



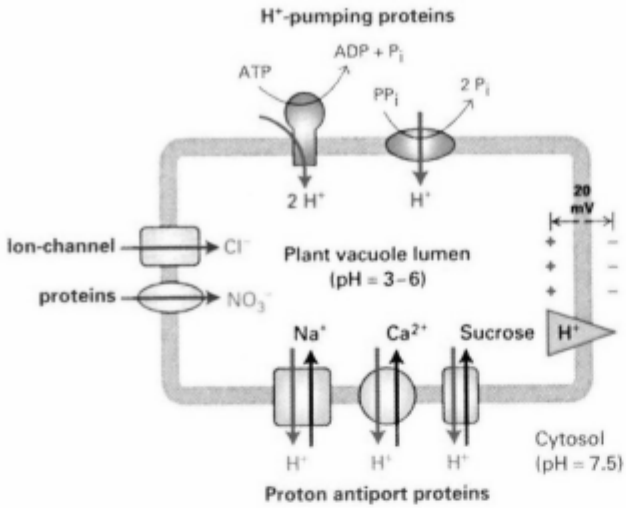
شکل ۱۱-۲۳



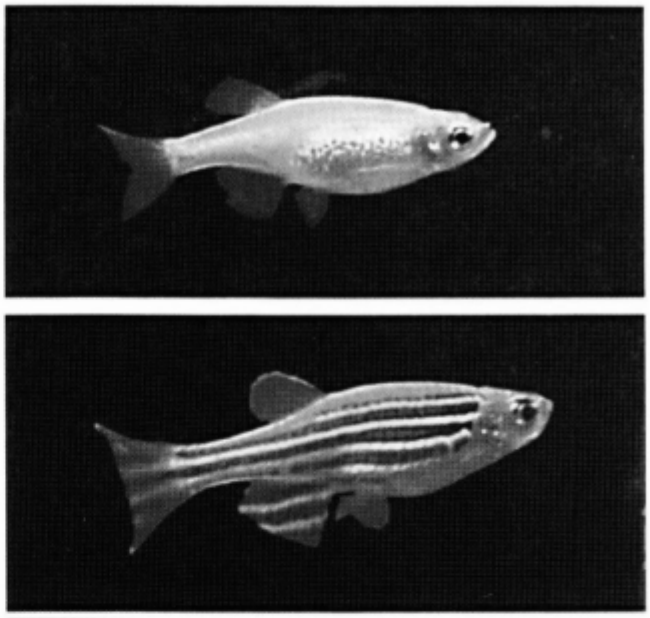
شکل ۱۱-۲۶



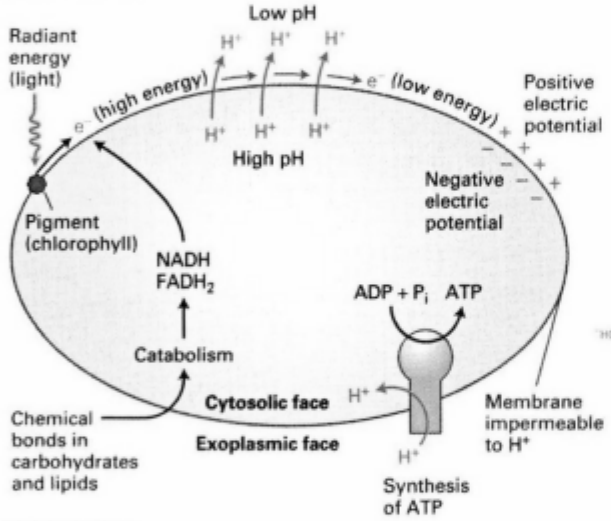
شکل ۱۱-۲۷



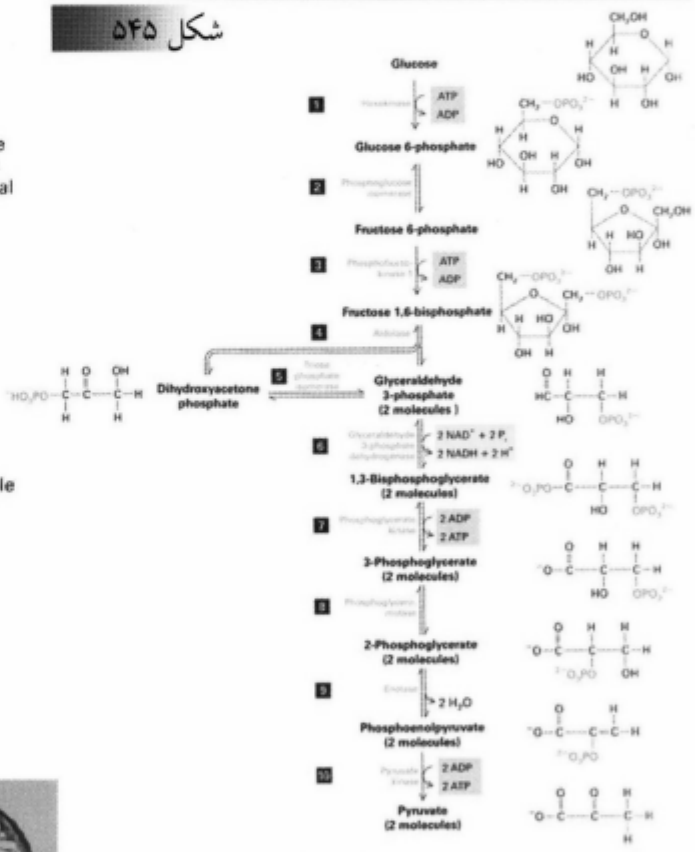
شکل ۲۸-۱۱



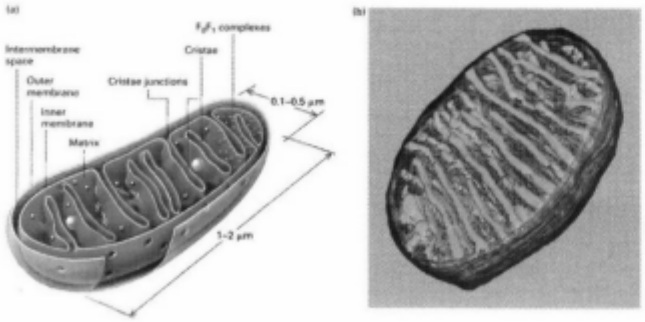
شکل ۵۴۵



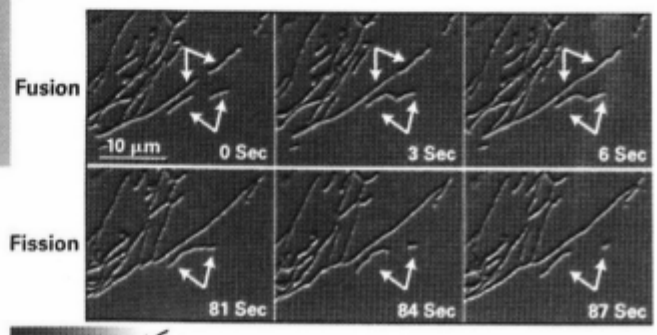
شکل ۲-۱۲



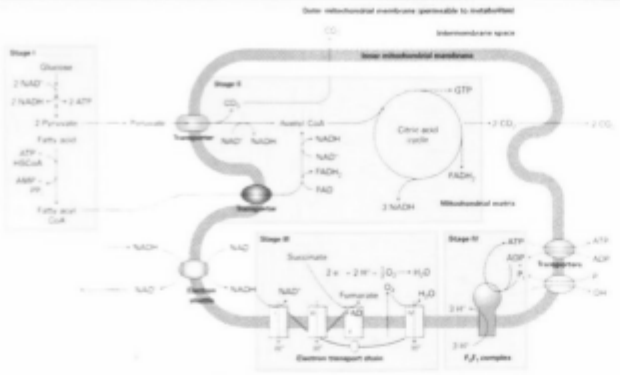
شکل ۳-۱۲



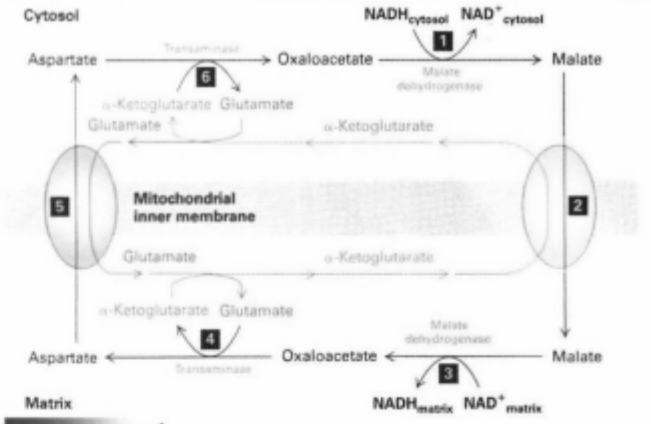
شکل ۶-۱۲



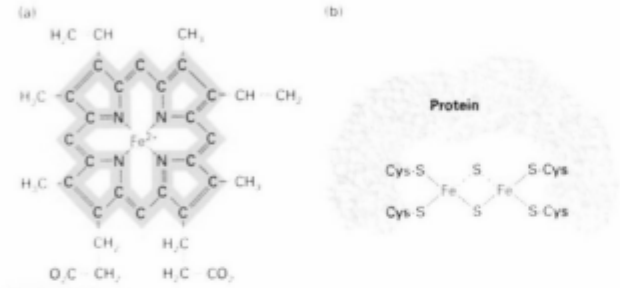
شکل ۷-۱۲



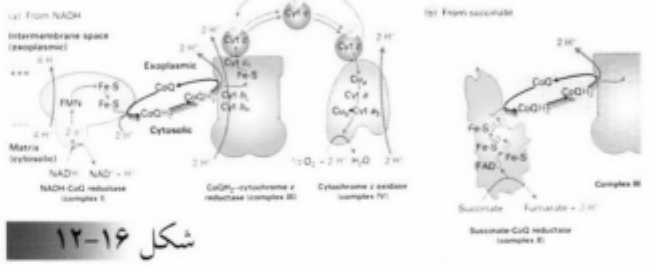
شکل ۸-۱۲



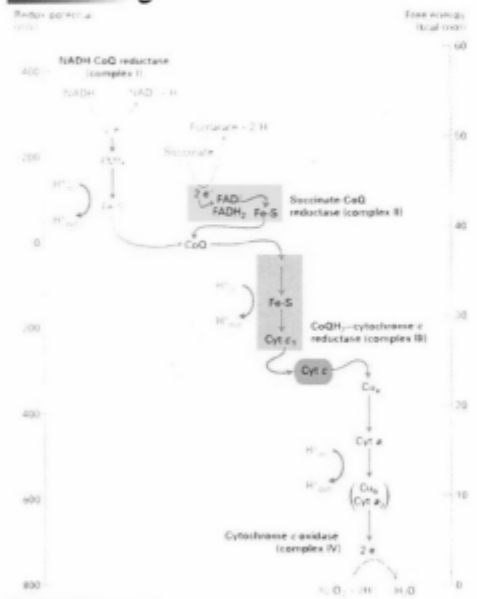
شکل ۱۱-۱۲



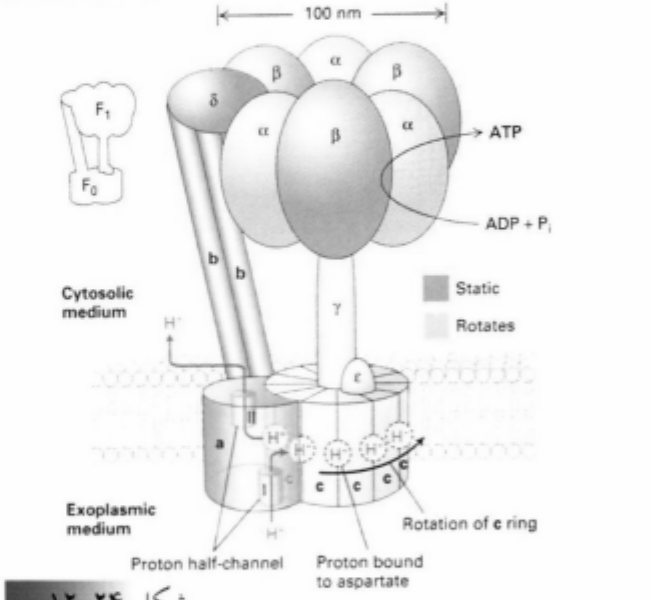
شکل ۱۴-۱۲



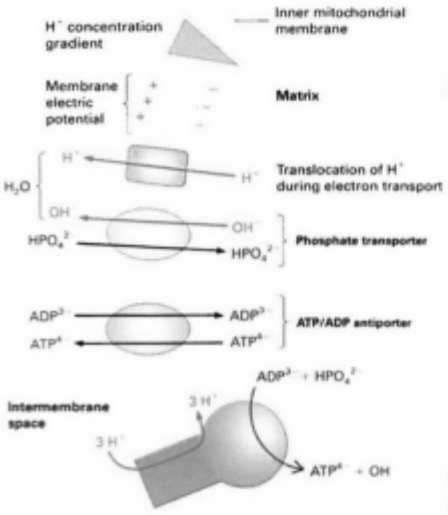
شکل ۱۶-۱۲



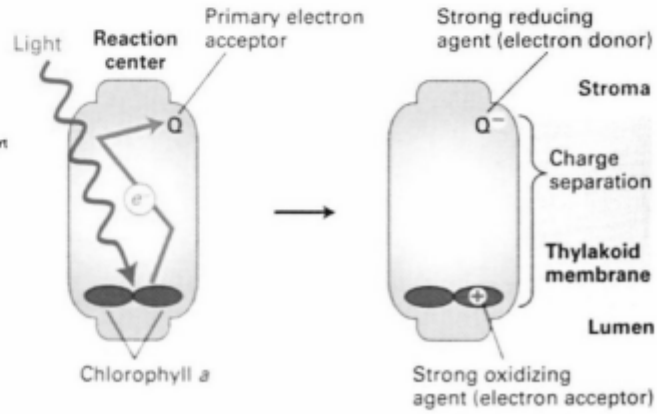
شکل ۱۸-۱۲



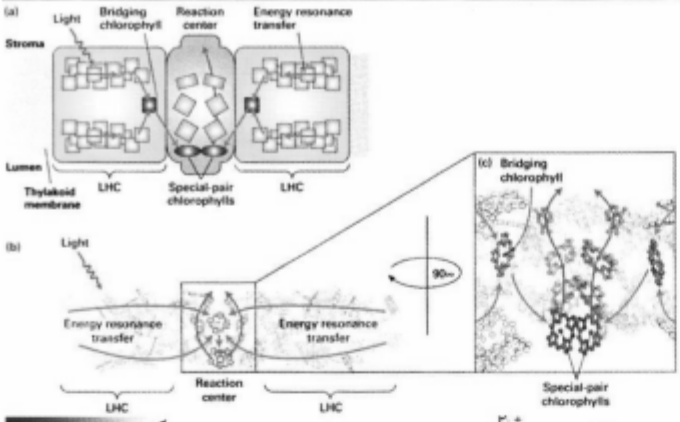
شکل ۲۴-۱۲



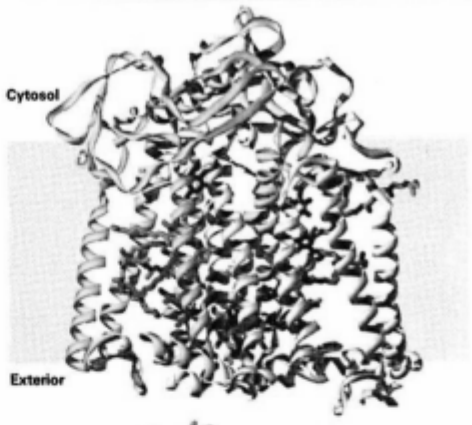
شکل ۲۷-۱۲

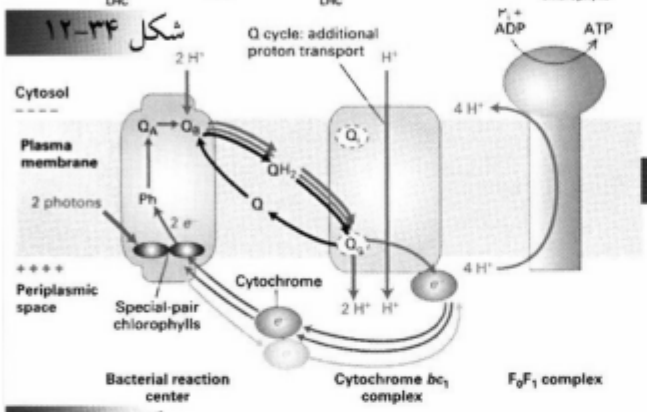


شکل ۳۳-۱۲

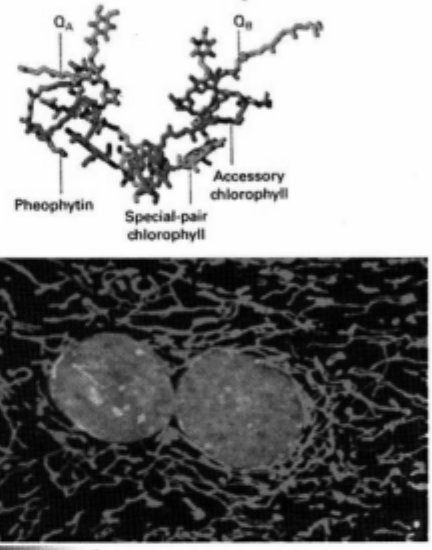


شکل ۱۲-۳۴



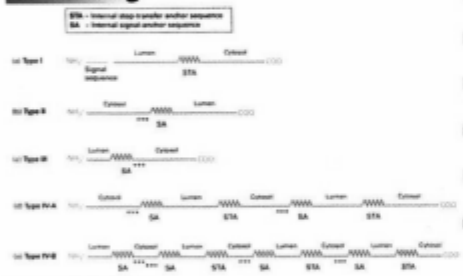


شکل ۱۲-۳۷

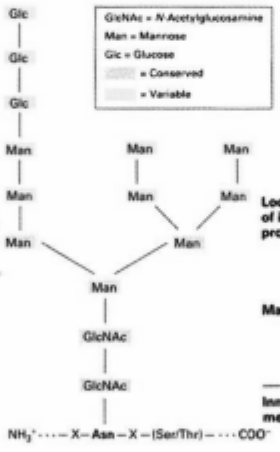


شکل ۱۲-۳۵

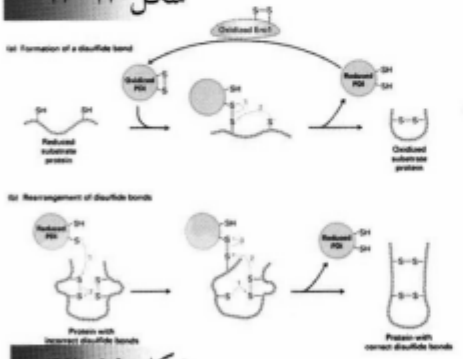
شکل ۵۹۱



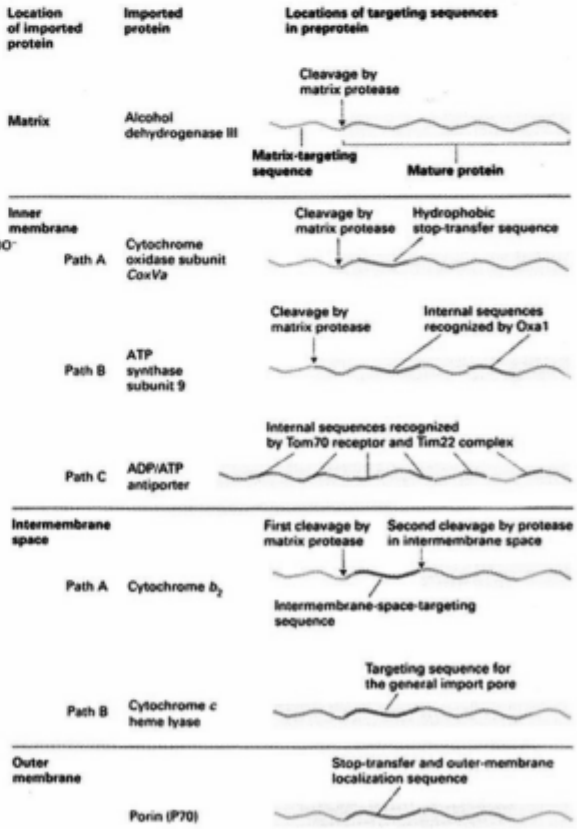
شکل ۱۳-۱۳



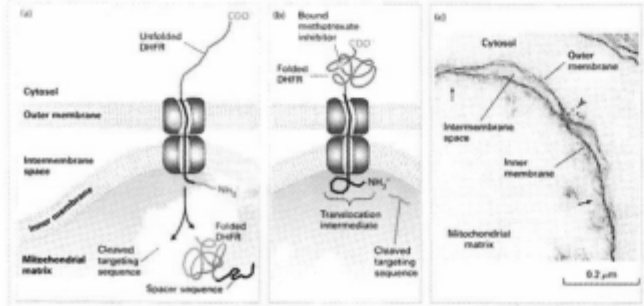
شکل ۱۳-۱۶



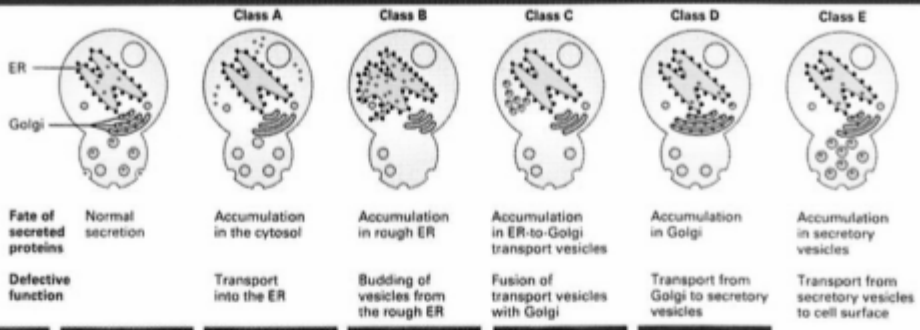
شکل ۱۳-۱۹



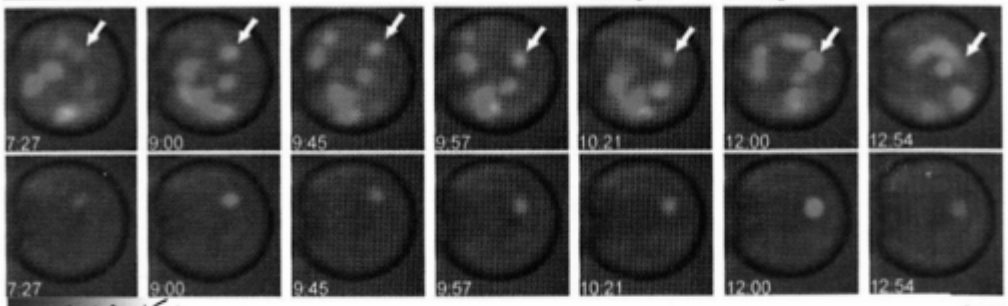
شکل ۱۳-۲۵



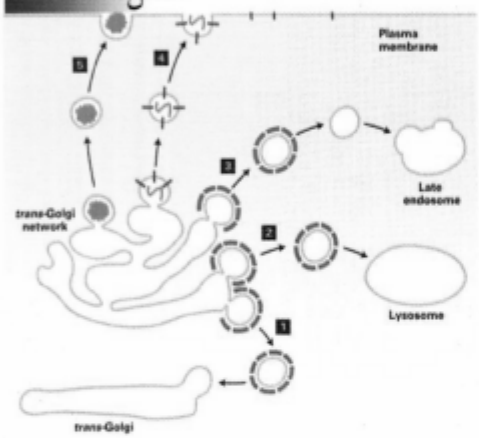
شکل ۱۳-۲۴

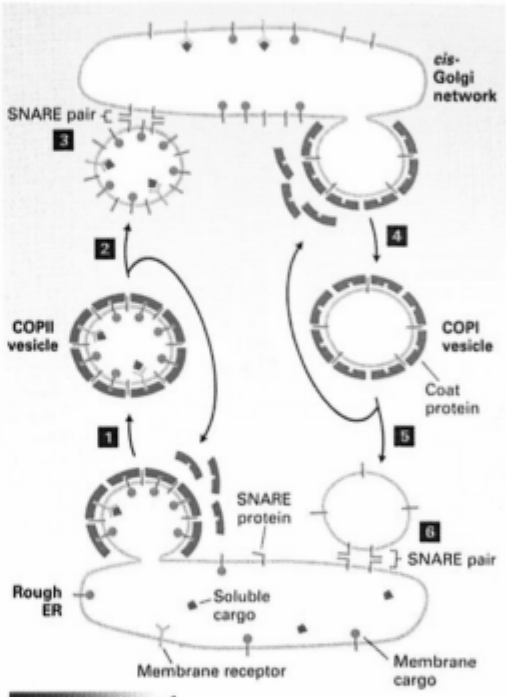


شکل ۱۴-۴



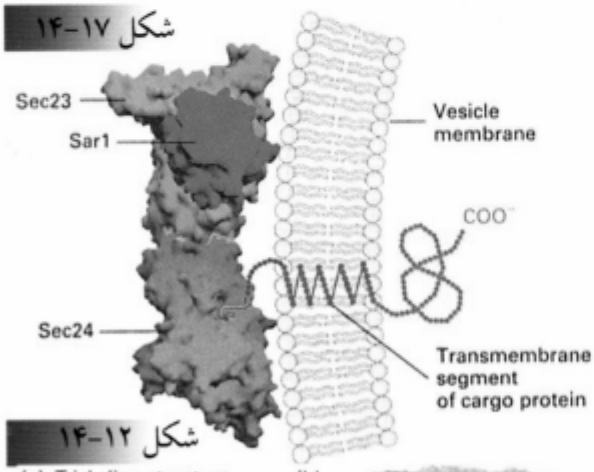
شکل ۱۴-۱۶





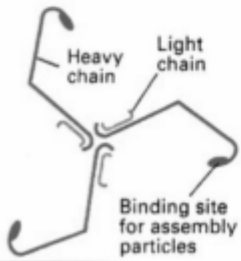
شکل ۱۴-۱۱

شکل ۱۴-۱۷

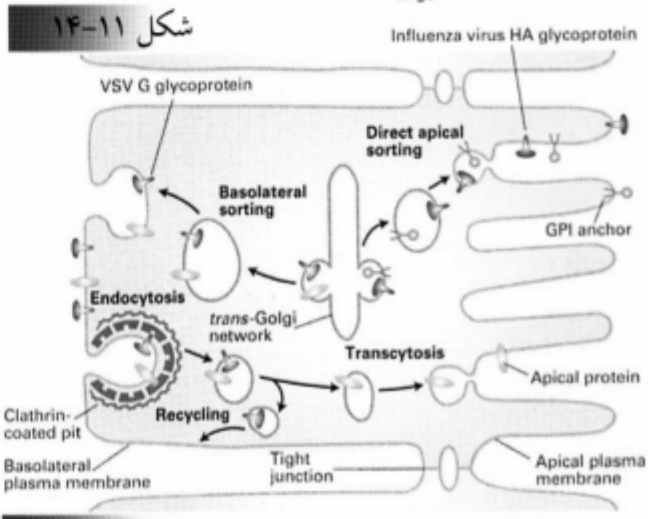


شکل ۱۴-۱۲

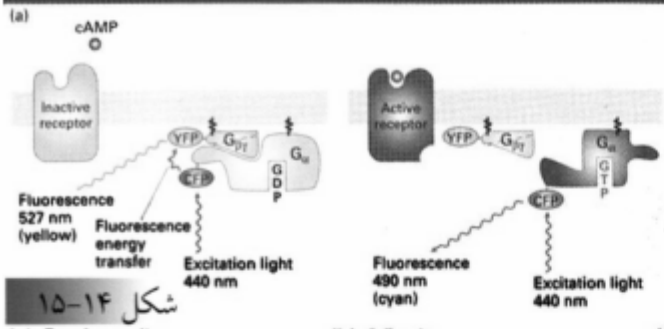
(a) Triskelion structure (b)

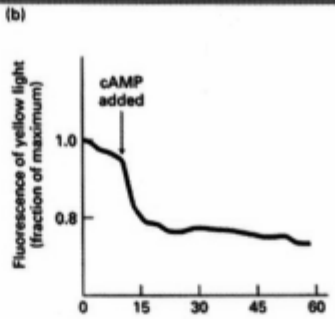


شکل ۱۴-۱۸

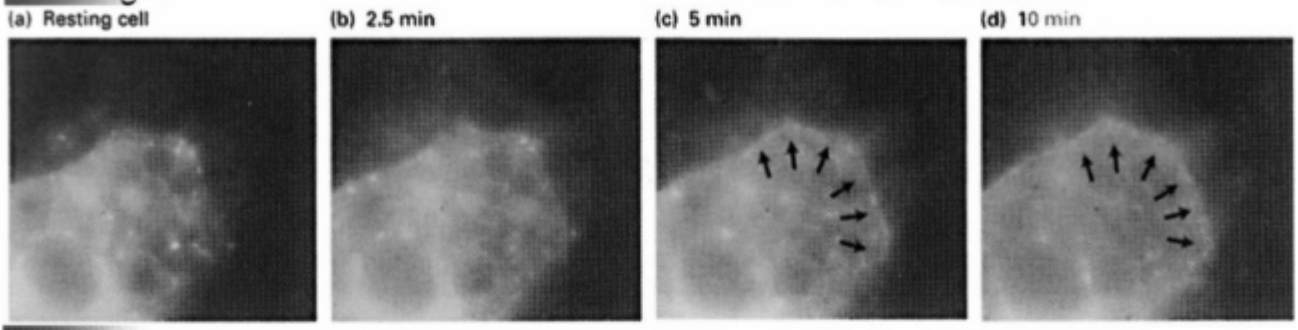


شکل ۱۴-۲۵

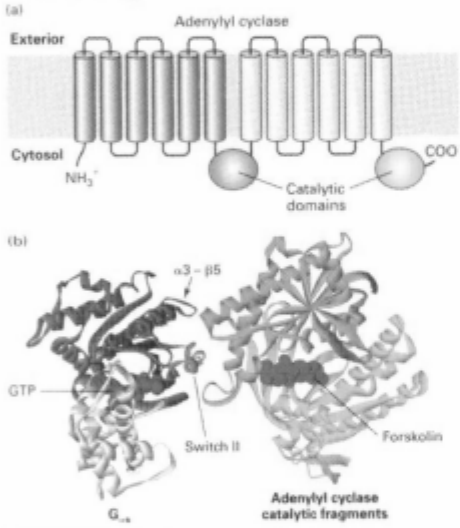


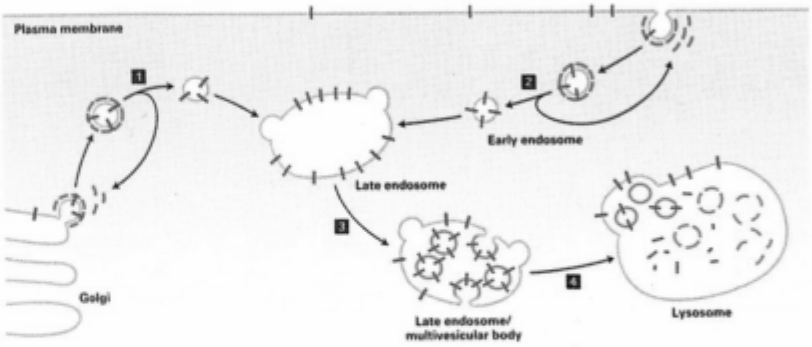


شکل ۱۴-۱۵



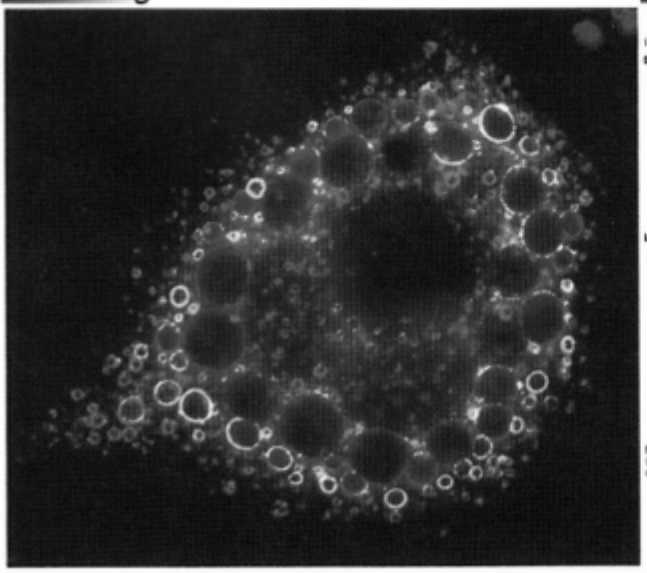
شکل ۳۴-۱۴

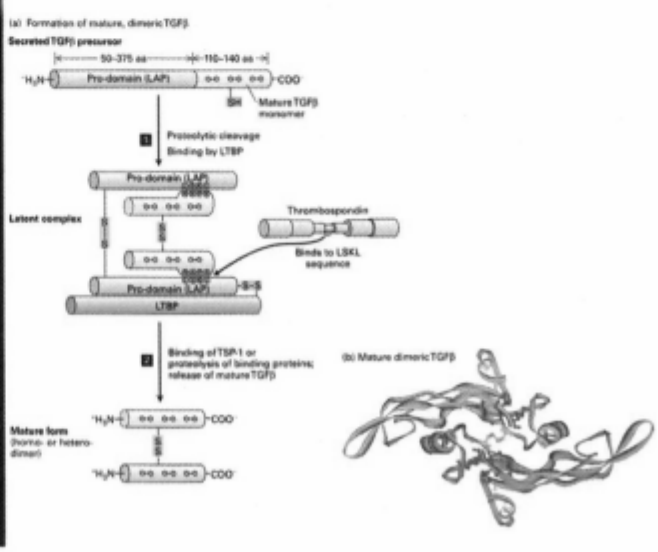




شکل ۲۲-۱۵

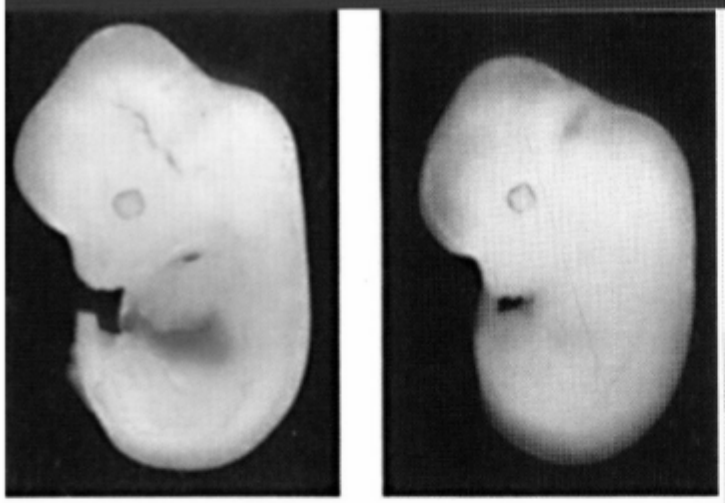
شکل ۳۲-۱۵

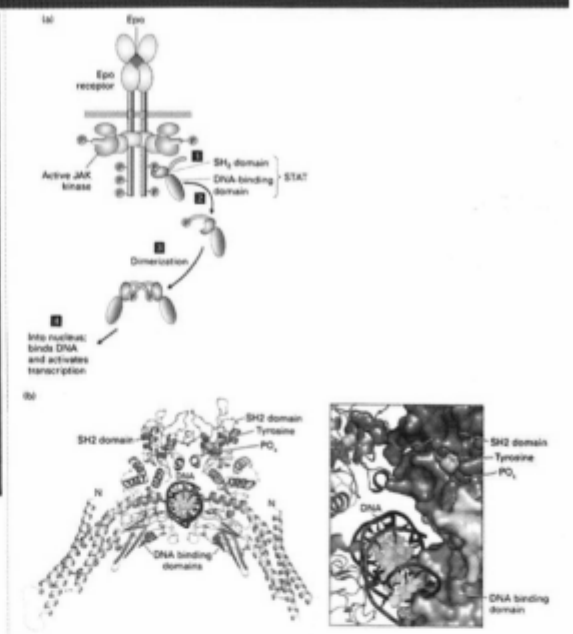




شکل ۶۲۳

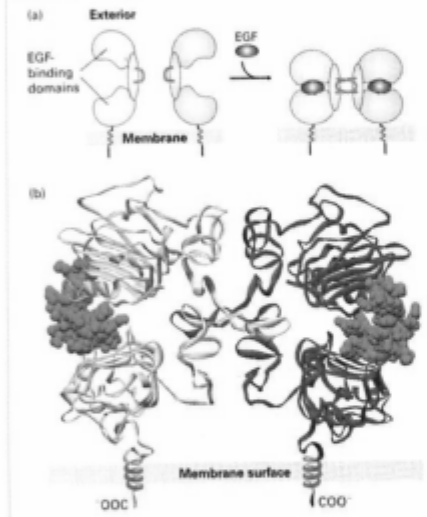
شکل ۳-۱۶

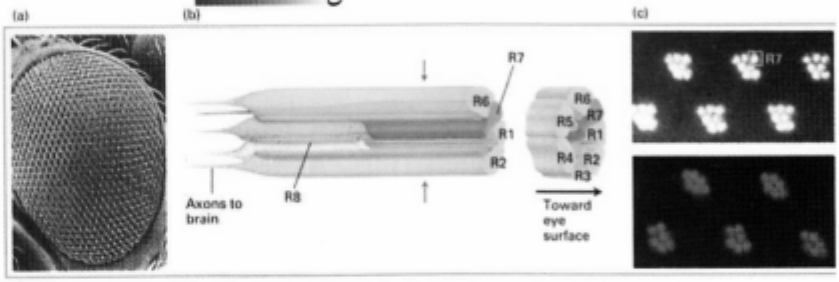




شکل ۱۶-۹

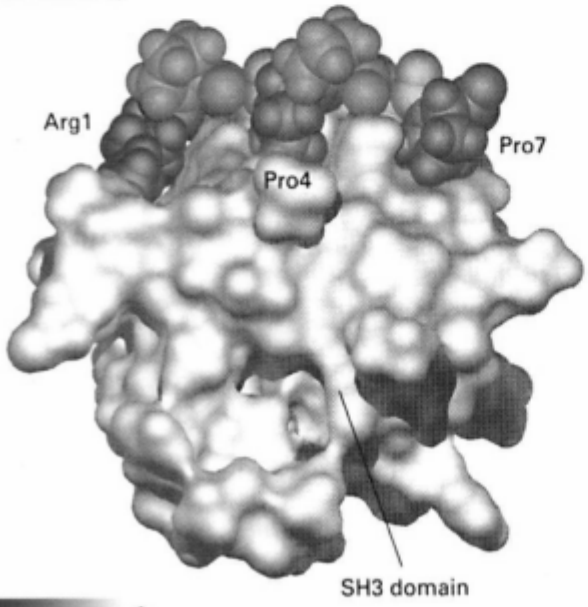
شکل ۱۶-۱۲

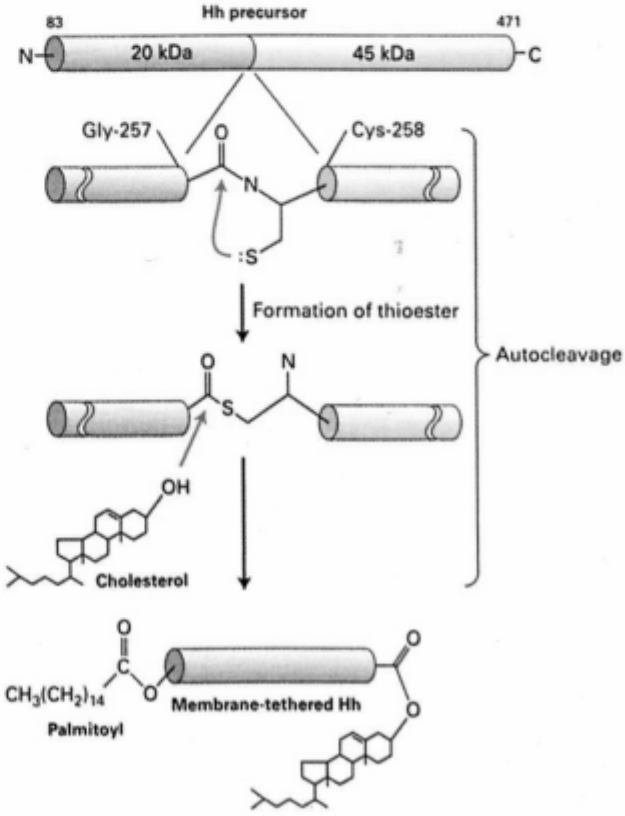




شکل ۱۶-۲۱

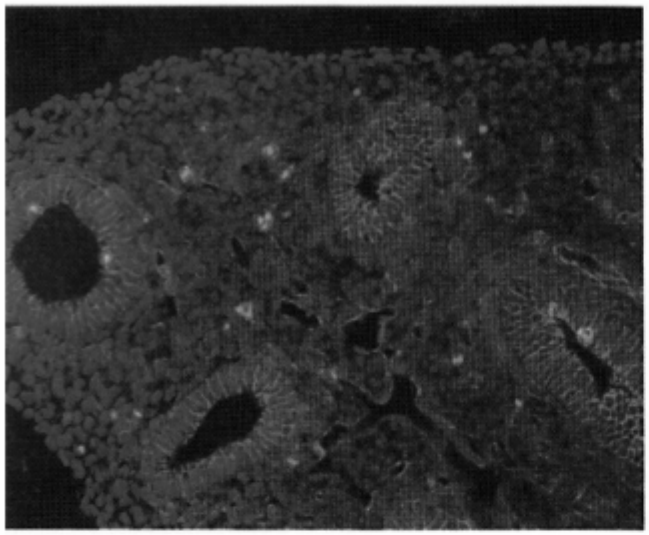
شکل ۱۶-۱۸



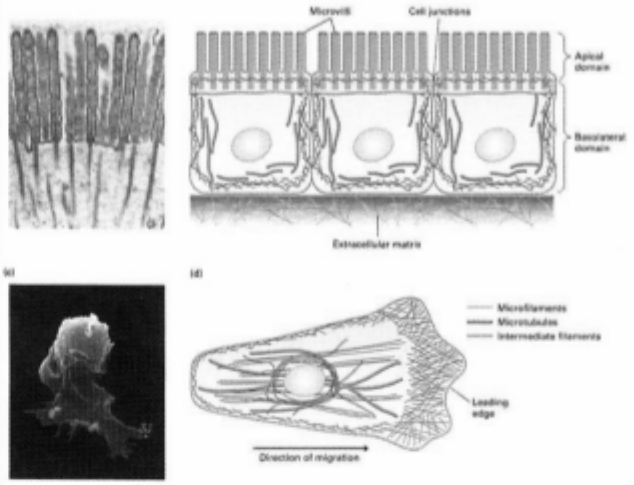


شکل ۱۶-۲۳

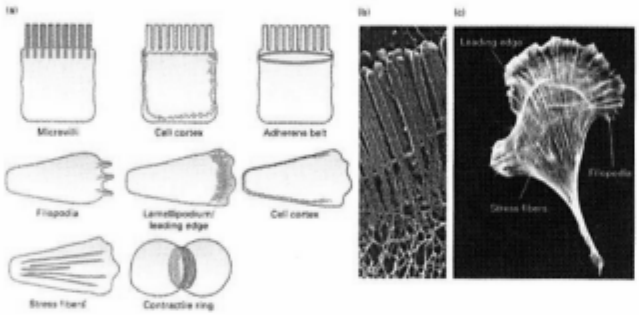
شکل ۱۶-۳۳



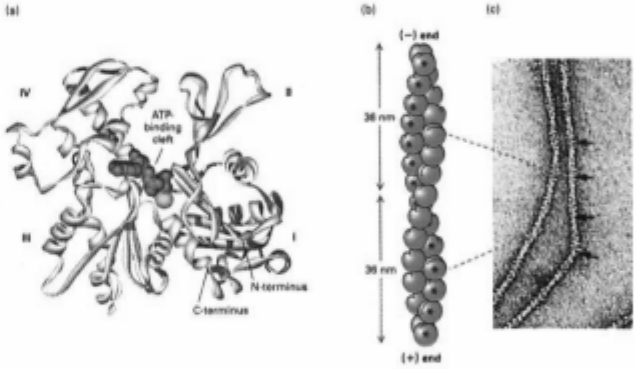
شکل ۶۶۵



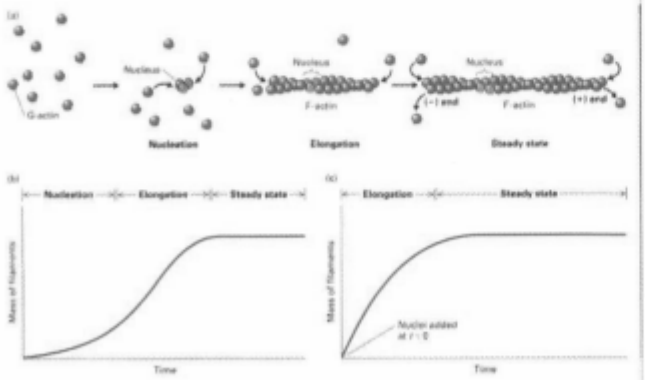
شکل ۱-۱۷



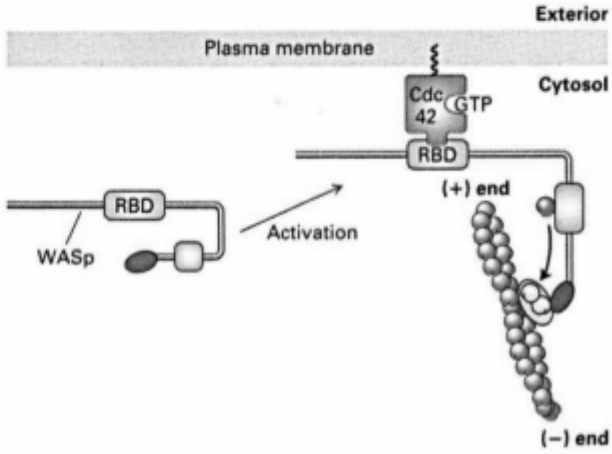
شکل ۴-۱۷



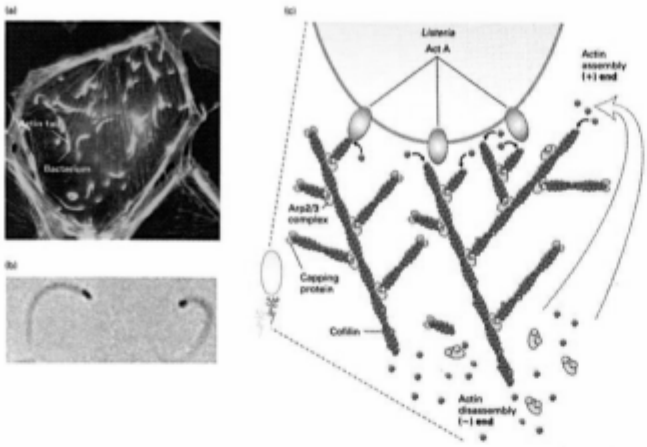
شکل ۵-۱۷



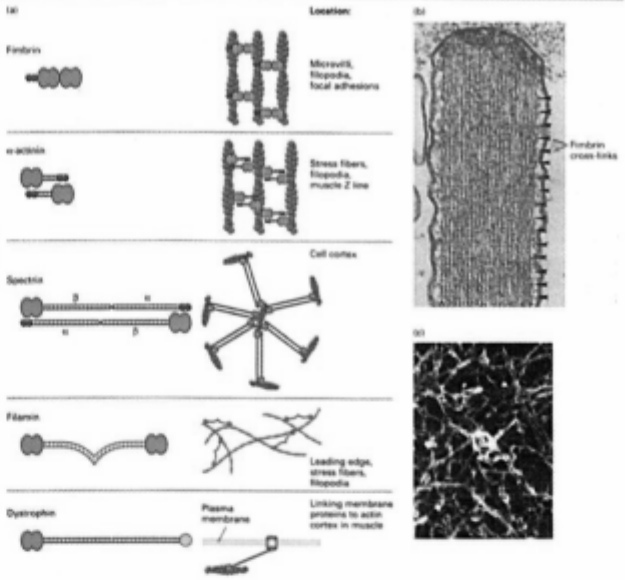
شکل ۷-۱۷



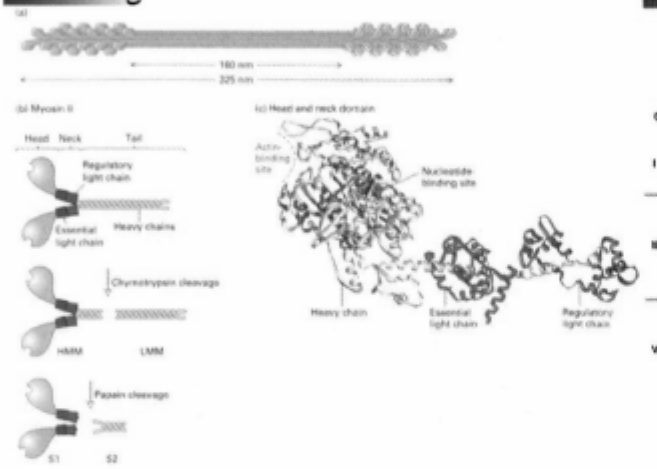
شکل ۱۶-۱۷



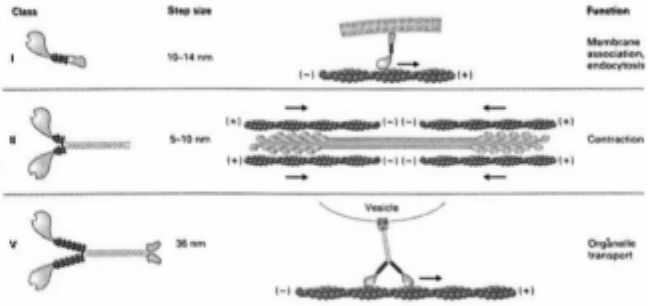
شکل ۱۷-۱۷



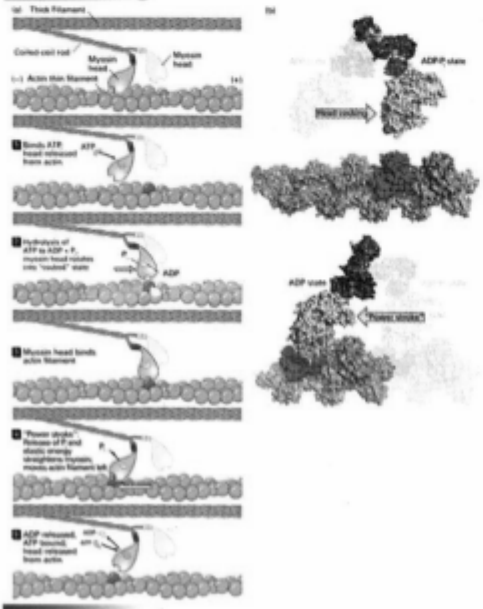
شکل ۱۷-۱۸



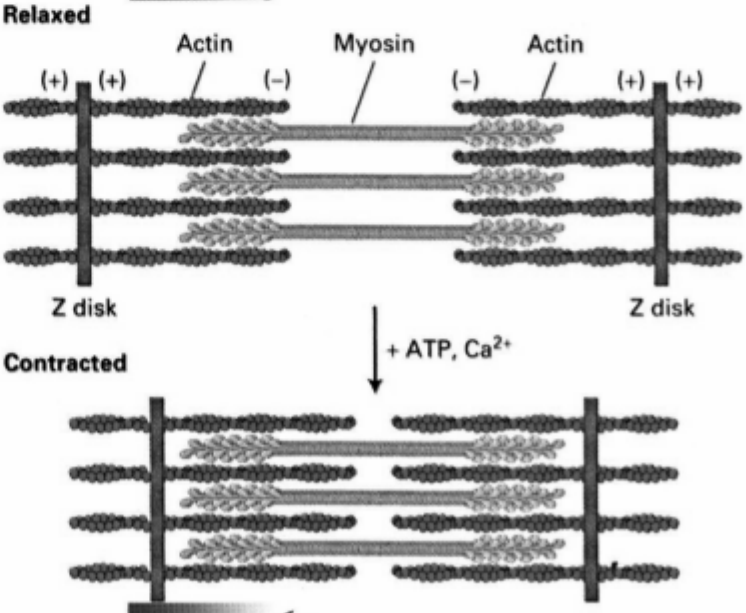
شکل ۱۷-۲۰



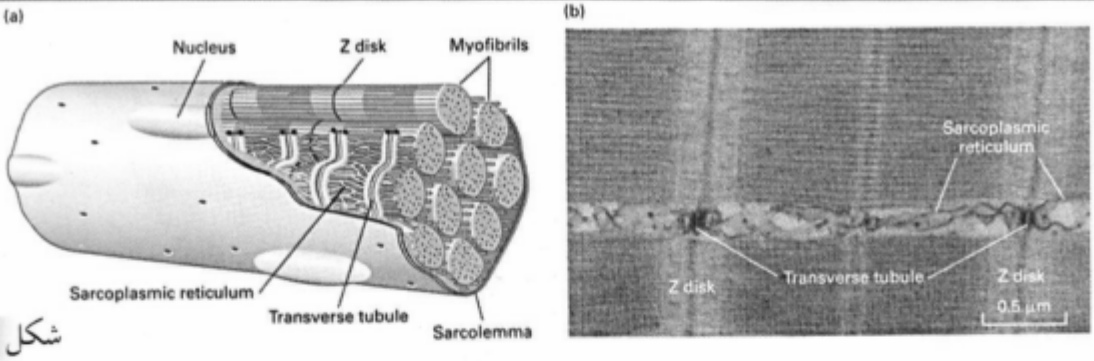
شکل ۱۷-۲۳



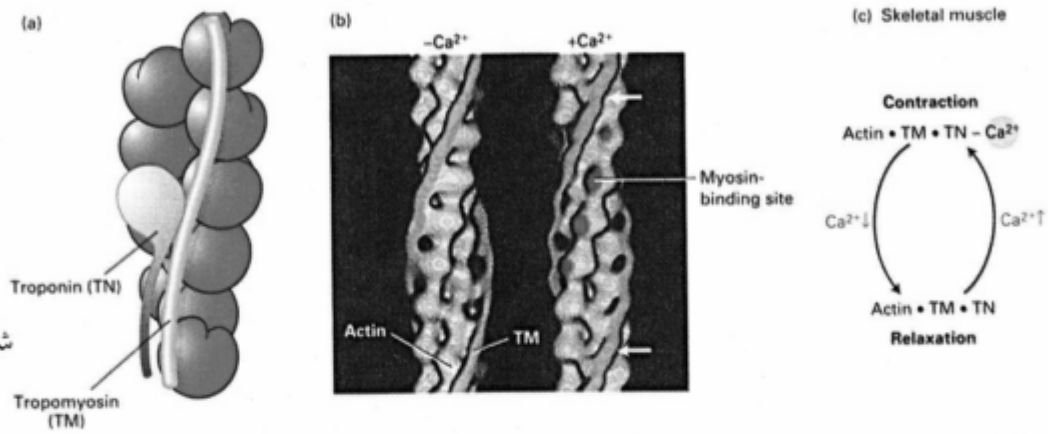
شکل ۱۷-۲۴



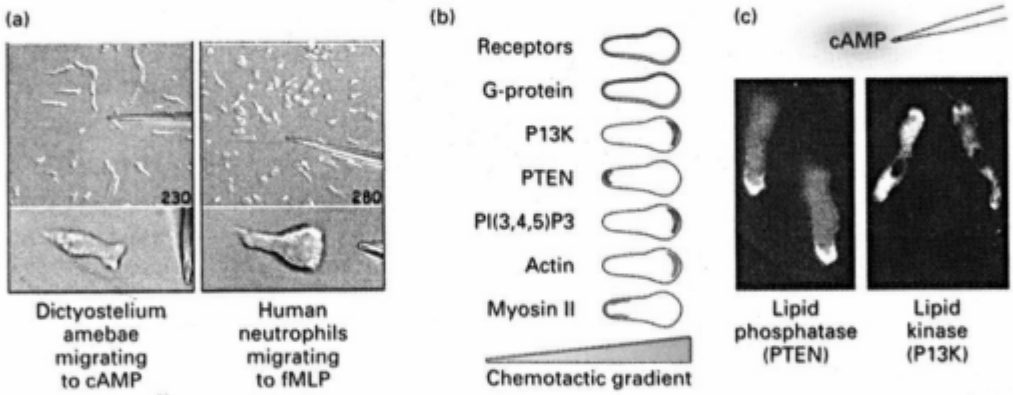
شکل ۱۷-۳۰



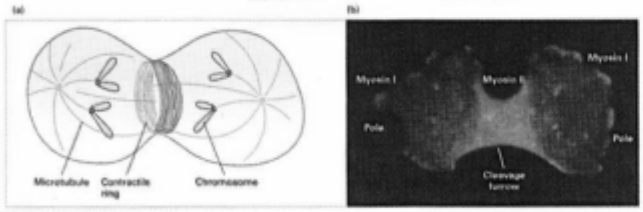
شکل ۳۲-۱۷



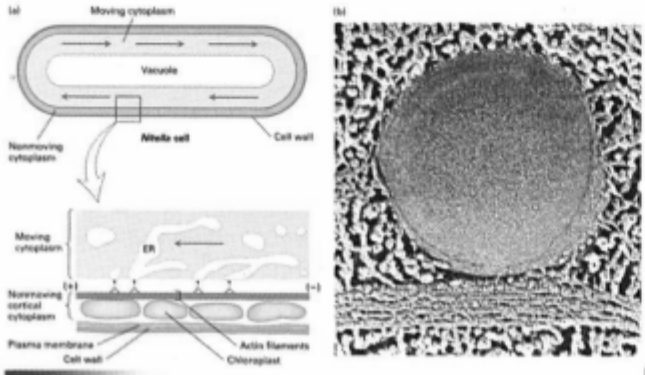
شکل ۳۳-۱۷



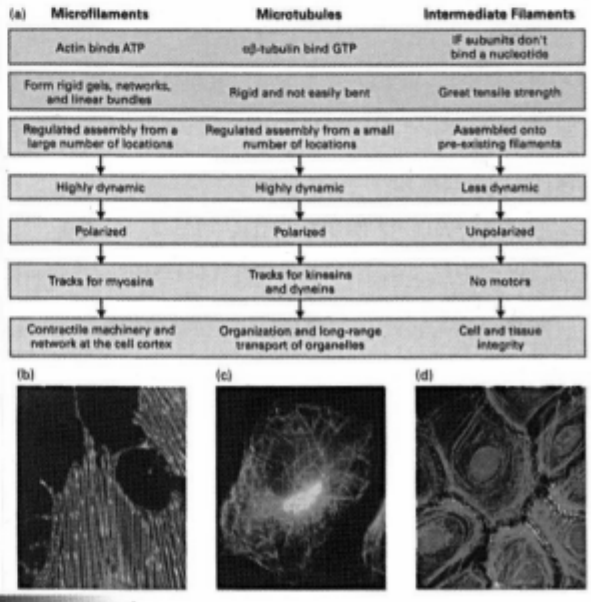
شکل ۴۵-۱۷



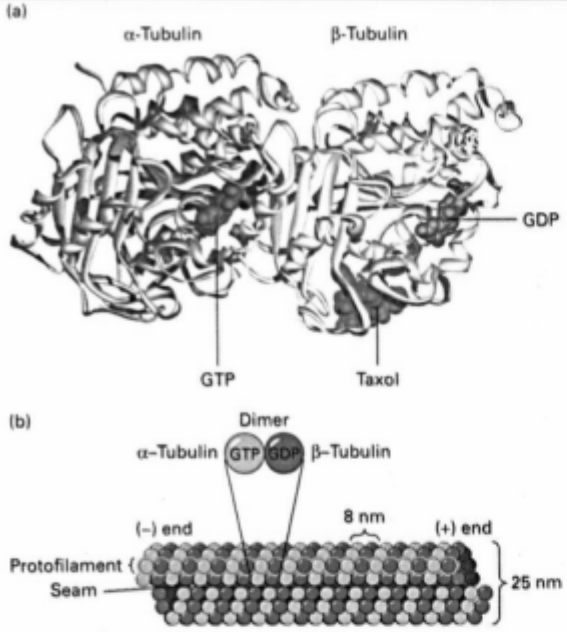
شکل ۳۴-۱۷



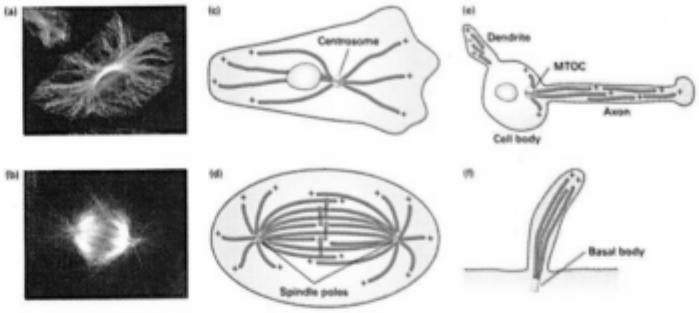
شکل ۴۵-۱۷



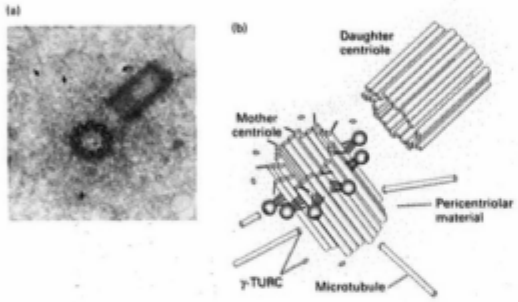
شکل ۱-۱۸



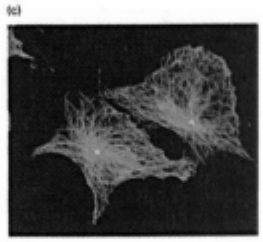
شکل ۳-۱۸

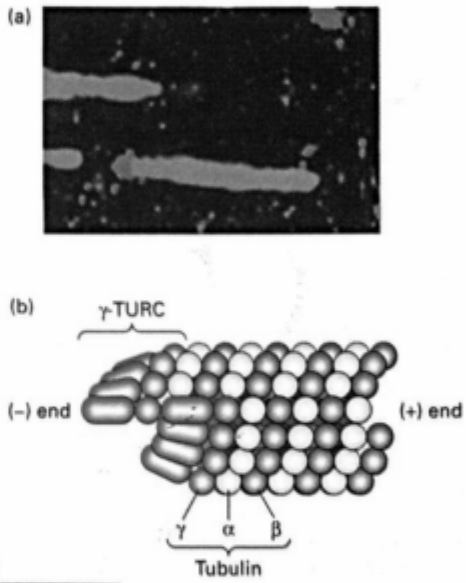


شکل ۵-۱۸

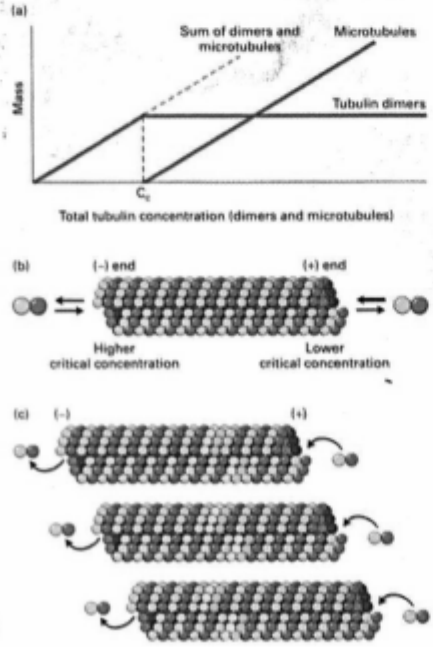


شکل ۶-۱۸

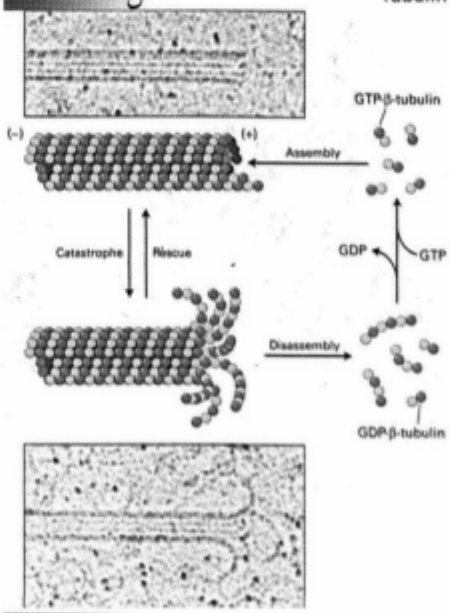




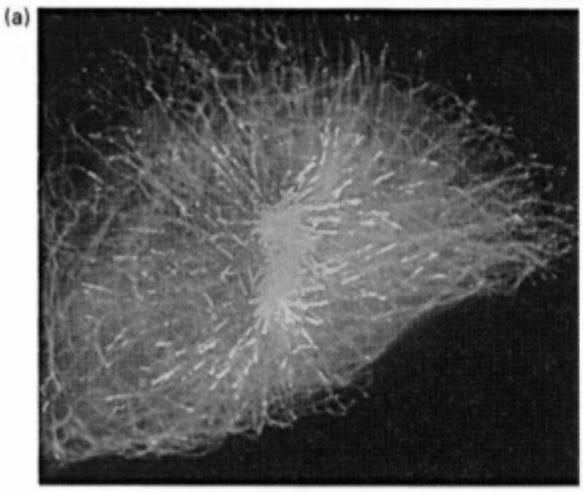
شکل ۷-۱۸

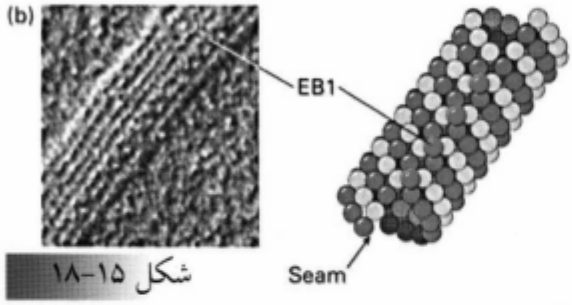


شکل ۸-۱۸

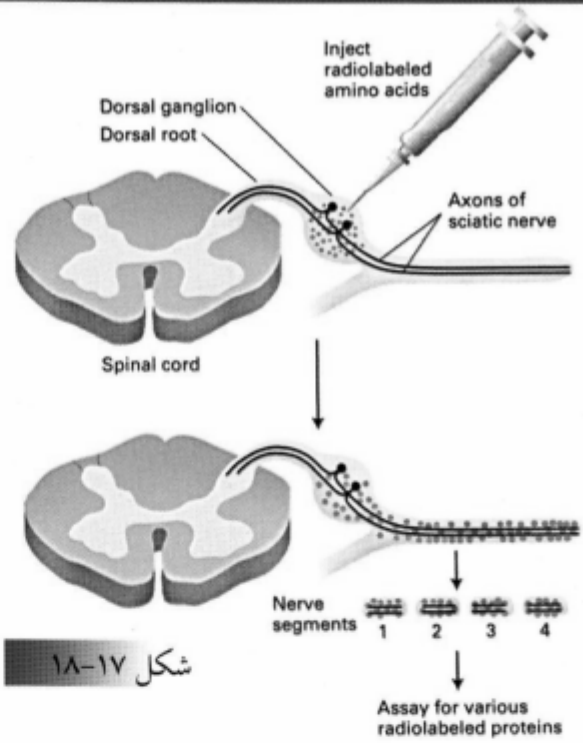


شکل ۱۲-۱۸

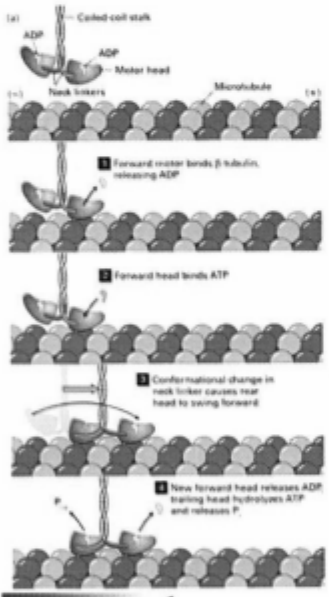


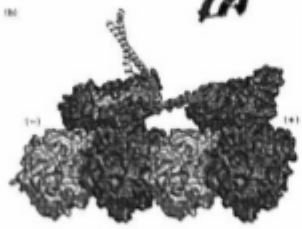


شکل ۱۸-۱۵

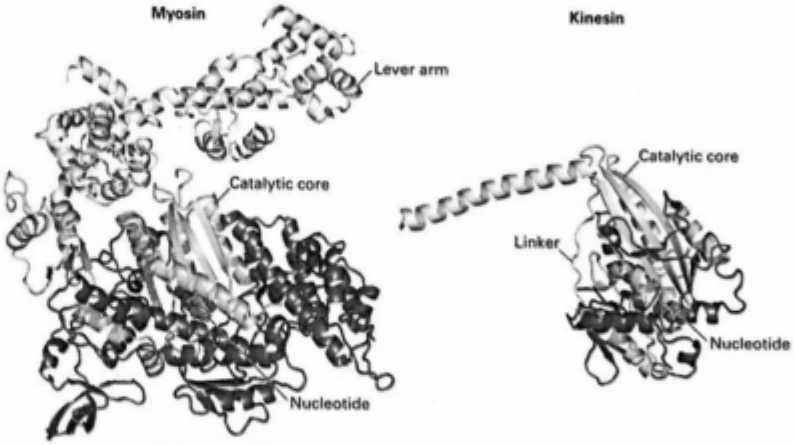


شکل ۱۸-۱۷

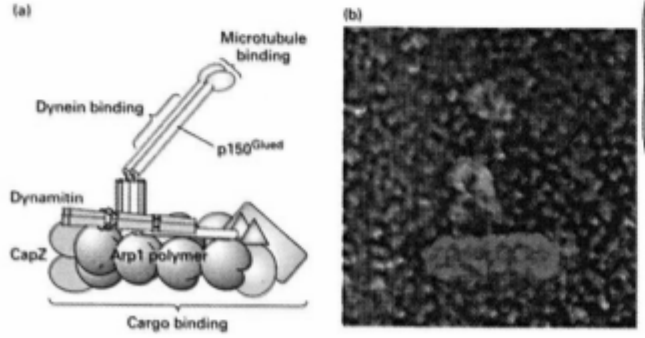




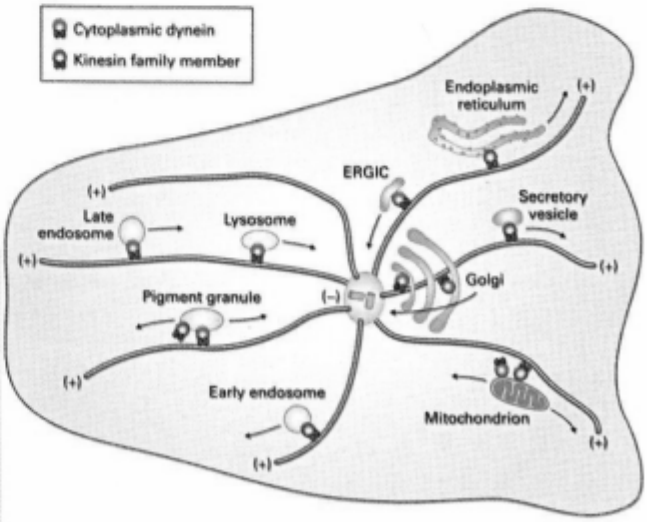
شکل ۱۸-۲۲



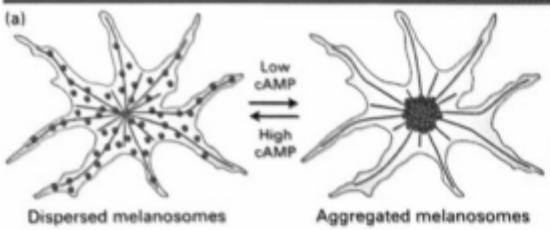
شکل ۱۸-۲۳

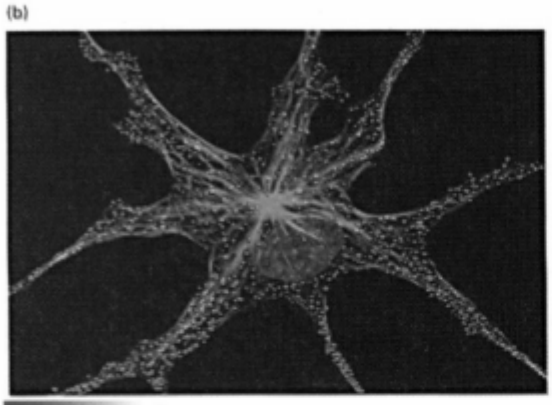


شکل ۱۸-۲۶

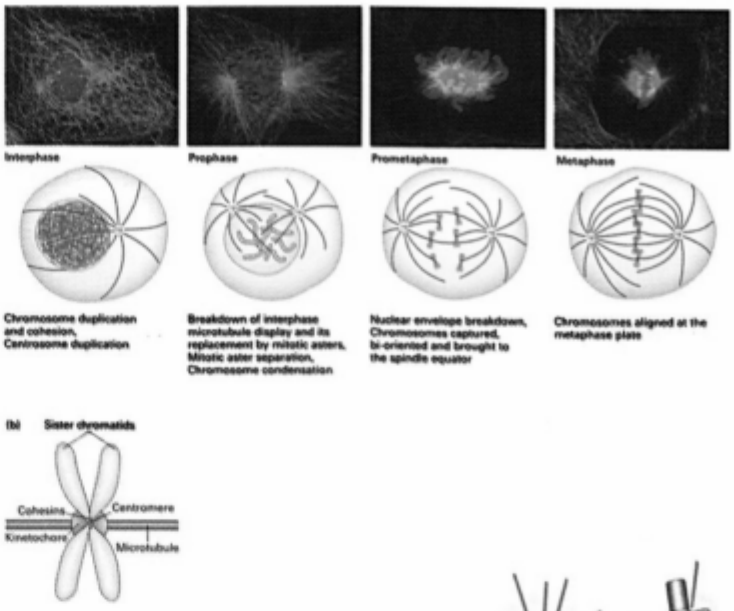


شکل ۱۸-۲۷

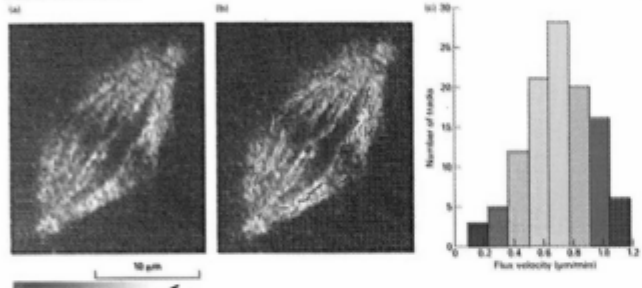




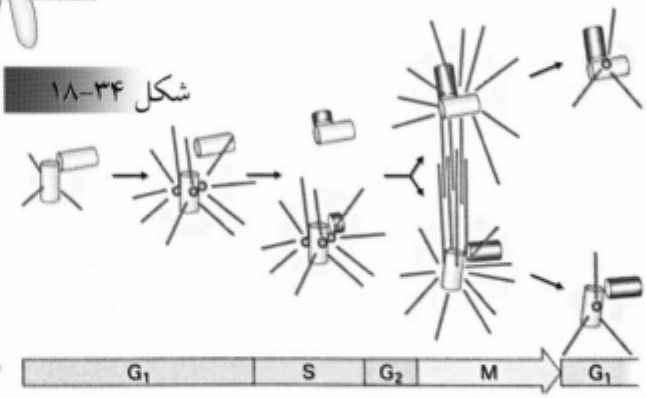
شکل ۱۸-۲۸



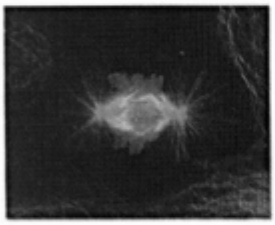
شکل ۱۸-۳۴



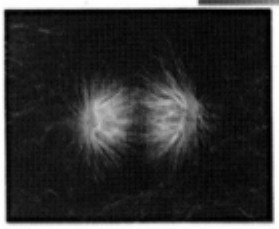
شکل ۱۸-۳۸



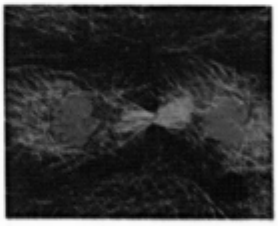
شکل ۱۸-۳۵



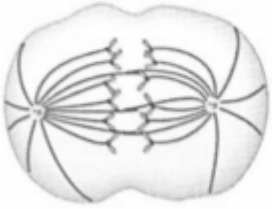
Anaphase



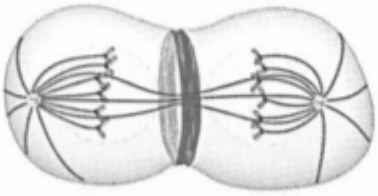
Telophase



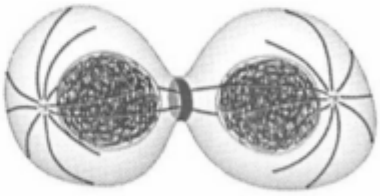
Cytokinesis



APC/C activated and cohesins degraded
Anaphase A: Chromosome movement to poles
Anaphase B: Spindle pole separation

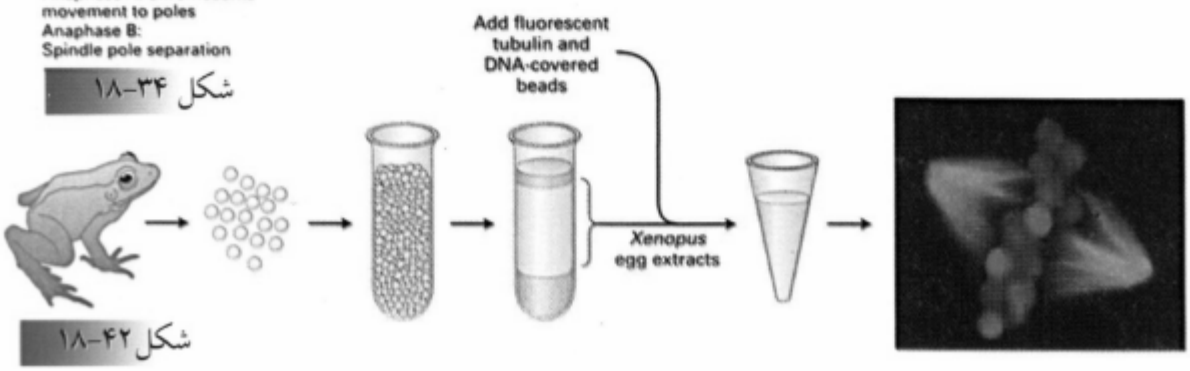


Nuclear envelope reassembly, Assembly of contractile ring

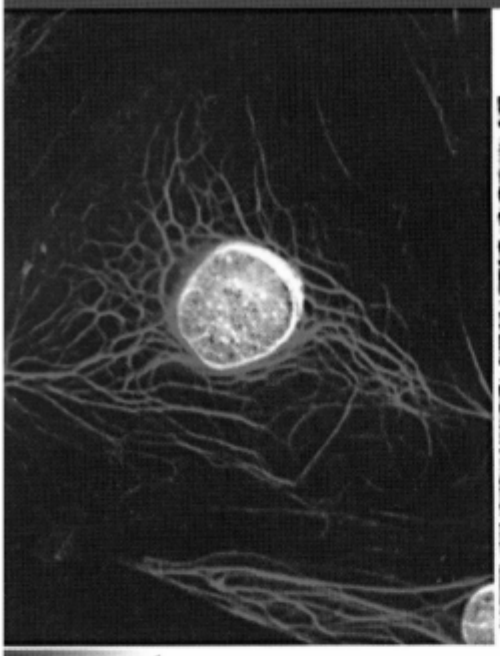


Reformation of interphase microtubule array, Contractile ring forms cleavage furrow

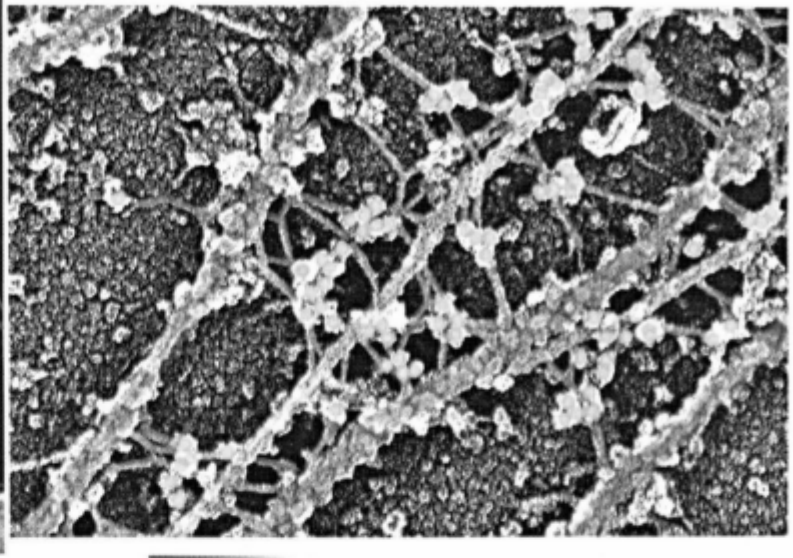
شکل ۱۸-۳۴



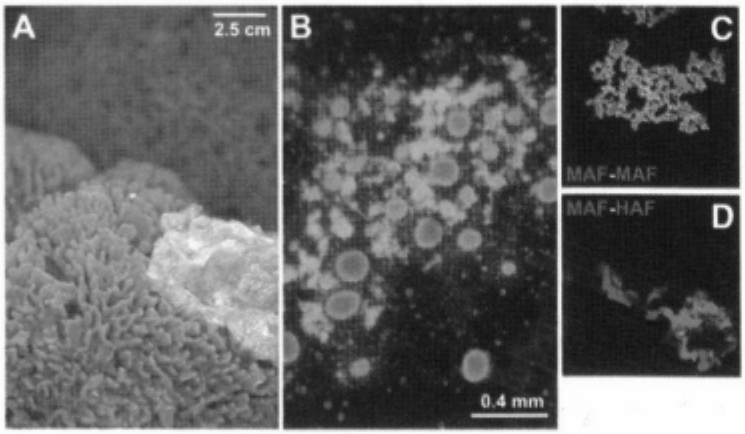
شکل ۱۸-۴۲



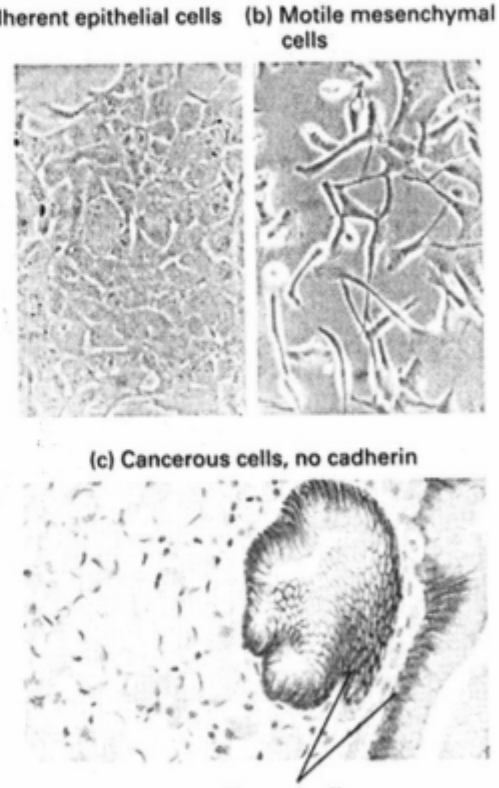
شکل ۱۸-۴۴



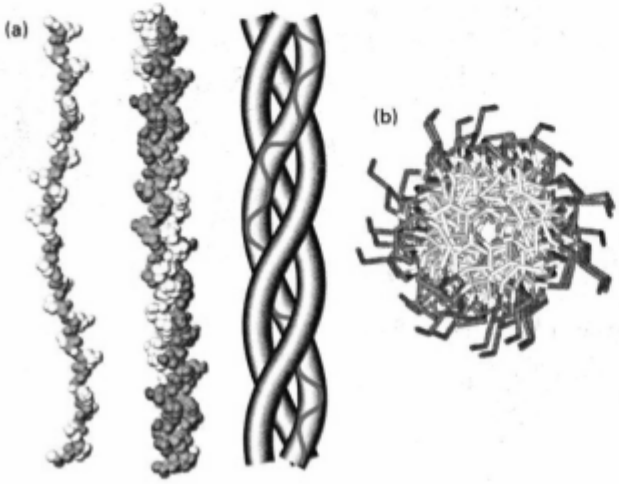
شکل ۱۸-۴۸



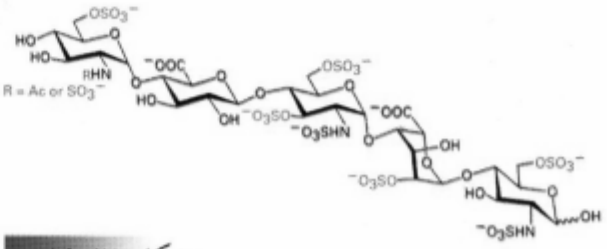
شکل ۱۹-۴



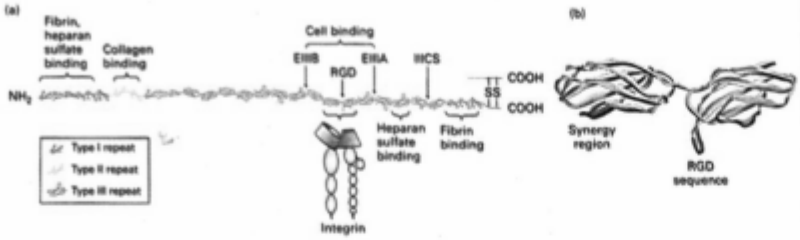
شکل ۱۹-۱۳



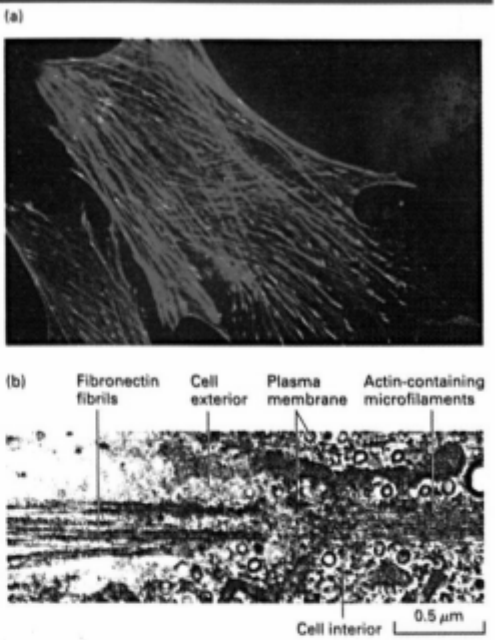
شکل ۱۹-۲۲



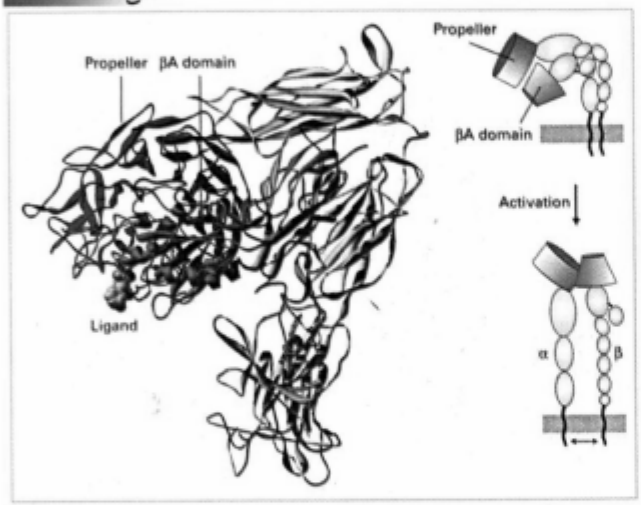
شکل ۱۹-۲۸



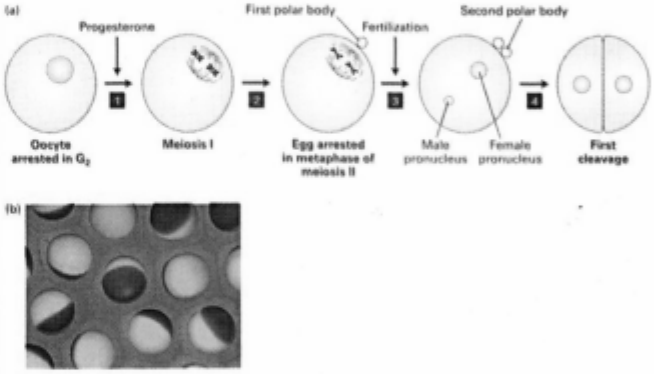
شکل ۱۹-۳۰



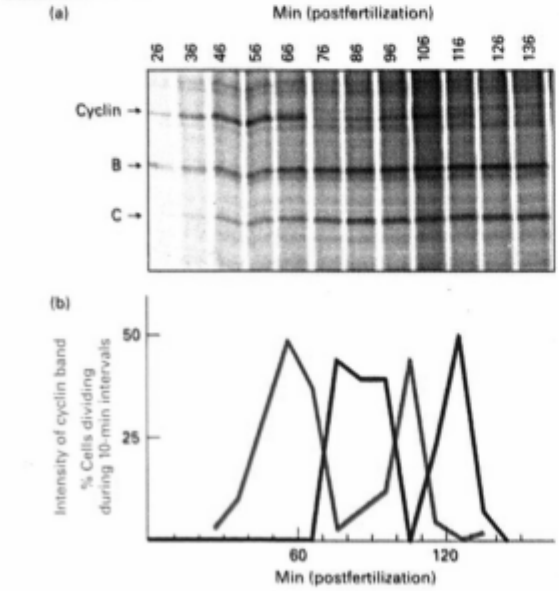
شکل ۱۹-۳۲



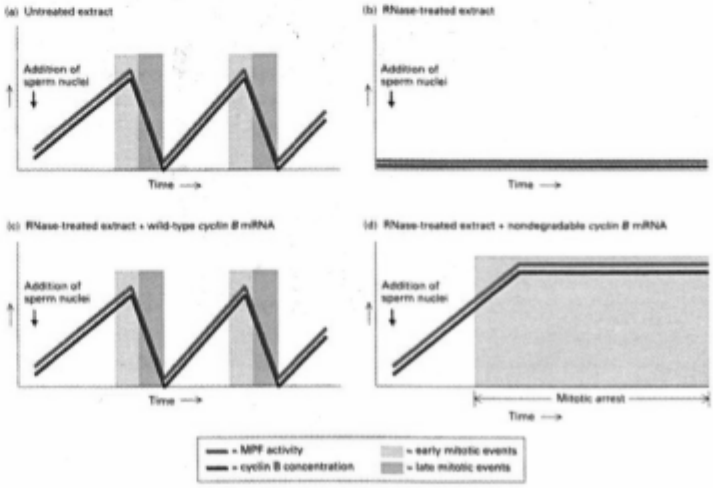
شکل ۱۹-۳۴



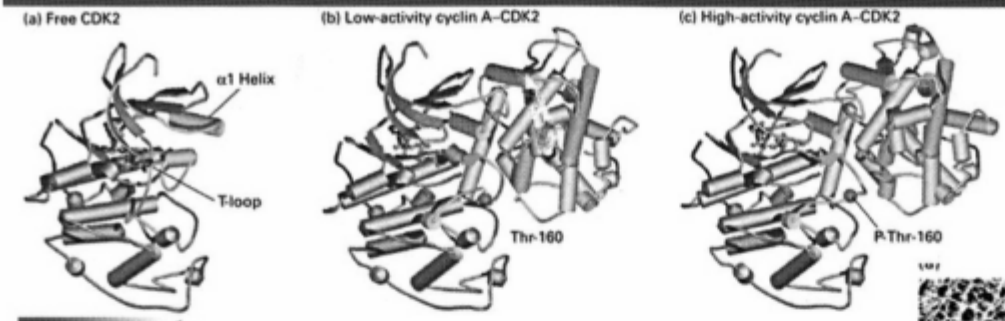
شکل ۲۰-۵



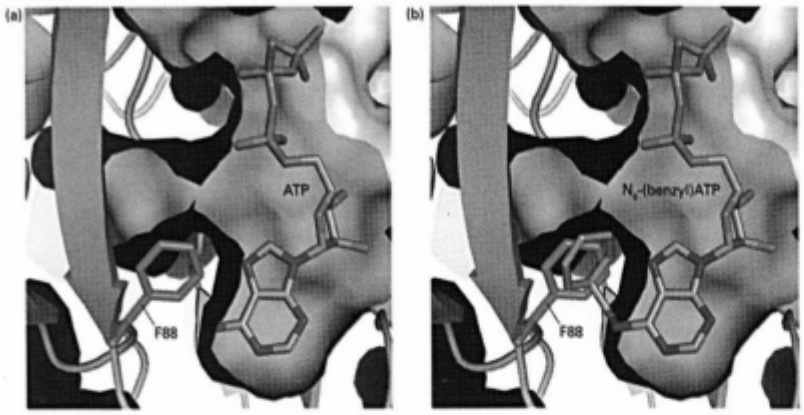
شکل ۲۰-۸



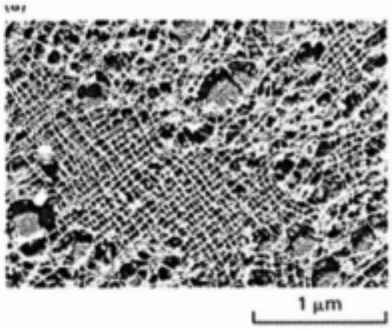
شکل ۲۰-۹

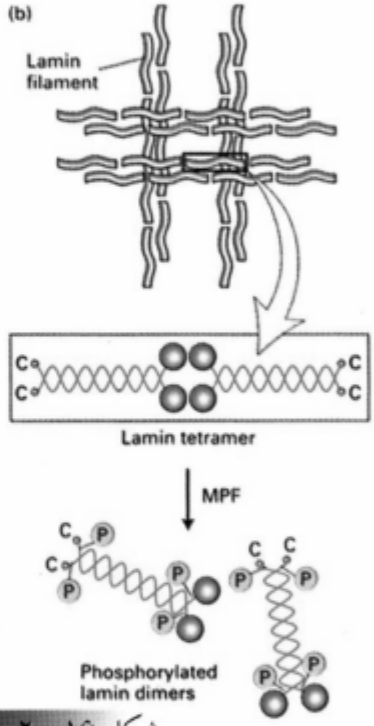


شکل ۲۰-۱۵

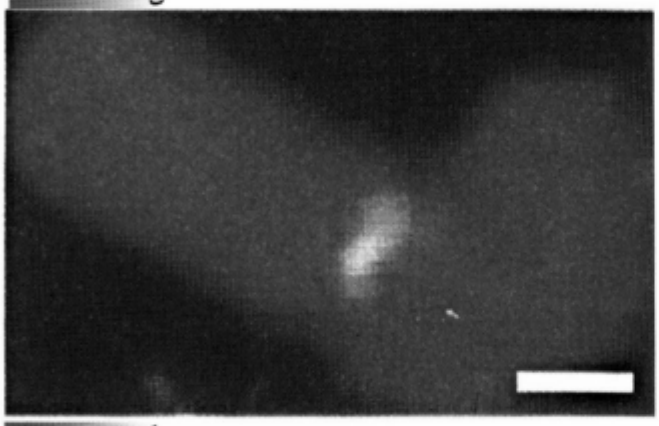


شکل ۲۰-۱۹

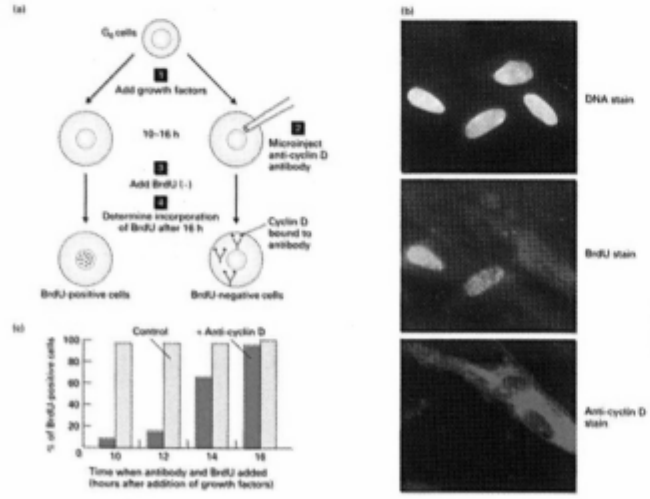




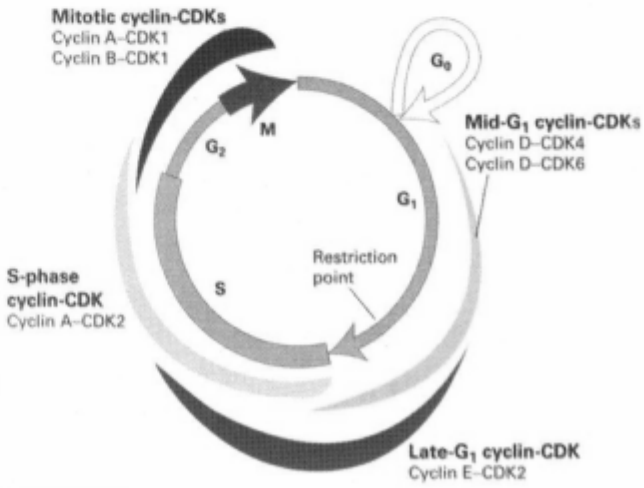
شکل ۲۰-۱۶



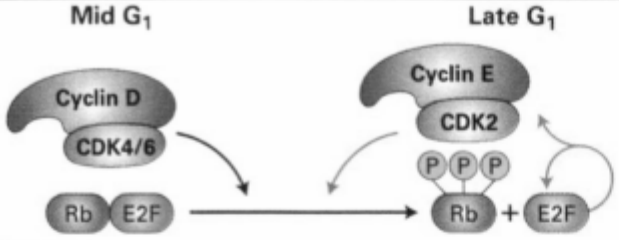
شکل ۲۰-۲۲



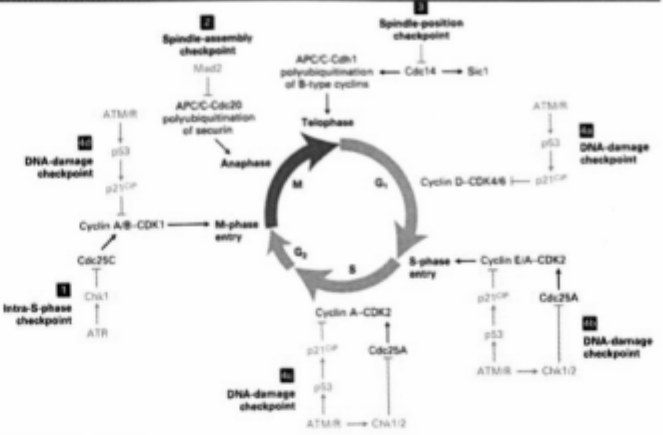
شکل ۲۰-۳۱



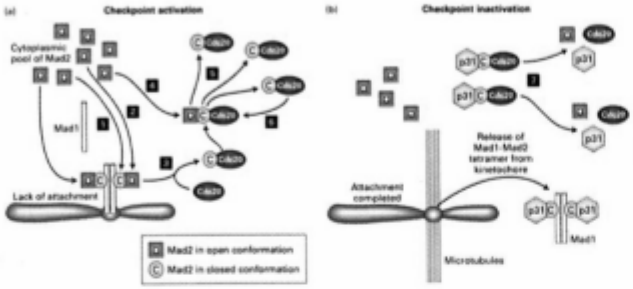
شکل ۲۰-۳۲



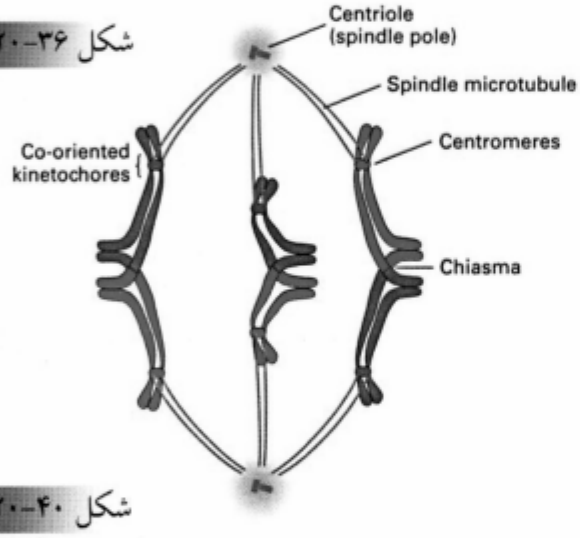
شکل ۳۳-۱۵



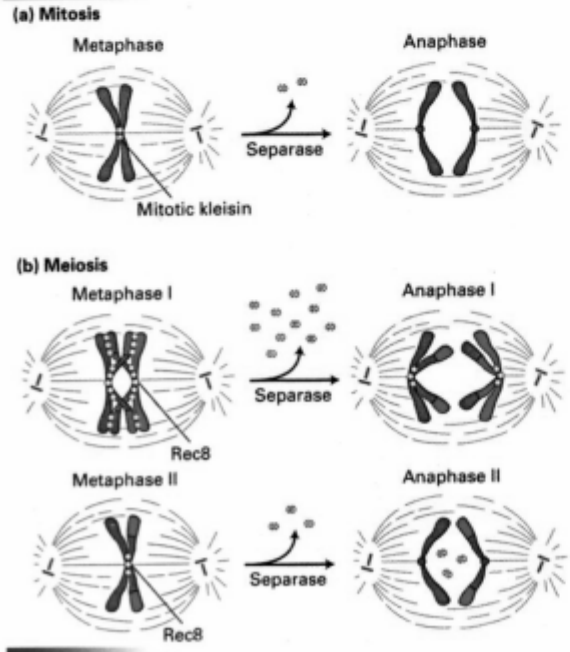
شکل ۳۵-۲۰



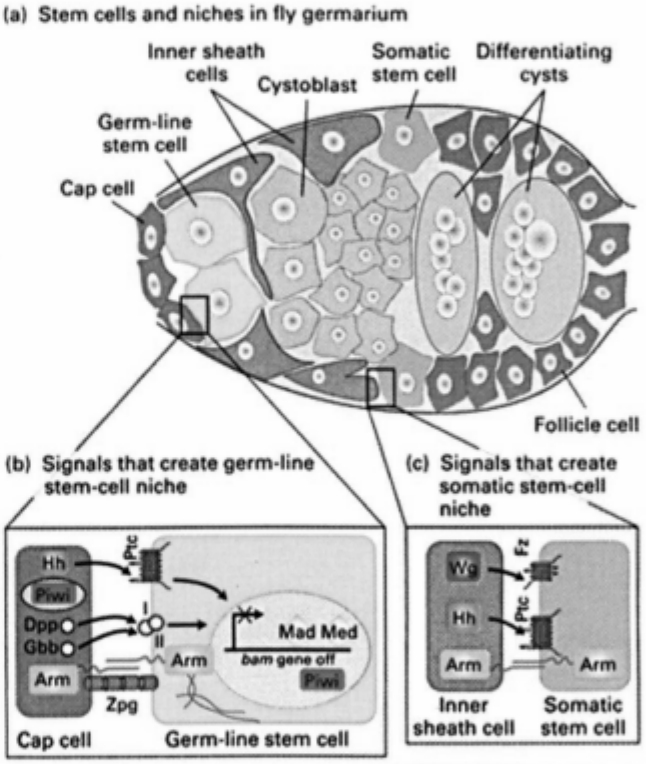
شکل ۳۶-۲۰



شکل ۴۰-۲۰

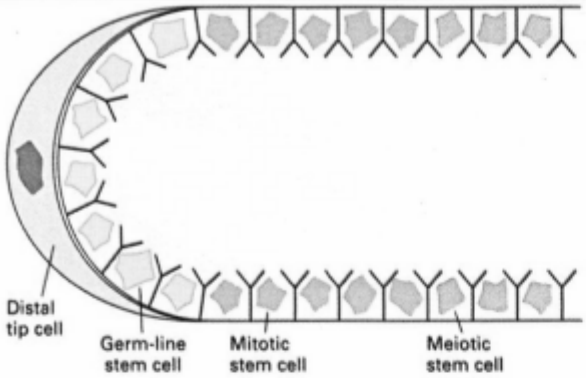


شکل ۴۱-۲۰

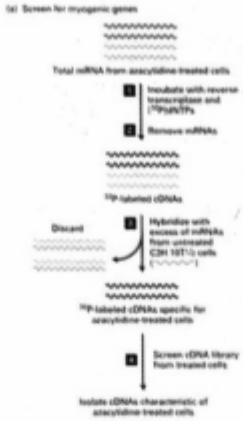


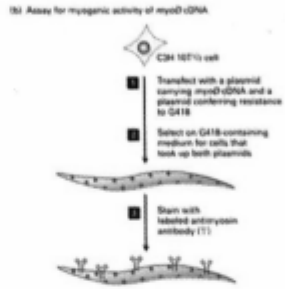
Cap cell	Germ-line stem cell	Inner sheath cell	Somatic stem cell
• Secretes Hh signal. • Secretes two TGFβ signals, Dpp & Gbb. • Produces Arm and Zpg surface proteins. • Has PIWI protein in the nucleus.	• Receives Hh through Ptc receptor, promoting self-renewal. • Receives Dpp and Gbb through TGFβ receptor subunits I and II, promoting self-renewal. • TGFβ protein signals cause activation of Mad and Med transcription factors to repress *bam* gene and allow self-renewal. • Produces Arm and Zpg surface proteins, which interact with themselves on the cap cell. • Has PIWI protein in the nucleus to promote stem cell fate.	• Secretes two signals, Wg and Hh. • Produces Arm protein on its surface.	• Receives Wg signals through the Fz receptors, promoting self-renewal. • Receives Hh signal through the Ptc receptor, promoting self-renewal. • Producs Arm, which interacts with Arm on inner sheath cell.

شکل ۸-۲۱

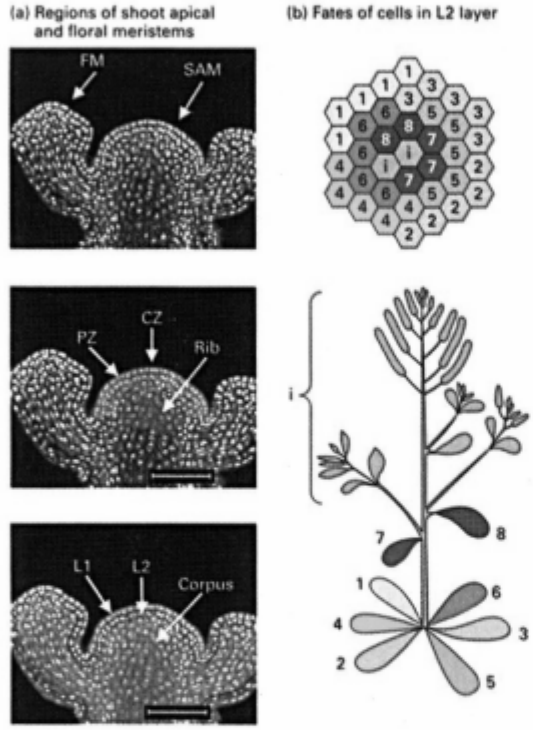


شکل ۲۱-۹

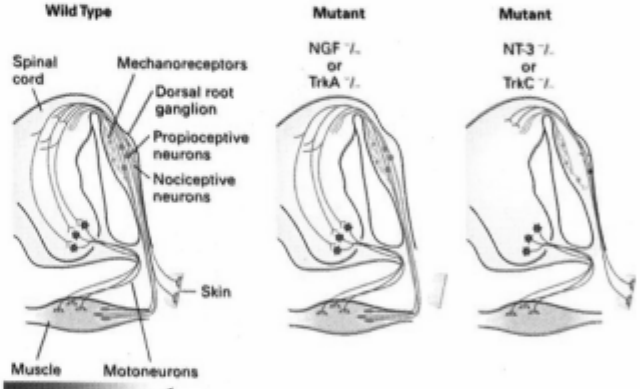




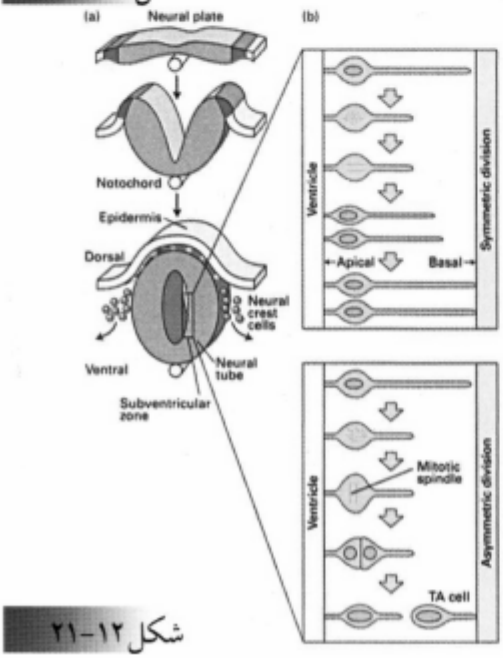
شکل ۲۱-۱۲



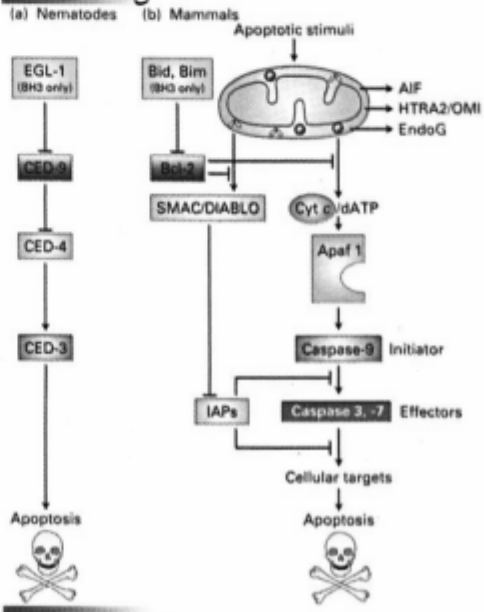
شکل ۲۱-۱۶



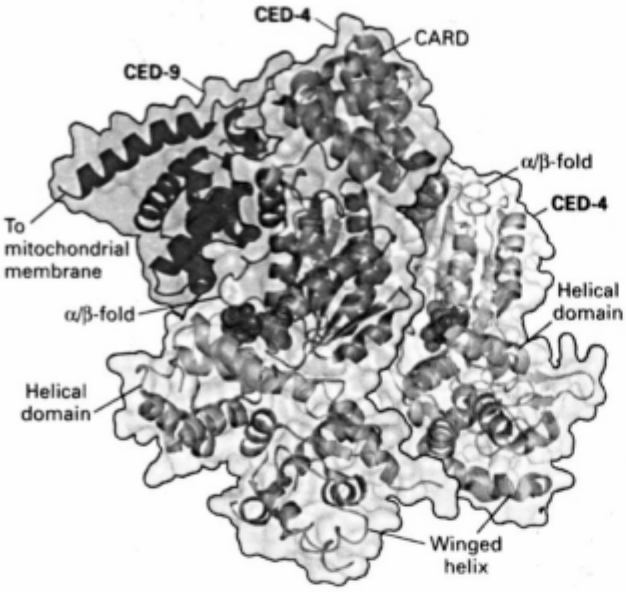
شکل ۲۱-۳۵



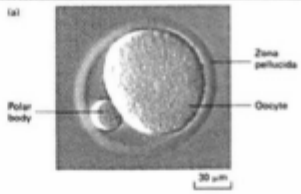
شکل ۲۱-۱۲

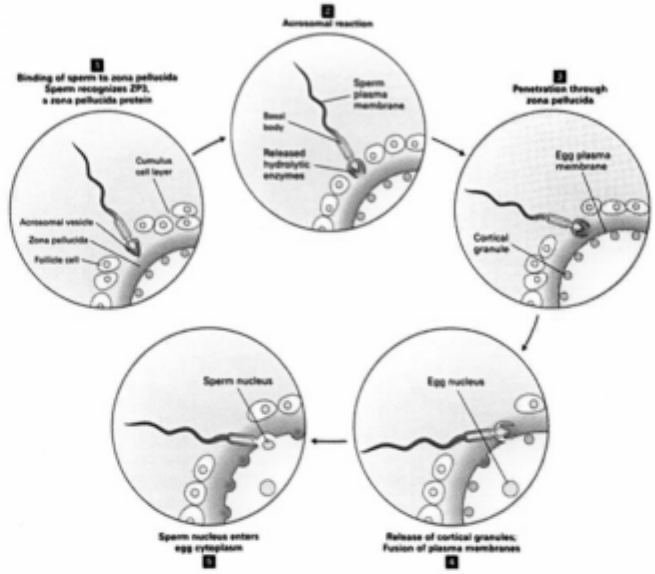


شکل ۲۱-۳۷

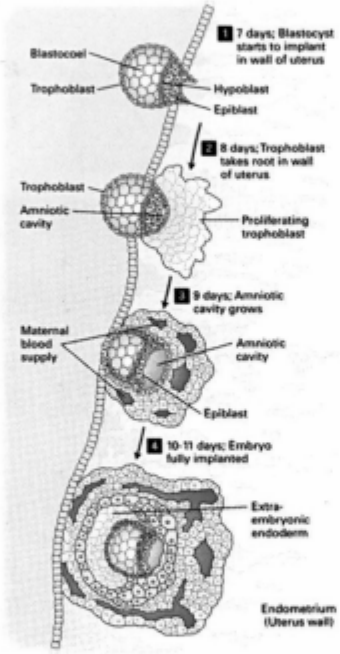


شکل ۳۸-۲۱

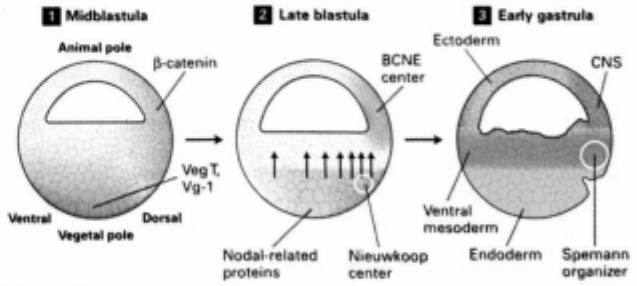




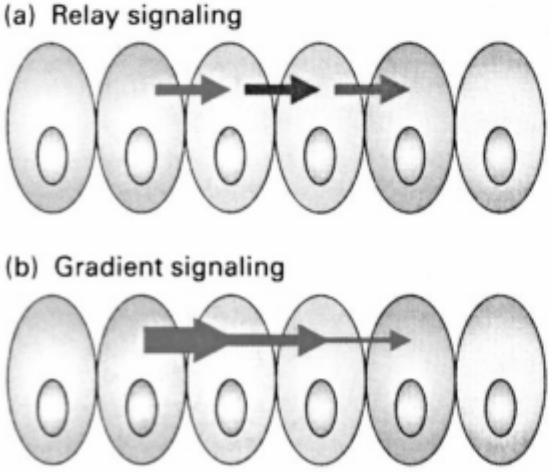
شکل ۵-۲۲



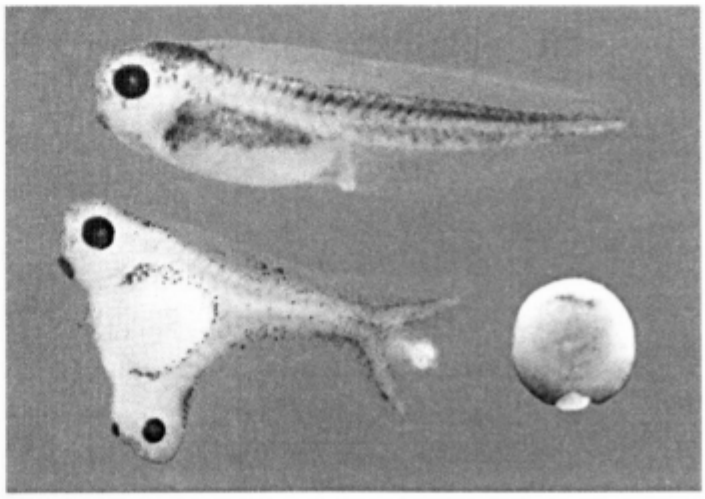
شکل ۱۰-۲۲



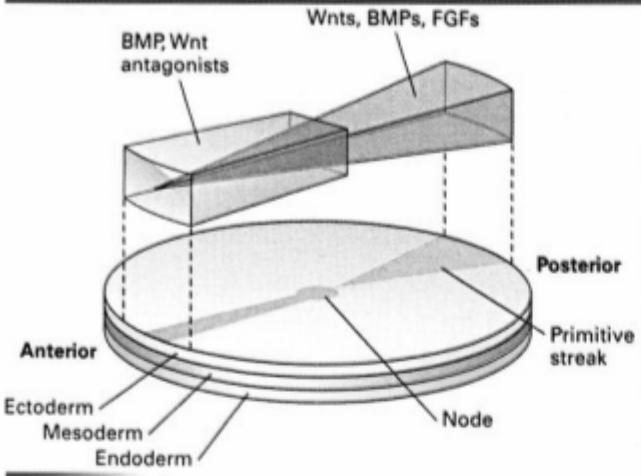
شکل ۱۲-۲۲



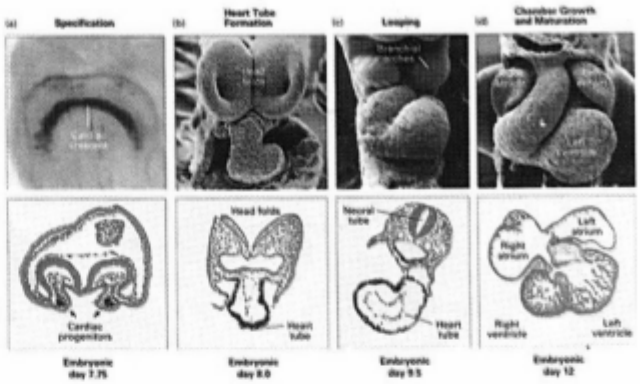
شکل ۱۳-۲۲



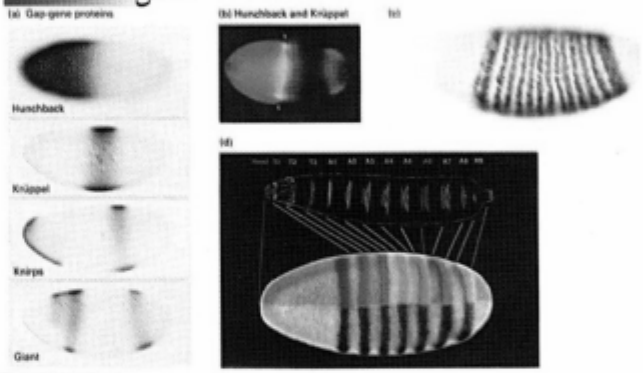
شکل ۱۴-۲۲



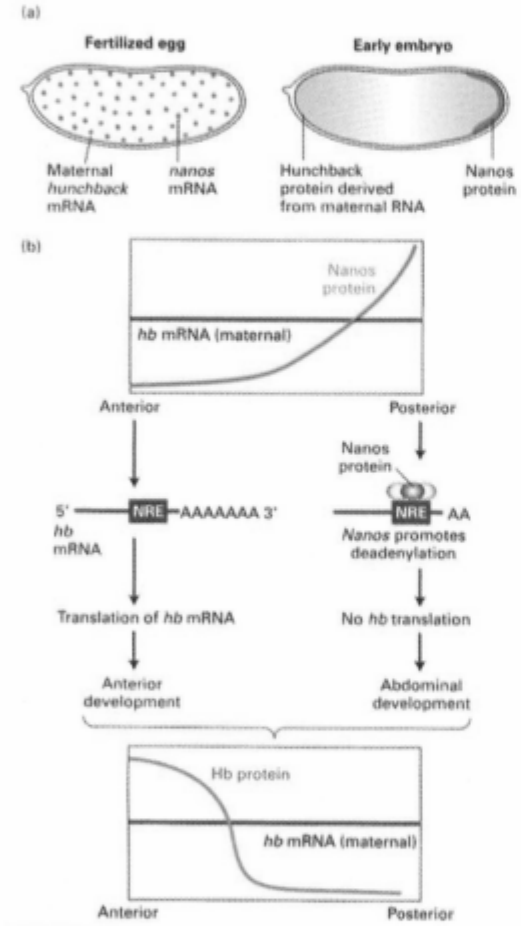
شکل ۱۶-۲۲



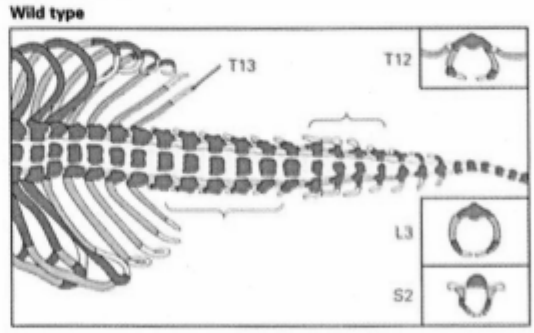
شکل ۱۸-۲۲

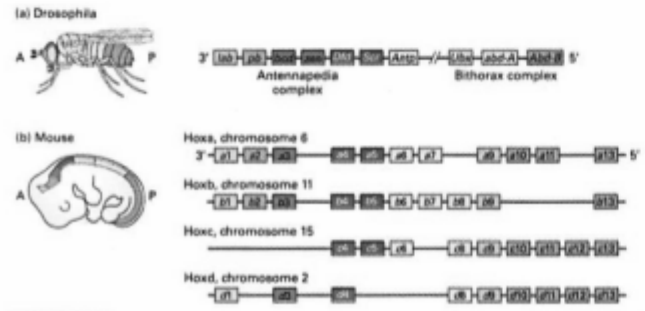


شکل ۲۷-۲۲

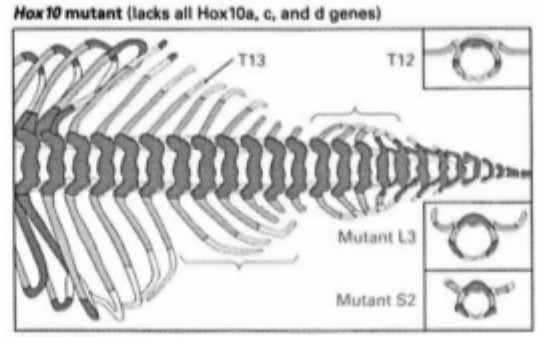


شکل ۲۶-۲۲

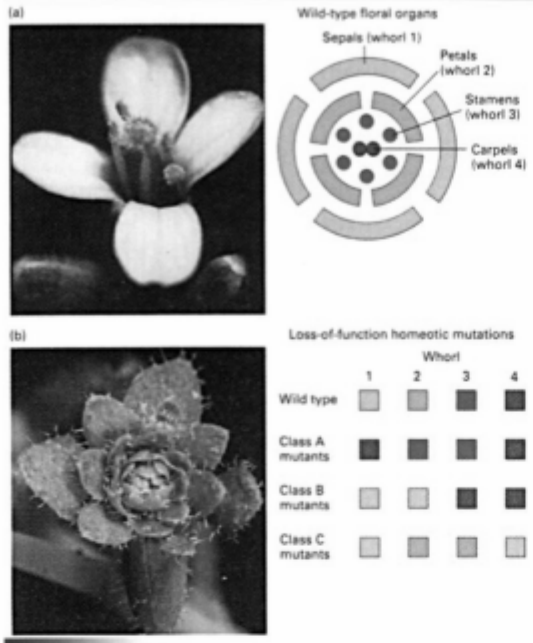




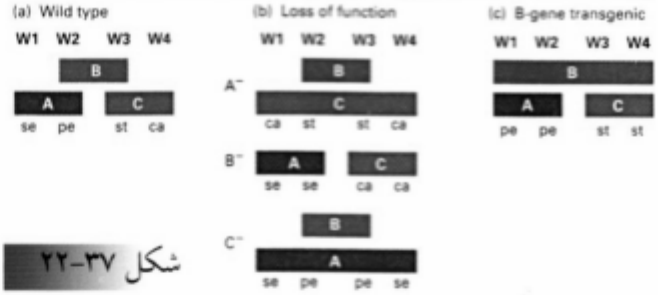
شکل ۳۲-۲۲



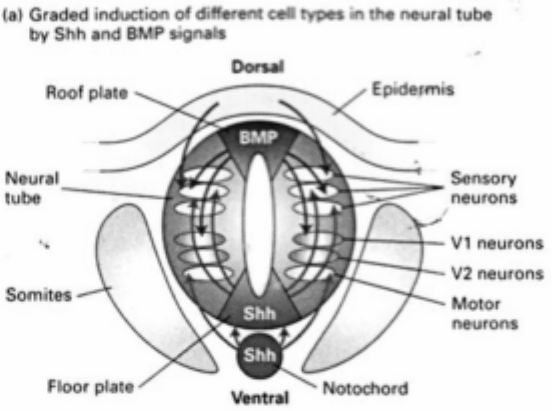
شکل ۳۵-۲۲

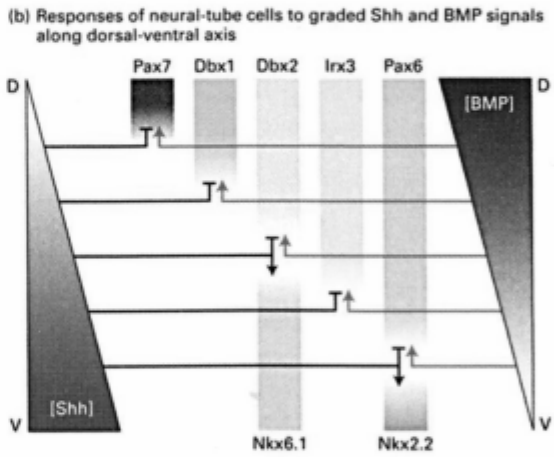


شکل ۲۲-۳۶

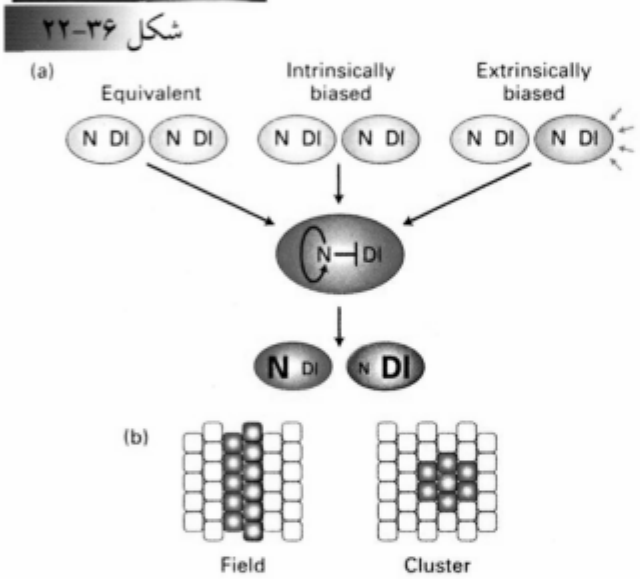


شکل ۲۲-۳۷

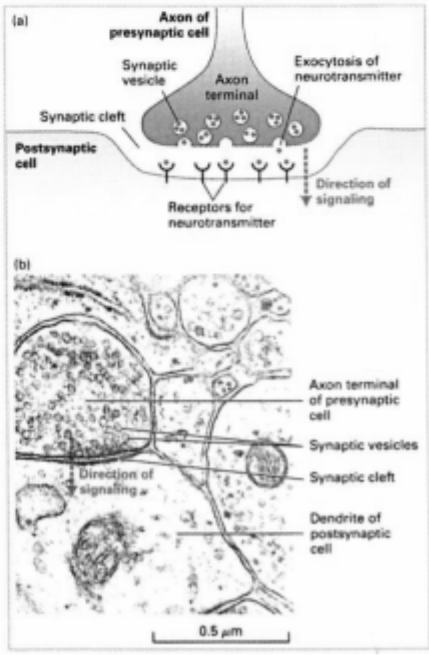




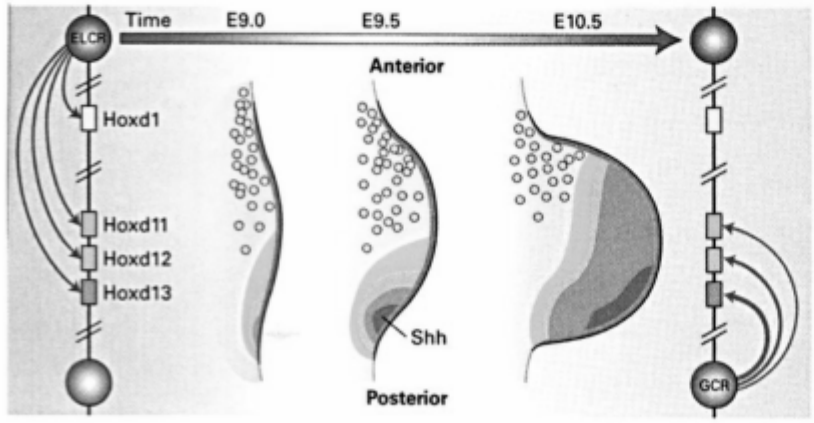
شکل ۲۲-۴۰



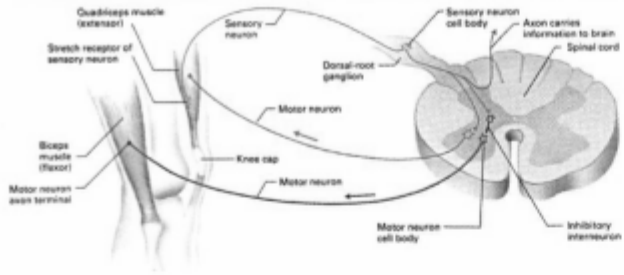
شکل ۲۲-۴۱



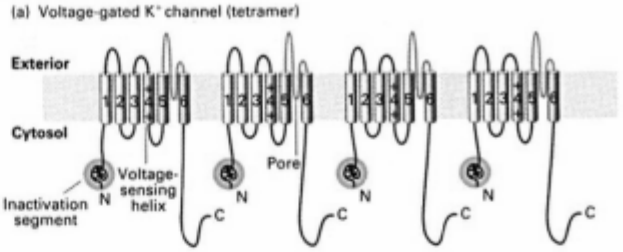
شکل ۲۳-۴

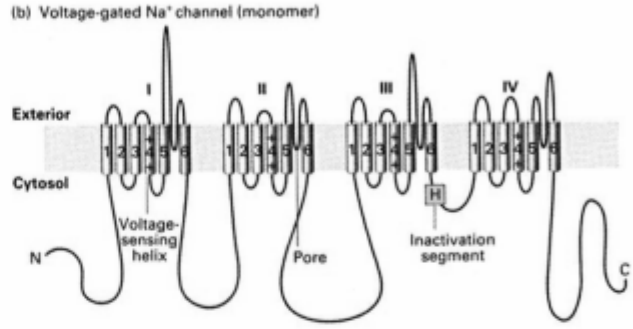


شکل ۲۲-۴۸

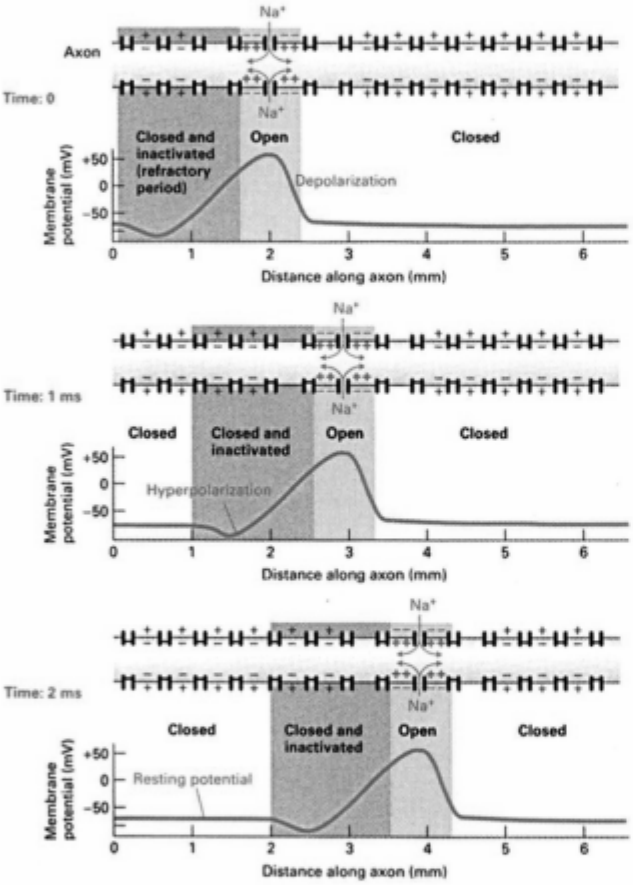


شکل ۵-۲۳

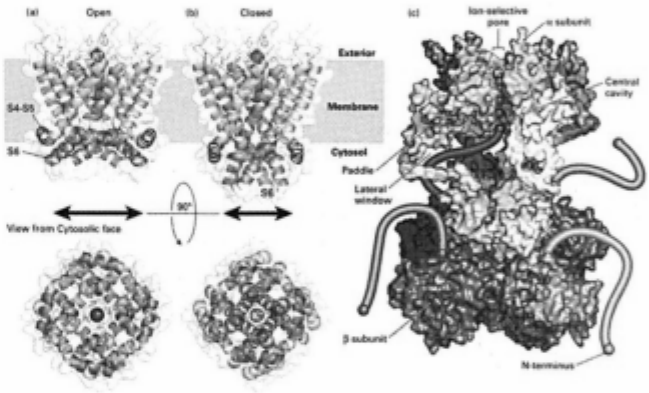




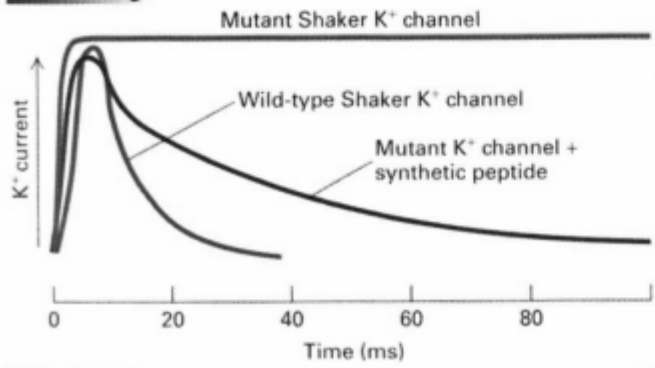
شکل ۱۰-۲۳



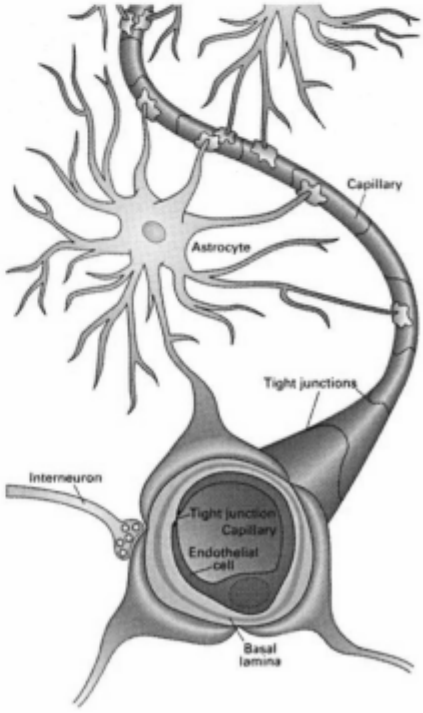
شکل ۹-۲۳



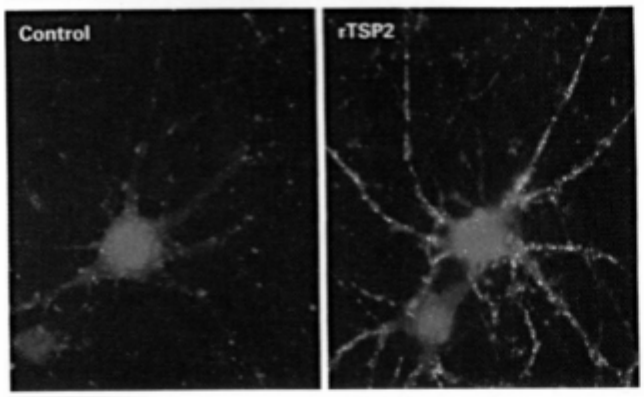
شکل ۱۱-۲۳



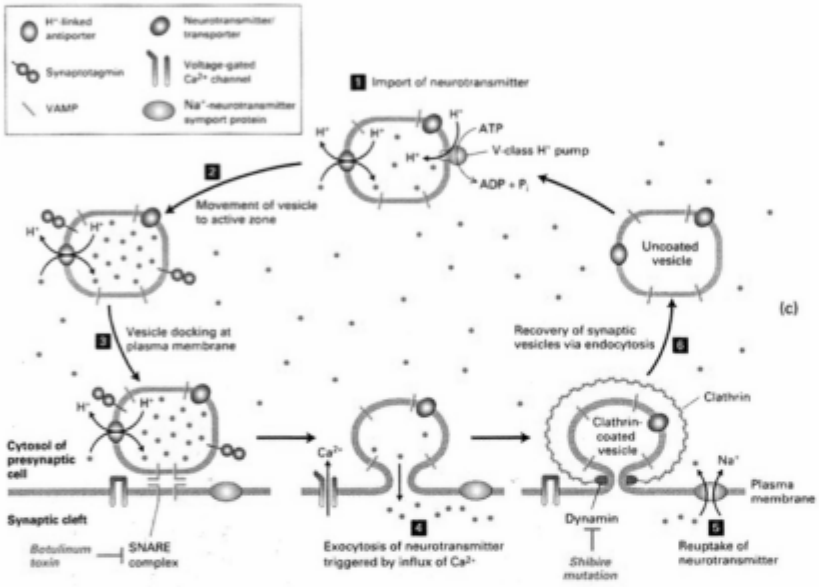
شکل ۱۲-۲۳



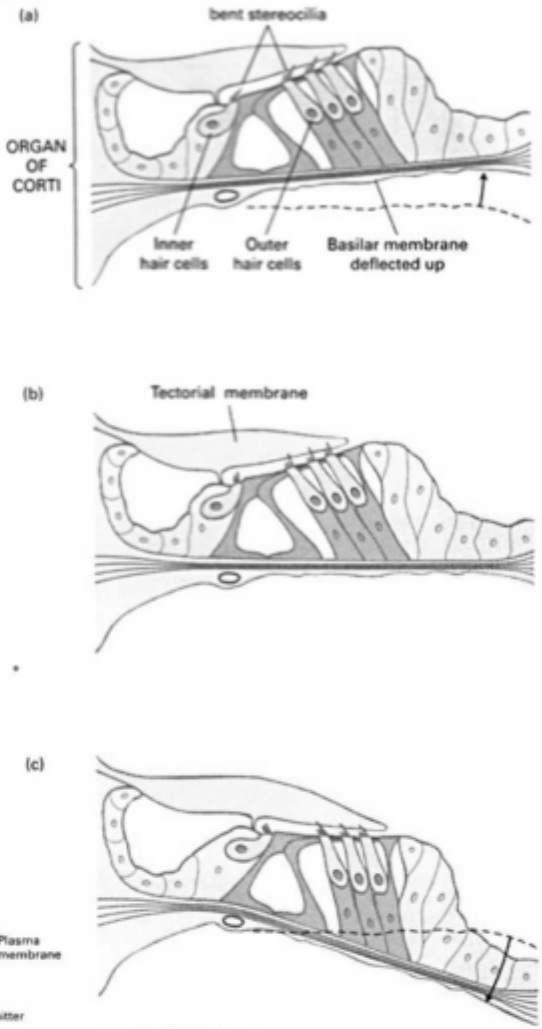
شکل ۱۶-۲۳



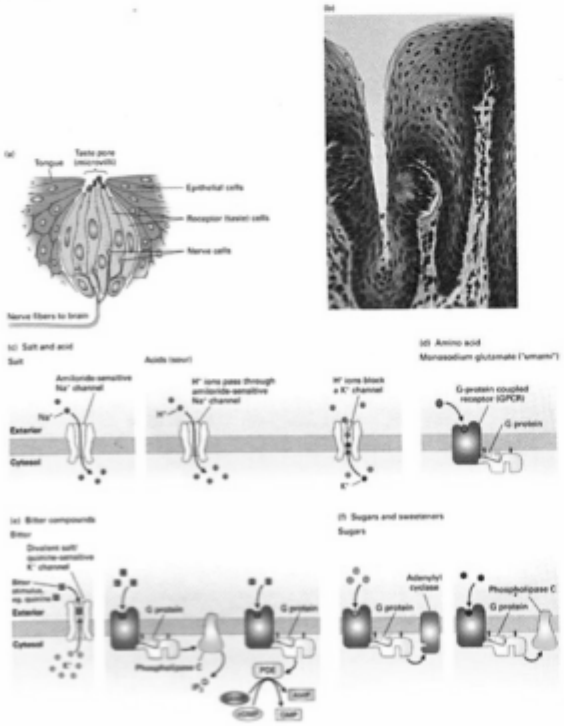
شکل ۲۳-۱۷



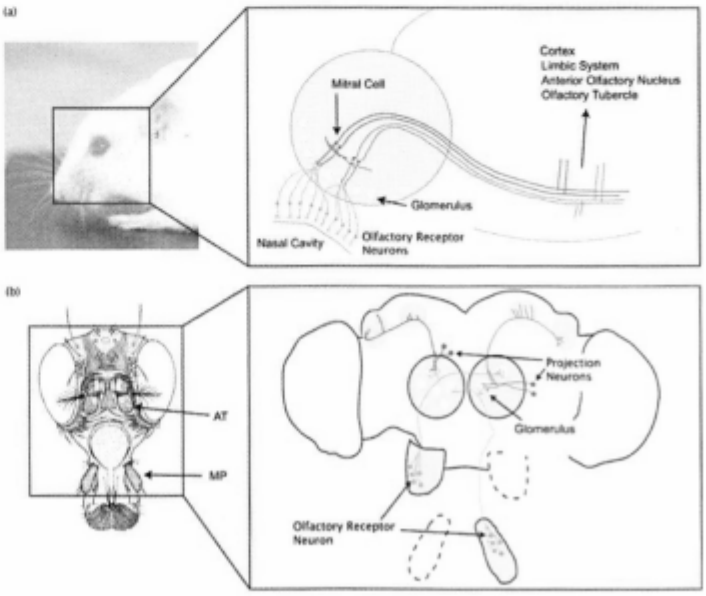
شکل ۲۳-۲۰



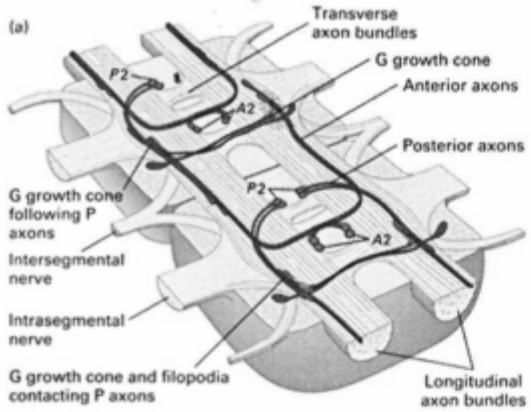
شکل ۲۳-۳۱

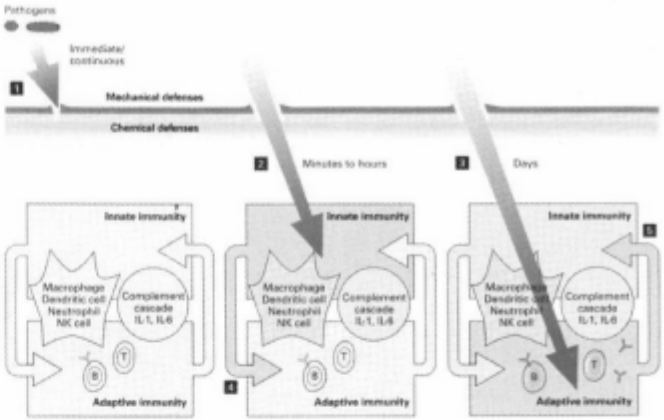


شکل ۲۳-۳۲

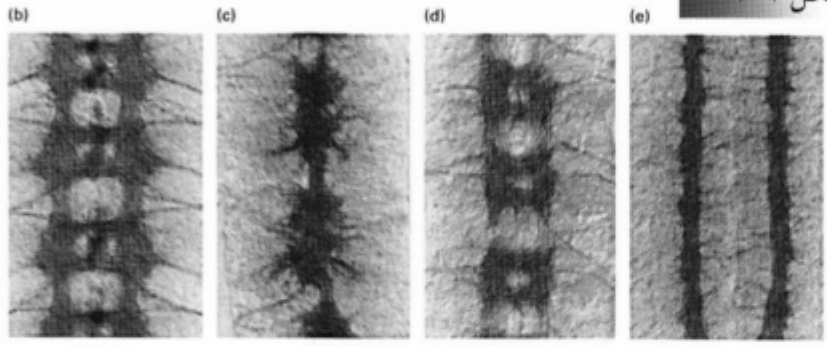


شکل ۲۳-۳۵

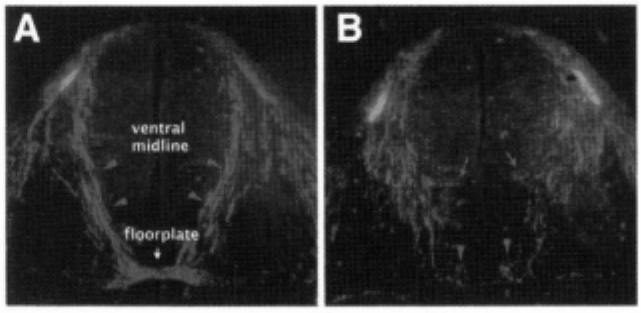




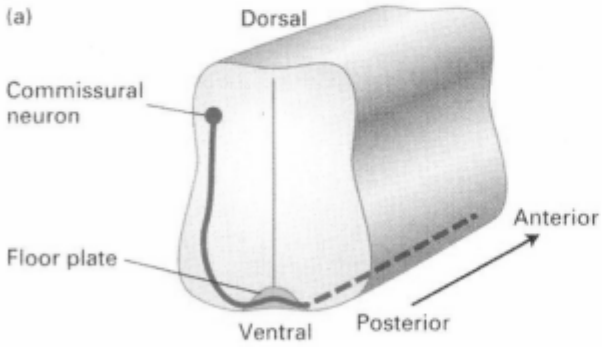
شکل ۱-۲۴

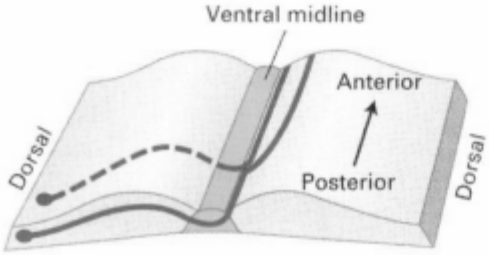


شکل ۴۶-۲۳

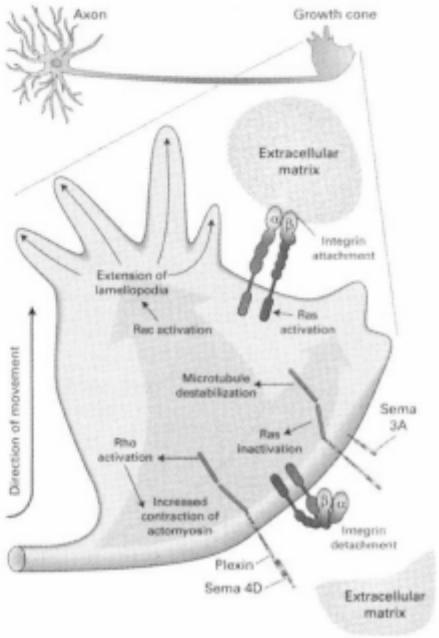


شکل ۴۵-۲۳

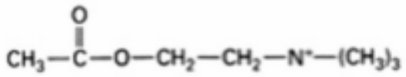




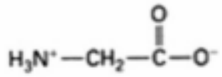
شکل ۴۸-۲۳



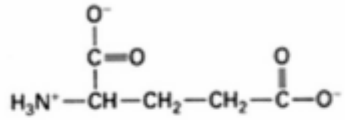
شکل ۴۹-۲۳



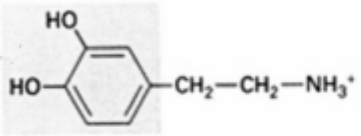
Acetylcholine



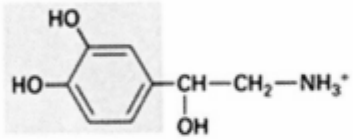
Glycine



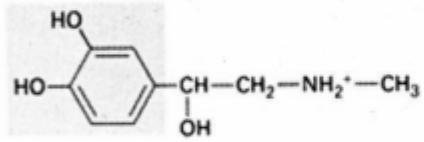
Glutamate



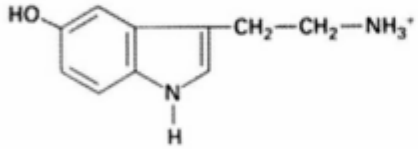
Dopamine
(derived from tyrosine)



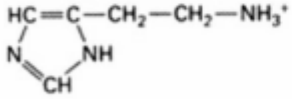
Norepinephrine
(derived from tyrosine)



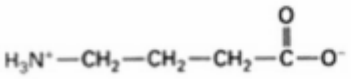
Epinephrine
(derived from tyrosine)



Serotonin, or **5-hydroxytryptamine**
(derived from tryptophan)

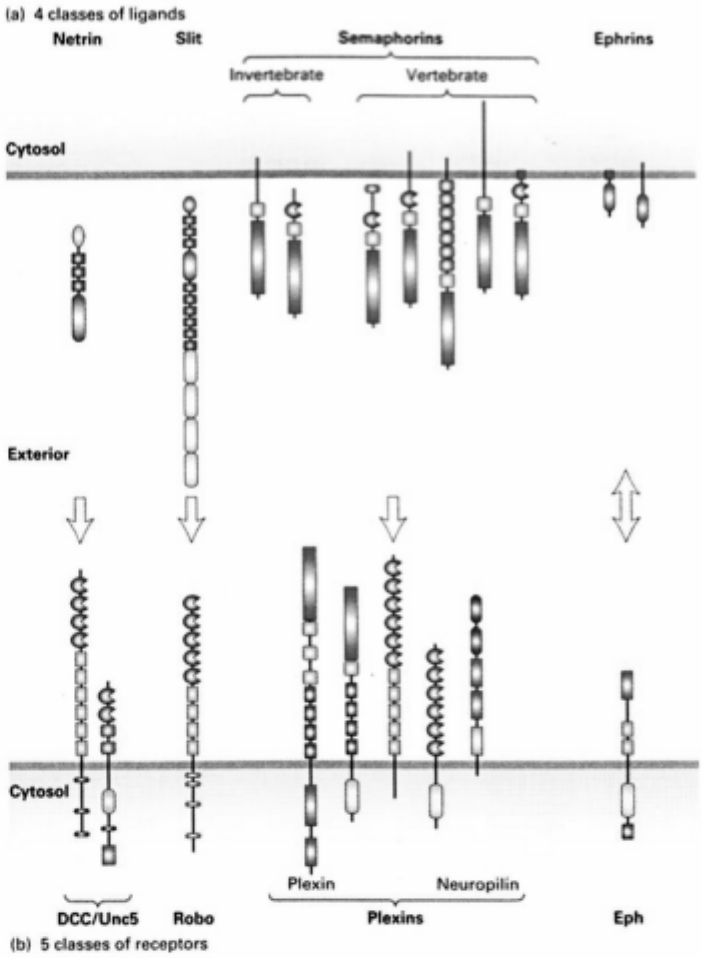


Histamine
(derived from histidine)

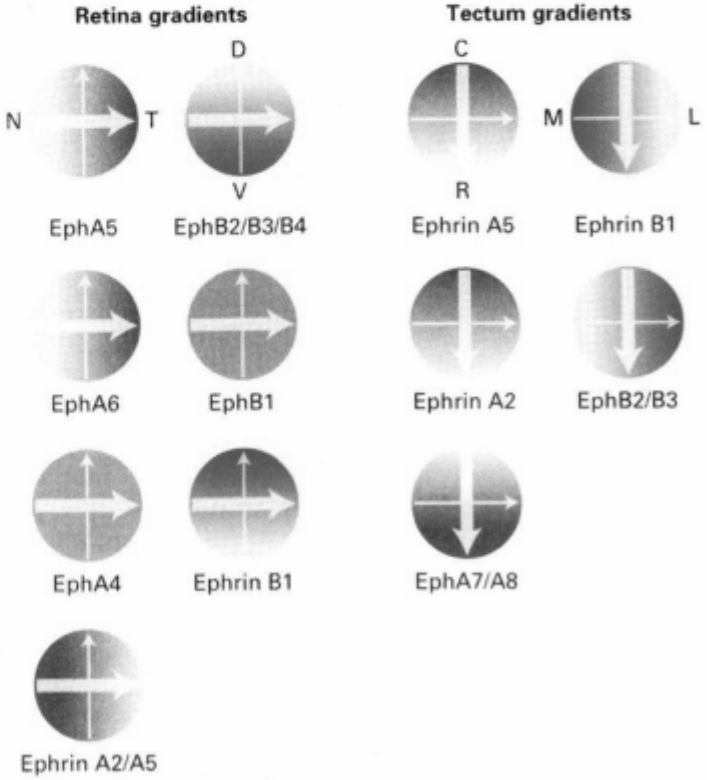


γ-**Aminobutyric acid**, or **GABA**
(derived from glutamate)

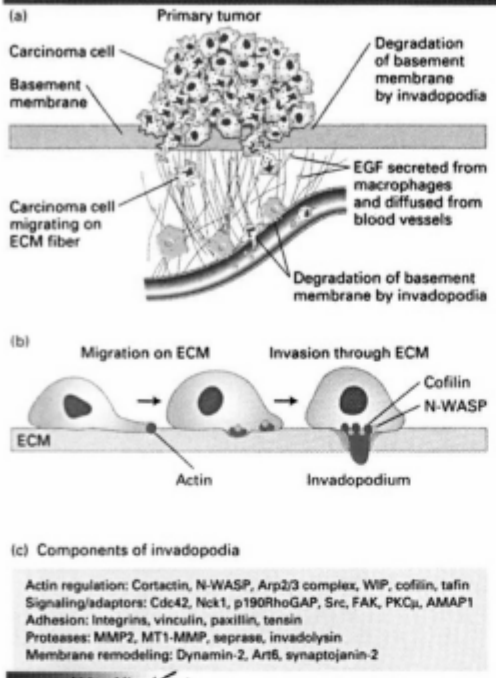
شکل ۱۹-۲۳



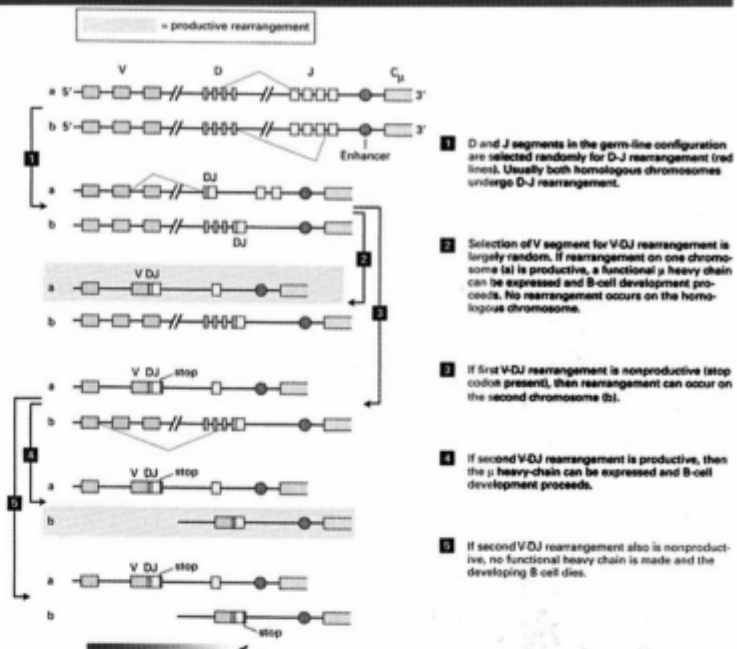
شکل ۴۲-۲۳



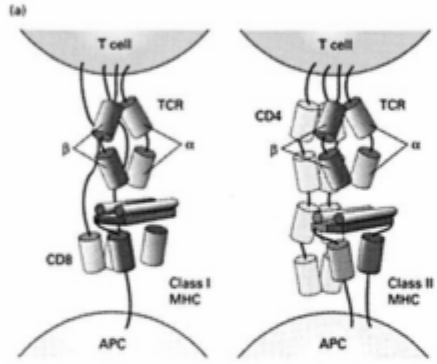
شکل ۴۳-۲۳

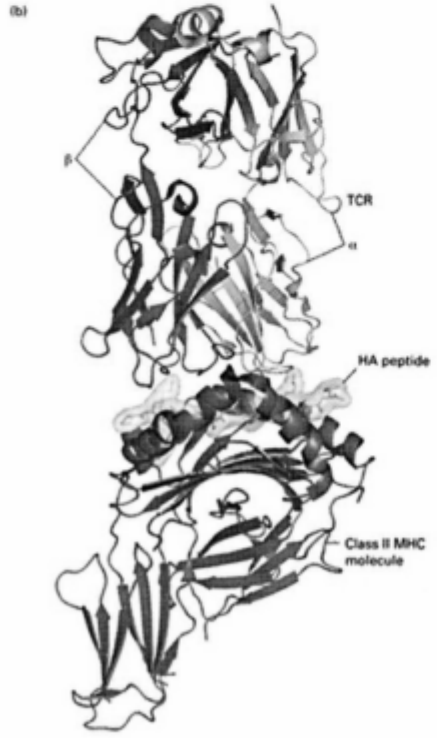


شکل ۳-۲۵

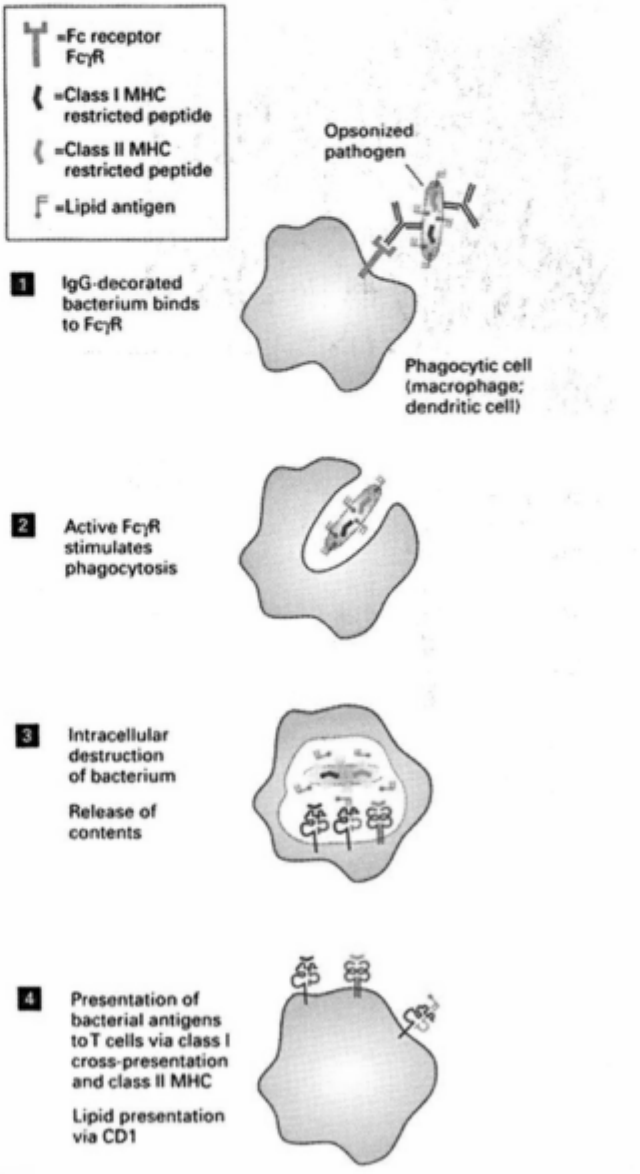


شکل ۱۶-۲۵

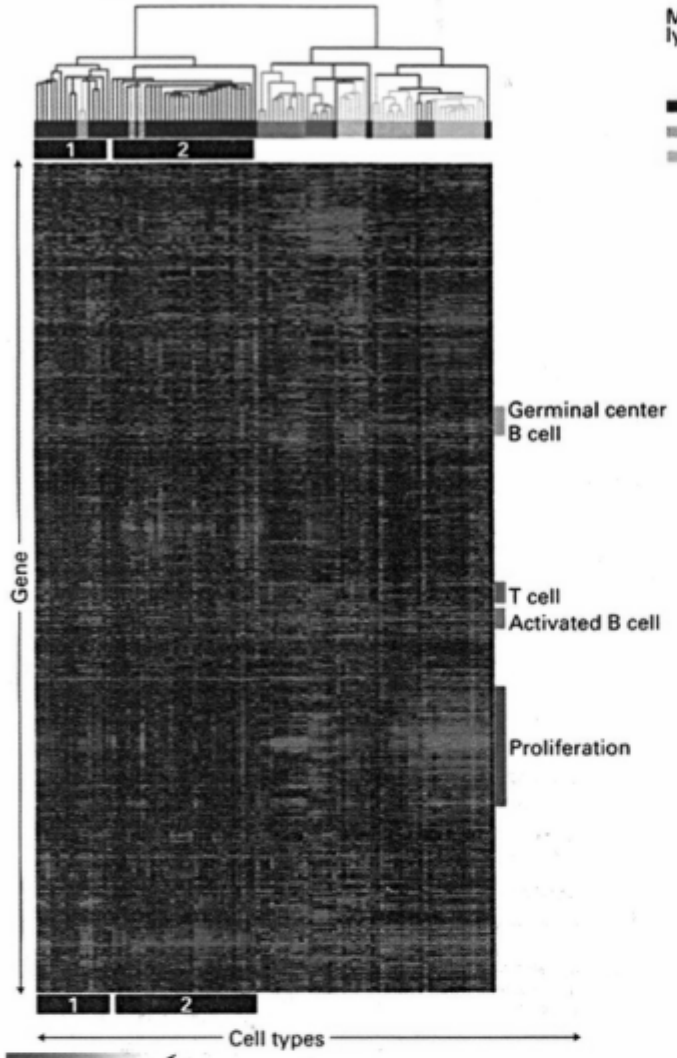




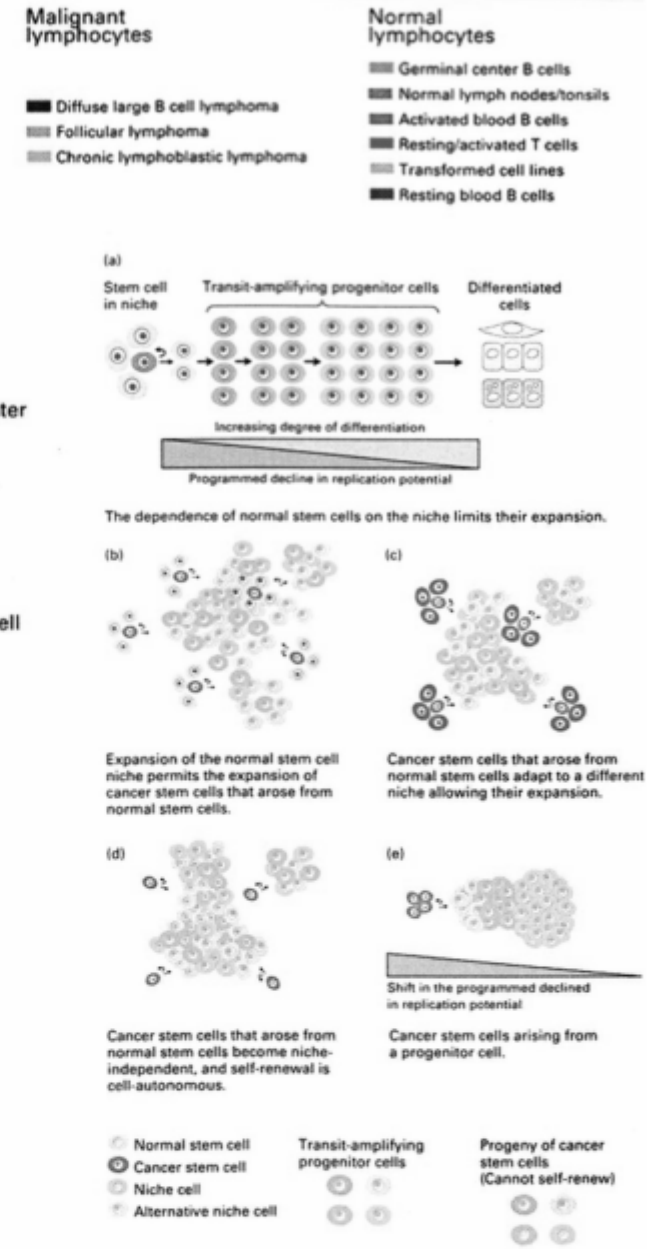
شکل ۲۹-۲۵



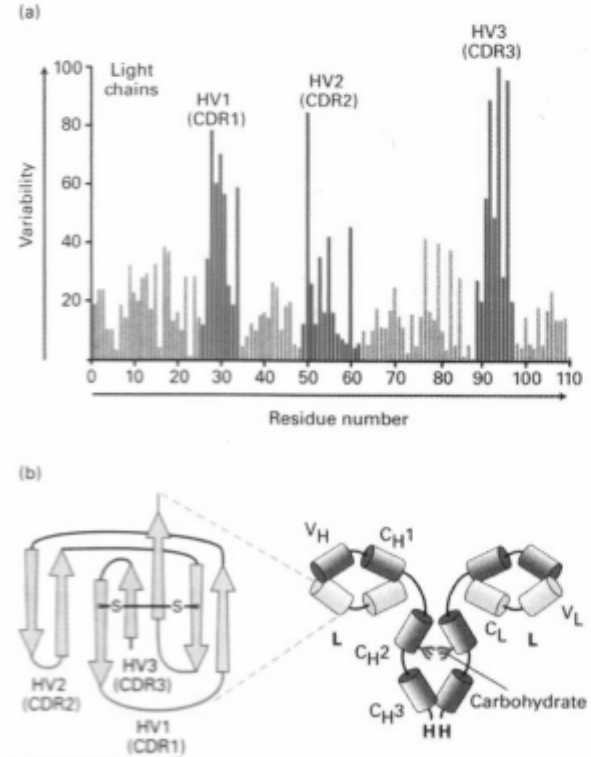
شکل ۲۷-۲۵



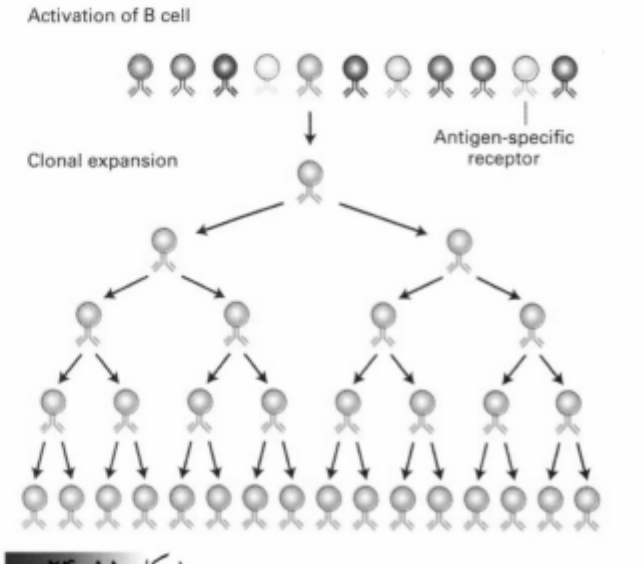
شکل ۱۰-۲۵



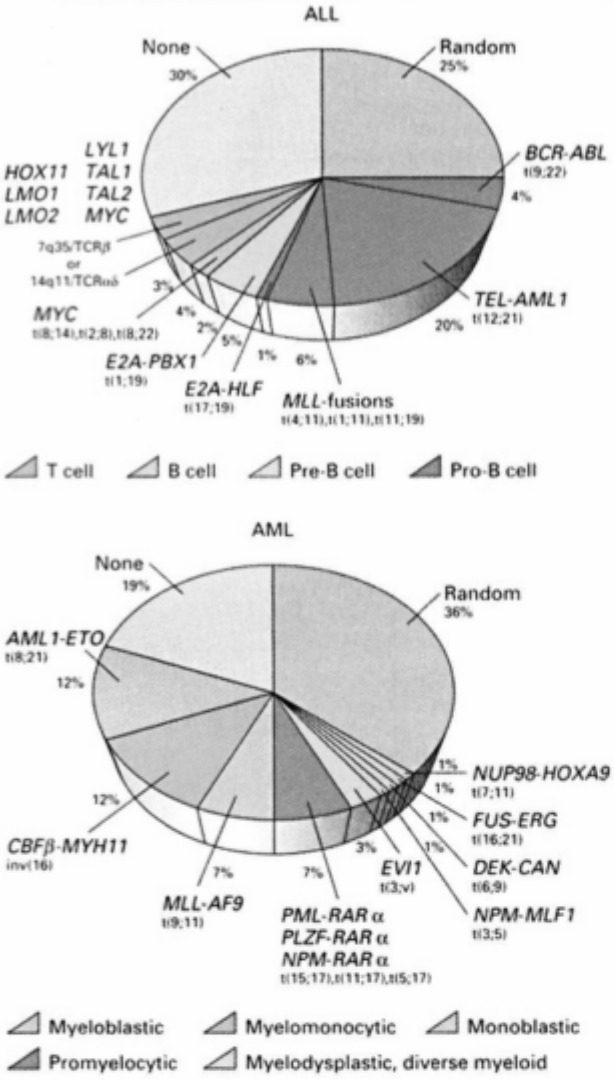
شکل ۴-۲۵



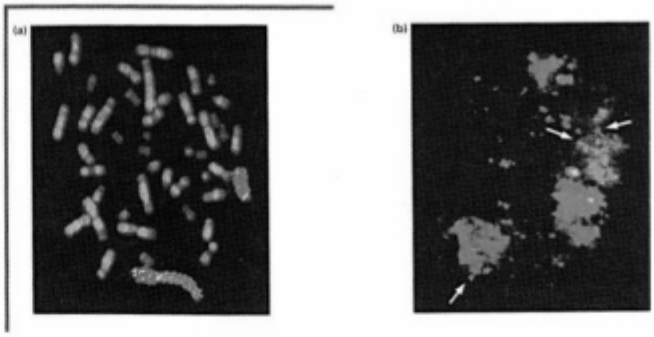
شکل ۱۲-۲۴



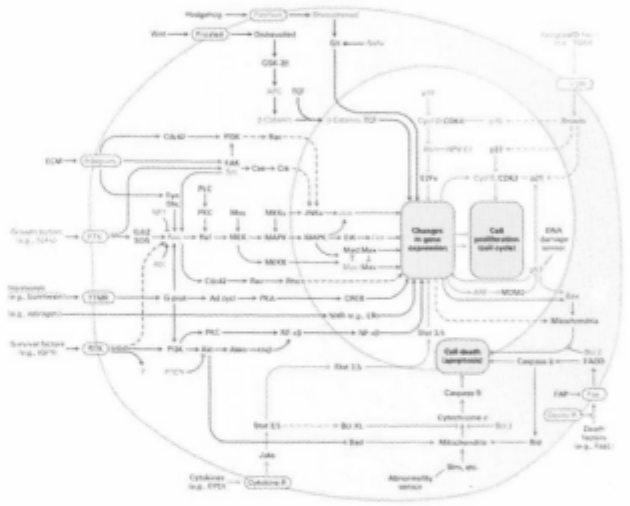
شکل ۱۱-۲۴



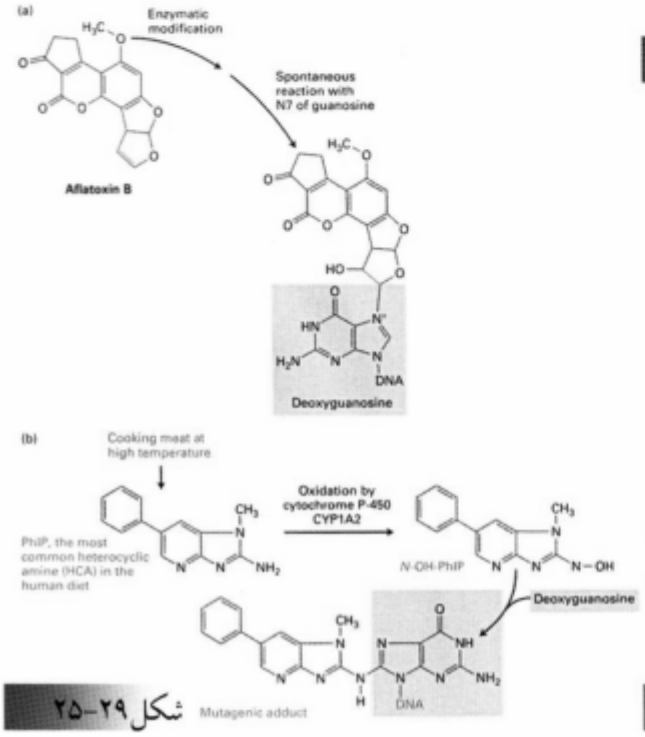
شکل ۲۱-۲۵



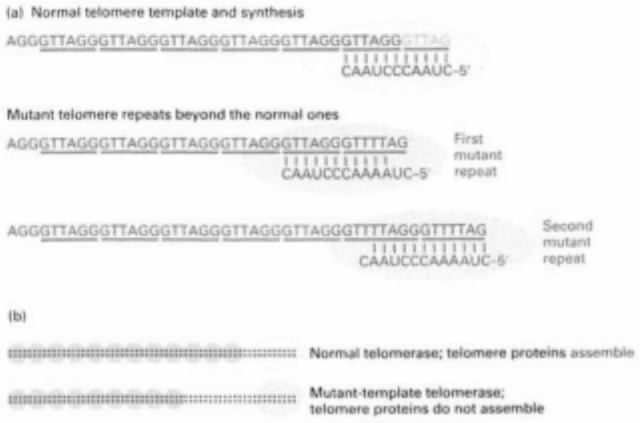
شکل ۱۲-۲۵



شکل ۱۵-۲۵



شکل ۲۹-۲۵



شکل ۳۲-۲۵

واژه‌نامه

A

خانواده ATPاز AAA **AAA ATPase Family**

گروهی از پروتئین‌هایی که هیدرولیز ATP را با حرکت مولکول‌های بزرگ و معمولاً همراه با سوبستراهای پروتئینی تانخورده یا خرد شدن کمپلکس‌های پروتئینی چند زیر واحدی جفت می‌کنند.

ابرخانواده ABC **ABC superfamily**

گروه بزرگی از پروتئین‌های اینتگرال غشایی بوده و اغلب به عنوان پروتئین‌های انتقالی غشایی، با کمک انرژی ATP باعث حرکت مولکول‌های مختلف (مثل فسفولیپیدها، کلسترول، قندها، پپتیدها) از عرض غشاء سلولی می‌شوند (شکل ۱۴ـ۱۱).

استیل کولین **Acetylcholine (Ach)**

استیل‌کولین یک میانجی عصبی در مهره‌داران است که در اتصالات عصبی ـ ماهیچه‌ای و سیناپس‌های عصب ـ عصب در مغز و سیستم عصبی محیطی عمل می‌کند (شکل ۱۹ـ۲۳).

استیل کوآنزیم A **Acetyl CoA**

مولکول کوچک و محلول در آب بوده و شامل یک گروه استیل متصل به کوآنزیم A می‌باشد. گروه استیل در چرخهٔ اسیدسیتریک به سیترات منتقل شده و همچنین به عنوان منبع کربن در سنتز اسیدهای چرب، استروئیدها و مولکول‌های دیگر عمل می‌کند. (شکل ۱۲ـ۹)

اسید **Acid**

جزیی که دهنده پروتون (H^+) می‌باشد. گروه‌های کربوکسیل و فسفات اولین گروه‌های اسیدی در مولکول‌های زیستی می‌باشند.

اکتین **Actin**

پروتئین‌های ساختاری فراوان در سلول‌های یوکاریوت که با دیگر پروتئین‌ها میانکنش می‌دهد. شکل مونومری گلبولار (اکتین G) برای تشکیل فیلامنت‌های اکتین پلیمریزه می‌شوند. در سلول‌های ماهیچه‌ای، اکتین F در طول انقباض با میوزین میانکنش می‌دهد. به میکروفیلامنت‌ها نیز مراجعه شود (شکل ۱۷ـ۵).

پتانسیل عمل **Action potential**

پیام‌های الکتریکی سریع و گذرا که تمام یا قسمتی از آنها در سلول‌های تحریک‌پذیر منتشر شده (مثل نورون‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای) و منجر به باز و بسته شدن انتخابی کانال‌های دریچه‌دار سدیم (Na^+) و پتاسیم (K^+) می‌شوند.

انرژی فعال‌سازی **Activation energy**

مقدار انرژی که برای آغاز واکنش‌های شیمیایی مورد نیاز است. یک آنزیم به وسیلهٔ کاهش انرژی فعال‌سازی سرعت واکنش را افزایش می‌دهد.

فعال‌کننده **Activator**

یک فاکتور رونویسی ویژه که رونویسی را تحریک می‌کند.

جایگاه فعال **Activesite**

ناحیه ویژه‌ای در آنزیم که به مولکول سوبسترا متصل شده و تغییرات شیمیایی را در مولکول سوبسترای متصل شده ایجاد می‌کند. (شکل ۲۱ـ۳)

انتقال فعال **Active transport**

حرکت یک یون یا مولکول کوچک به وسیلهٔ پروتئین از غشاء برخلاف شیب غلظت یا شیب الکتروشیمیایی بوده و با هیدرولیز ATP جفت می‌شود.

آدنوزین تری‌فسفات **Adenosine triphosphat (ATP)**

به ATP مراجعه کنید.

آدنیلیل سیکلاز **Adenyhyl cyclase**

یکی از آنزیم‌هایی که با اتصال لیگاندهای خاص به گیرنده‌های سطح سلولی‌شان فعال شده و باعث تشکیل AMP حلقوی (cAMP) از ATP می‌شود. این آنزیم را آدنیلات سیکلاز نیز می‌نامند (شکل‌های ۲۱ـ۱۵ و ۲۲ـ۱۵).

گیرندهٔ اتصالی **Adhesion receptor**

پروتئینی در غشاء پلاسمایی سلول‌های جانوری که به ترکیبات ماتریکسی خارج سلولی متصل شده و بنابراین باعث چسبیدن سلول به ماتریکس می‌شود. اینتگرین‌ها از اجزاء اصلی گیرنده‌های اتصالی می‌باشند (شکل ۱ـ۱۹ و ۵ـ۴).

هوازی **Aerobic**

در ارتباط با یک سلول: ارگانیسم یا فرآیند متابولیکی که از گاز

اکسیژن (O_2) استفاده می‌کنند یا می‌توانند در حضور O_2 رشد کند.

اکسیداسیون هوازی **Aerobic oxidation**

متابولیسم نیازمند به اکسیژن که در آن قندها و اسیدهای چرب به CO_2 و H_2O تبدیل می‌شوند. این واکنش با سنتز ATP جفت می‌گردد.

آگونیست **Agonist**

مولکولی که اغلب سنتزی بوده و از فعالیت زیستی مولکول‌های طبیعی تقلید می‌کند.

آلل **Allele**

یکی از دو یا چند فرم متفاوت یک ژن. سلول‌های دیپلوئید شامل دو آلل از هر ژن می‌باشند که در جایگاه مربوطه (لوکوس) در یک جفت کروموزوم همولوگ قرار دارند.

آلوستریک **Allosteric**

در ارتباط با پروتئین‌ها و فرایندهای سلولی که به وسیلهٔ الوستری تنظیم می‌شوند.

آلوستری **Allostery**

تغییر در ساختار سوم و یا چهارم پروتئین که به وسیلهٔ اتصال مولکول‌های کوچک به جایگاه تنظیمی آن پروتئین انجام شده و موجب تغییراتی در فعالیت پروتئین می‌گردد.

اتم کربن آلفا ($C\alpha$) **Alpha (α) carbon atom ($C\alpha$)**

در اسیدهای آمینه، اتم کربن مرکزی به چهار گروه مختلف شیمیایی (به جزء در گلیسین) که شامل زنجیرهٔ جانبی یا گروه **R** هستند، متصل می‌شود (شکل ۴ـ۲).

مارپیچ آلفا **Alpha (α) helix**

ساختار ثانویه معمول پروتئین که در آن توالی خطی اسیدهای آمینه به صورت راست گرد پیچ خورده و به وسیلهٔ پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل و آمید در اسکلت پلی‌پپتیدی پایدار می‌شود.

پیرایش متناوب **Alternative splicing**

فرآیندی که در آن اگزون‌های یک mRNA اولیه در ترکیب‌های مختلف کنار هم قرار گرفته و باعث تشکیل دو یا چندین mRNA از یک RNA اولیه می‌شود (شکل ۱۹ـ۴).

اسید آمینه **Aminoacid**

ترکیب آلی که حداقل یک گروه آمینو و یک گروه کربوکسیل دارد. در اسیدهای آمینه که سازندهٔ مونومرهای پروتئینی یک گروه آمین و یک گروه کربوکسیل از طریق یک اتم کربن مرکزی (کربن α) به هم متصل می‌شوند. کربن α به زنجیره‌های جانبی متفاوت اتصال می‌یابد (شکل‌های ۴ـ۲ و ۱۴ـ۲).

آمینو آسیل tRNA **Aminoacyl tRNA**

شکل فعال یک اسیدآمینه بوده و در سنتز پروتئین استفاده می‌شود، حاوی یک اسیدآمینه است که از طریق پیوند استری پرانرژی به گروه هیدروکسیل ′۳ مولکول tRNA متصل می‌شود.

آمفی‌پاتیک **Amphipatic**

در ارتباط با مولکول‌ها یا ساختارهایی که دارای یک قسمت آب دوست و یک قسمت آب گریز می‌باشند.

بی‌هوازی **Anaerobic**

در ارتباط با سلول، ارگانیسم یا فرایند متابولیکی که در غیاب حضور گاز اکسیژن (O_2) عمل می‌کند.

آنافاز **Anaphase**

مرحله‌ای در تقسیم میتوز که کروماتیدهای خواهری (یا همولوگ‌های جفت شده در میوز I) جدا شده و به سمت قطب‌های دوک حرکت می‌کنند.

اتصالات قلاب‌کننده **Anchoring junction**

مناطق ویژه روی سطح سلول که مولکول‌های چسبندهٔ سلولی یا گیرنده‌های چسبنده؛ شامل اتصالات چسبنده و دسموزوم‌ها و همی‌دسموزوم‌ها است. اتصالات چسبنده و دسموزم‌ها چسبندگی سلول به سلول و اتصالات همی‌دسموزم‌ها چسبندگی سلول به ماتریکس را ایجاد می‌کنند (شکل‌های ۱۴ـ۱۹ و ۱۲ـ۱۹).

آناپلوئیدی **Aneuploiedy**

هر ناهنجاری در کروموزوم‌های دیپلوئید طبیعی که در آن یک نسخه اضافی از یک یا چند کروموزوم وجود داشته و یا یک نسخه طبیعی از کروموزوم وجود ندارد.

آنیون **Anion**

یک یون با بار منفی.

آنتاگونیست **Antagonist**

مولکولی اغلب سنتزی که فعالیت زیستی مولکول‌های طبیعی (مثل هورمون‌ها) را متوقف می‌کند.

آنتی‌بادی **Antibody**

پروتئینی (ایمونوگلوبولین) که به طور طبیعی در پاسخ به آنتی‌ژن تولید شده و با جایگاه ویژه آنتی‌ژن (اپی‌توپ) واکنش نشان داده و خارج شدن آنتی‌ژن را از بدن تسهیل می‌کند.

آنتی‌کدون **Anticodon**

توالی سه نوکلئوتیدی در یک tRNA که مکمل کدون در mRNA می‌باشد. طی سنتز پروتئین، جفت شدن بازها بین کدون و آنتی‌کدون منجر به اتصال tRNA حامل اسید آمینه به ریبوزوم شده و اسید آمینه خود را به زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی در حال اضافه می‌نماید (شکل

۲۰-۴).

آنتی‌ژن **Antigen**

هر ماده‌ای (معمولاً بیگانه) که سیستم ایمنی را تحریک می‌کند. در سلول‌های B، آنتی‌ژن تشکیل آنتی‌بادی را تحریک می‌کند. این آنتی‌بادی به طور اختصاصی به آنتی‌ژن مربوطه متصل می‌شود. در سلول‌های T، یک آنتی‌ژن پاسخ التهابی را تحریک می‌کند. این پاسخ التهابی به دنبال تولید سیتوکین یا عملکرد فعالیت سیتوتوکسین ایجاد می‌شود.

سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن

Antigen presenting cell(APC)

هر سلولی می‌تواند آنتی‌ژن را به قطعات کوچک هضم کرده و پپتیدهای حاصله را در ترکیب با مولکول‌های MHCII در سطح سلول نشان دهد. این پپتیدها به وسیلهٔ سلول‌های T تشخیص داده می‌شوند. APC های اصلی (سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها و سلول‌های B) MHCII را در سطح خود بیان می‌کنند.

انتقال ناهمسو **Antiport**

نوعی انتقال مزدوج (کوترنسپورت) که در آن یک پروتئین غشایی (آنتی‌پورتر) دو مولکول یا یون‌های مختلف را از غشای سلول در خلاف جهت هم عبور می‌دهد. همچنین به انتقال هم راستا مراجعه شود. (شکل ۳-۱۱، [3C])

رأسی **Apical**

به قسمت بالای سلول، ارگان، یا ساختار بدنی دیگر اطلاق می‌شود. سلول‌های اپی‌تلیال سطح رأسی فضای خارجی بدن یا فضای باز داخلی را نشان می‌دهند (مانند لومن روده‌ای، مجرا). (شکل ۱۹-۸).

آپوپتوز **Apaptosis**

فرآیند تنظیم شده به وسیله ژنتیک بوده و در بافت‌های ویژه در طول تمایز و بیماری رخ داده و سلول خود را از بین می‌برد. این عمل به وسیلهٔ شکستن اجزاء سلولی و یک سری تغییرات مورفولوژیکی در دیوارهٔ سلولی مشخص می‌شود. همچنین به آن مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلولی نیز گفته می‌شود. به کاسپازها مراجعه شود (شکل‌های ۱۹-۱، ۳۳-۲۱ و ۴۱a-۲۱).

آپوپتوزوم **Apoptosome**

هپتامر دیسک مانند و بزرگ در Apaf-1 پستانداران. Apaf-1 پروتئینی است که در پاسخ به سیگنال‌های آپوپتوز تجمع یافته و به عنوان یک مائسین فعالسازی برای کاسپازهای آغاز و اثرگذار عمل می‌کند.

آکواپورین‌ها **Aquaporins**

خانواده‌ای از پروتئین‌های انتقال‌دهندهٔ غشایی که اجازهٔ عبور آب و مولکول بدون بار کوچک مثل گلیسرول را از غشاء پلاسمایی می‌دهند (شکل ۸-۱۱).

آرکئا **Archea**

گروهی از پروکاریوت‌ها که یکی از سه سلسله متمایز تکاملی ارگانیسم‌های امروزی را تشکیل می‌دهند. همچنین آنها را ارکئوباکتریها و آرکئان نیز می‌نامند. از بعضی جهات، آرکئاها به یوکاریوت‌ها شبیه‌تر از باکتری‌ها (باکتری‌های واقعی) می‌باشند. (شکل ۳-۱)

ثابت اتصال **Associated constant (Ka)**

به ثابت تعادل مراجعه شود.

آستر **Aster**

ساختاری متشکل از ریزلوله‌ها (فیبرهای آستری) که در طی میتوز از سانتروزوم به سمت خارج، خارج می‌شوند (شکل ۳۴-۱۸).

اتم کربن نامتقارن **Asymmetric carbon atom**

یک اتم کربن که به چهار گروه مختلف اتمی یا شیمیایی متصل می‌شود. همچنین به آن اتم کربن کایرال نیز گفته می‌شود. آرایش پیوندها به دو صورت مختلف می‌تواند باشد. در نتیجه دو نوع ایزومر فضایی که تصویر آینه‌ای یکدیگرند تولید می‌شود (شکل ۴-۲).

تقسیم سلولی نامتقارن **Asymmetric cell divition**

هر تقسیم سلولی که در آن دو سلول دختری ژن‌های یکسانی دریافت می‌کنند اما اجزاء مختلف (مثل mRNAs و پروتئین‌ها) را از سلول مادری به ارث می‌برند (شکل‌های ۲۴-۲۱ و ۲۸-۲۱).

ATP (adenosine 5′- triphosphate

آدنوزین ′۵ تری فسفات

نوکلئوتیدی مهم برای به دام انداختن و انتقال انرژی آزاد در سلول‌ها می‌باشد. هیدرولیز هر دو پیوند فسفوانیدرید در ATP مقدار زیادی انرژی آزاد می‌کند. این انرژی برای انجام فرآیندهای سلولی مورد نیاز می‌باشد (شکل ۳۱-۲).

ATP آز **ATPase**

گروه بزرگی از آنزیم‌های کاتالیزکننده هیدرولیز ATP که محصول آن ADP، فسفات معدنی و رها شدن انرژی آزاد است. به K^+ و $ATPaseN\alpha^+$ و پمپ ATP مراجعه شود.

پمپ با انرژی ATP **ATP- powered pump**

هر پروتئین انتقال غشایی که فعالیت ATP آز دارد و هیدرولیز ATP را با انتقال فعال یون‌ها یا مولکول‌های کوچک از عرض غشاء پلاسمایی برخلاف شیب الکتروشیمیای جفت کرده و به طور ساده پمپ نامیده می‌شود. (شکل ۹-۱۱)

ATP سنتاز **ATP synthase**

کمپلکس پروتئین چند زیر واحدی که به قسمت داخلی غشاء میتوکندری، غشاء تیلاکوئیدی در کلروپلاست و غشاء پلاسمایی باکتریایی متصل شده و سنتز ATP را در طول فسفریلاسیون اکسیداتیو و فتوسنتز تسریع می‌کند، و کمپلکس F_0F_1 نیز نامیده می‌شود. (شکل ۲۴ـ۱۲)

اتوکرین **Autocrine**

در ارتباط با مکانیسم سیگنال‌دهی که در آن سلول، مولکول‌های سیگنالی را تولید کرده (مثل فاکتور رشد) و سپس به آن متصل شده و پاسخ می‌دهد.

اتوکاردیوگرافی **Autoradiogrophy**

روشی برای نمایان کردن مولکول‌های رادیواکتیو موجود در یک نمونه (مثل قسمتی از بافت یا ژل الکتروفورز) به وسیلهٔ قراردادن یک فیلم عکاسی (امولوسیون) یا آشکارساز دوبعدی الکترونیکی در معرض نمونه، فیلمی که در معرض نمونه قرار می‌گیرد اتورادیوگرام نامیده می‌شود.

اتوزوم **Autosome**

تمام کروموزوم‌ها به غیر از کروموزوم‌های جنسی.

اکسون **Axon**

زائده‌ای بلند در سلول‌های عصبی که قادر به هدایت پیام‌های عصبی (پتانسیل عمل) تولید شده در جسم سلولی به سمت انتهای دور و شاخه‌دار می‌باشد (انتهای اکسون) (شکل ۲ـ۲۳).

انتقال اکسونی **Axonal transport**

پروتئین حرکتی که انتقال اندامک‌ها و وزیکول‌ها را در طول میکروتوبول‌ها در اکسون سلول‌های عصبی انجام می‌دهد. انتقال رو به جلو از جسم سلولی به سمت پایانهٔ اکسونی رخ می‌دهد، انتقال رو به عقب از پایانهٔ اکسونی به سمت جسم سلولی اتفاق می‌افتد (شکل ۱۷ـ۱۸ و ۱۸ـ۱۸).

اکسونم **Axoneme**

دسته‌ای از میکروتوبول‌ها و پروتئین‌های ضمیمه که در تاژک و مژک وجود داشته و مسؤول ساختار و حرکت آنها می‌باشند. (شکل ۲۹ـ۱۸)

B

باکتری **Bacteria**

دسته‌ای از پروکاریوت‌ها که یکی از سه سلسله متمایز ارگانیسم‌های امروزی را تشکیل داده و باکتری‌های واقعی (یوباکتریها) نیز نامیده می‌شوند و به طور فیلوژنتیکی از آرکئاها و یوکاریوت‌ها متمایز می‌شوند. (شکل ۳ـ۱)

باکتریوفاژ (فاژ) **Bacteriophage (phage)**

ویروسی که سلول‌های باکتری را آلوده می‌کند. بعضی از فاژها به طور گسترده به عنوان وکتور در کلونینگ DNA استفاده می‌شوند.

پایه **Basal**

به بازولاترال مراجعه شود.

جسم پایه‌ای **Basal body**

ساختاری در قاعدهٔ مژک و تاژک که ریزلوله‌ها در آن محل به عنوان پایگاهی برای رشد اکسونم شکل می‌گیرند. از لحاظ ساختار شبیه سانتریول می‌باشد (شکل ۲۹ـ۱۸).

تیغهٔ پایه‌ای **Basal lamina(Pl. basal laminae)**

شبکه صفحه مانند نازک از اجزاء ماتریکس خارج سلولی که در زیر اپی‌تلیوم جانوران و دیگر گروه‌های سازمان یافته سلولی داشته و این سلول‌ها را از بافت پیوندی یا دیگر سلول‌ها جدا می‌کند (شکل‌های ۱۹ـ۱۹ و ۲۰ـ۱۹).

باز **Base**

ترکیبی که اغلب شامل نیتروژن می‌باشد و پذیرندهٔ پروتون (H^+) از اسید است، همچنین اغلب برای نشان‌دادن پورین‌ها و پیریمیدین‌ها در DNA و RNA استفاده می‌شود.

جفت باز **Basepair**

به هم پیوستن دو نوکلئوتید مکمل در DNA یا RNA که پیوندشان به وسیله پیوندهای هیدروژنی بین بازها استحکام می‌یابد. آدنین با تیمین یا یوراسیل (A.T و A.U) و گوانین با ستیوزین (G.C) جفت می‌شوند (شکل ۳b ـ۴)

مارپیچ - حلقه - مارپیچ بازی **Basic helix-loop-helix**

به مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ بازی مراجعه شود.

بازولاترال **Basolateral**

در ارتباط با قسمت قاعده‌ای (پایه‌ای) و جانبی (کناری) یک سلول قطبی، ارگان یا ساختار بدنی. در مورد سلول‌های اپی‌تلیال سطح پایه‌ای جانبی (basolateral) متصل بر سلول‌های همسایه در زیر غشاء پایه قرار دارد.

سلول B **B cell**

لنفوسیتی که در مغزاستخوان شکل گرفته و گیرنده‌های ویژهٔ آنتی‌ژن (ایمونوگلوبولین‌های متصل شدهٔ غشایی) را بیان می‌کند. بعد از واکنش با آنتی‌ژن، سلول B تکثیر شده و به سلول‌های پلاسمای ترشح‌کنندهٔ آنتی‌بادی تبدیل می‌شود.

گیرنده سلول B **B cell receptor**

کمپلکس متشکل از مولکول‌های ایمونوگلوبولین متصل شده به غشاء که برای هر آنتی‌ژن، ویژه بوده و به همراه زنجیره‌های Igβ و Igα انتقال‌دهندهٔ سیگنال است.

خوش خیم **Benign**

در ارتباط با یک تومور که سلول‌هایی بسیار شبیه به سلول‌های طبیعی دارد. تومورهای خوش‌خیم در محلی که از آنجا منشاء گرفته‌اند باقی می‌مانند اما می‌توانند در نتیجهٔ رشد، مضر واقع شوند. به بدخیم مراجعه شود.

صفحات بتا (β) **Beta (β) sheet**

ساختار صفحه مانند و ثانویهٔ پروتئین‌ها که به وسیلهٔ پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های اصلی در دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی یا بخش‌هایی از یک زنجیرهٔ تاخورده ایجاد می‌شود. (شکل ۵ـ۳)

پیچ β **Beta (β) turn**

یک ساختار ثانویهٔ U شکل در پروتئین‌ها.

بلاست **Blast**

یک برنامهٔ کامپیوتری که به طور گسترده برای مقایسه توالی اسیدهای آمینه از یک پروتئین با توالی شناخته شده پروتئینهای موجود در منابع اطلاعاتی استفاده می‌شود. جستجوهای بلاست سرنخ‌هایی دربارهٔ ساختار، عملکرد و تکامل پروتئین که به تازگی کشف شده‌اند، می‌دهد.

بلاستوسیست **Blastocyst**

مرحله‌ای از جنین پستانداران که شامل ۶۴ سلول بوده و به دو نوع سلولی ـ تروفکتودرم (که بافت‌های جنینی خارجی را تشکیل خواهد داد) و تودهٔ سلولی داخلی (که جنین کامل را شکل می‌دهد) یا مرحله‌ای که در دیوارهٔ رحم ایجاد می‌شود و با بلاستولا در جنین‌ها جانوران دیگر مرتبط است. (شکل ۱ـ۳۲)

بافر **Buffer**

محلولی از اسید (HA) و باز (A^-) که با اضافه کردن مقادیر اندک اسید یا باز قوی، تغییرات کوچکی در pH ایجاد می‌شود و pH نزدیک pKa ترکیب باقی می‌ماند.

C

کادهرین **Cadherins**

خانواده‌ای از مولکول‌های چسبندهٔ سلولی دیمری که در اتصالات چسبنده و دسموزوم تجمع یافته و واکنش‌های هموفیلیک سلول ـ سلول وابسته به Ca^{2+} را انجام می‌دهد.

کالمودلین **Calmodulin**

پروتئین کوچک سیتوزولی که به چهار یون کلسیم متصل می‌شود. کمپلکس کلسیم ـ کالمودولین به پروتئین‌های زیادی متصل شده و به این وسیله باعث فعال شدن یا مهار آنها می‌گردد.

کالری **Calorie**

واحدی از گرما (انرژی گرمایی). یک کالری مقدار گرمایی است که دمای ۱۰ گرم آب را ۱ درجهٔ سانتیگراد بالا می‌برد. کیلوکالری (kcal) اغلب برای مشخص کردن محتوای انرژی غذاها و تغییرات در انرژی آزاد یک سیستم به کار می‌رود.

چرخهٔ کلوین **Calvin cycle**

مسیر متابولیسمی اصلی که CO_2+ را طی فتوسنتز به صورت کربوهیدرات تثبیت کرده و به آن تثبیت کربن نیز گفته می‌شود. این فرآیندها به طور غیرمستقیم به نور وابسته هستند اما هم در تاریکی و هم در روشنایی نیز می‌توانند انجام شوند. (شکل ۱۲ـ۴۴)

سرطان **Cancer**

یک واژهٔ کلی که به تومورهای بدخیم متعدد اشاره دارد. سلول‌های سرطانی رشد و تقسیم سریع‌تر از حد طبیعی داشته و به بافت‌های مجاور حمله کرده و بعضی اوقات در بافت‌های دیگر نیز پخش می‌شوند. (متاستاز)

کپسید **Capsid**

پوشش پروتئینی بیرونی ویروس که از چندین لایه زیر واحدهای پروتئینی تشکیل شده و از محتوای اسید نوکلئیک ویروس محافظت می‌کند.

کربوهیدرات **Carbohydrate**

عبارت کلی برای پلی‌هیدروکسی آلدئیدها، پلی‌هیدروکسی کتون‌ها یا ترکیباتی که از آنها مشتق می‌شوند. معمولاً فرمول $(CH_2O)_n$ دارند انواع اولیه این ترکیبات برای ذخیره و تأمین انرژی در سلول‌های جانوران به کار می‌روند. (شکل ۱۸ـ۲)

تثبیت کردن **Carbon fixation**

به چرخهٔ کلوین مراجعه شود.

کارسینوژن **Carcinogen**

هر عامل فیزیکی یا شیمیایی که وقتی سلول‌ها در معرض آن قرار می‌گیرند، سرطانی می‌شوند.

ژن محافظ **Caretaker gene**

ژنی که پروتئین‌های رمزدهی شده از آن با شرکت در تعمیر آسیب DNA از ژنوم محافظت می‌کنند. از دست دادن فعالیت ژن‌های محافظ باعث افزایش سرعت جهش و پیشرفت کارسینوژن‌ها می‌شود.

کاسپاز **Caspase**

گروهی از پروتئین‌های آنزیمی تجزیه‌کننده (پروتئاز) که در آپوپتوز عمل کرده و در یک مسیر آبشاری هر یک از آنها باعث فعالیت کاسپاز بعدی می‌شوند. (شکل‌های ۳۷ـ۲۱ و ۳۸ـ۲۱)

کاتابولیسم **Catabolism**

تجزیهٔ سلولی مولکول‌های پیچیده به مولکول‌های ساده‌تر که با آزادشدن انرژی همراه می‌باشد. آنابولیسم عکس این مسیر بوده و طی آن انرژی برای سنتز مولکول‌های پیچیده از انواع ساده‌تر مصرف می‌شود.

کاتالیزور **Catalist**

ماده‌ای که سرعت یک واکنش شیمیایی را بدون تأثیر ماندگار در ساختارش افزایش می‌دهد. آنزیم‌ها، کاتالیزورهای پروتئینی می‌باشند و ریبوزیم‌ها RNA هایی هستند که می‌توانند به عنوان کاتالیزور، عمل کنند. (شکل ۲۰ـ۳)

کاتیون **Cation**

یون دارای بار مثبت.

DNA مکمل **cDNA (complementry DNA)**

مولکول DNA که از روی مولکول mRNA به وسیلهٔ آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ساخته می‌شود، بنابراین فاقد اینترون می‌باشد.

Cell - adhesion molecules (CAMs)

مولکول‌های اتصال دهنده سلول

پروتئین‌هایی در غشاء پلاسمایی سلول‌ها که به پروتئین‌های مشابه روی دیگر سلول‌ها متصل شده و به این وسیله باعث چسبیدن سلول ـ سلول می‌شوند. چهار خانواده اصلی از CAM: کادهرین‌ها، IgCAM، اینتگرین‌ها و سلکتین‌ها می‌باشند. (شکل ۱ـ۱۹)

چرخه سلولی **Cell cycle**

توالی منظم از رویدادهایی که طی آن یک سلول کروموزوم خود را دو برابر کرده و به دو سلول تقسیم می‌شود. چرخه سلولی شامل چهار فاز می‌باشد: G_1 قبل از سنتز DNA اتفاق می‌افتد. در S همانندسازی DNA روی می‌دهد. G_2 بعد از سنتز DNA و M هنگام تقسیم سلولی روی می‌دهد و سرانجام دو سلول دختری تشکیل می‌شود. تحت شرایط خاص سلول‌ها از چرخه سلولی در طول G_1 خارج می‌شوند و در فاز G_0 به صورت سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند باقی می‌مانند. (شکل‌های ۱۷ـ۱ و ۲۰ـ۱)

تقسیم سلول **Cell division**

تقسیم یک سلول به دو سلول دختری در یوکاریوت‌های عالی. این فرآیند شامل تقسیم هسته (میتوز) و سیتوپلاسم (سیتوکینز) می‌باشد. اغلب اوقات میتوز به هر دو تقسیم سیتوپلاسم و هسته اشاره دارد.

اتصالات سلولی **Cell junction**

جایگاه‌های خاصی در سطح سلول که از آنجا سلول‌ها به یکدیگر یا ماتریکس خارج سلولی متصل می‌شوند. (شکل ۹ـ۱۹ و جدول ۱ـ۱۹)

دودمان سلولی **Cell line**

جمعیتی از سلول‌های کشت داده شده از منبع گیاهی یا جانوری که در اثر یک تغییر ژنتیکی امکان رشد نامحدود سلول‌ها فراهم می‌شود. (شکل 31b ـ۹)

تبار سلولی **Cell strain**

جمعیتی از سلول‌های کشت شده گیاهی یا جانوری که زندگی محدود داشته و سرانجام ۲۵ـ۵۰ روز بعد از تولید از بین می‌روند.

سلولز **Cellulose**

ساختار پلی‌ساکاریدی که از واحدهای گلوکز ساخته شده و پیوند بین آنها β(۱ـ۴) می‌باشد. سلولز میکروفیبریل‌های بلندی را تشکیل می‌دهد و جزء اصلی دیواره سلول‌های گیاهی است.

دیواره سلولی **Cell wall**

ماتریکس انعطاف‌ناپذیر و خارج سلولی که بعد از غشاء پلاسمایی قرار گرفته و از سلول محافظت کرده و شکل آن را ثابت نگه می‌دارد. این ساختار در اغلب قارچ‌ها، گیاهان و پروکاریوت‌ها مشاهده می‌شود اما در اغلب جانوران پرسلولی وجود ندارد. (شکل ۳۷ـ۱۹)

سانتریول **Centriole**

دو جسم استوانه‌ای درون سانتروزوم سلول‌های جانوران که شامل ۹ دسته سه‌تایی از ریزلوله‌ها بوده و از نظر ساختاری شبیه جسم‌پایه‌ای می‌باشد. (شکل ۴ـ۱۸)

سانترومر **Centromere**

قسمتی از توالی DNA که برای جدا شدن مناسب کروموزوم‌ها در طول میتوز و میوز ضروری می‌باشد، جایگاهی در کروموزوم‌های میتوزی که در آن کینه‌توکور شکل می‌گیرد. این قسمت به صورت فشرده مشخص می‌شود.

سانتروزوم (کانون سلولی) **Centrosome (Cell center)**

ساختاری در نزدیکی هسته سلول‌های جانوری. این ساختار مرکز سازماندهی ریزلوله‌ها (MTOC) بوده و دارای یک جفت سانتریول است که در ماتریکس پروتئینی جای دارند و قبل از میتوز تقسیم می‌شود. با هر سانتروزوم قطب دوک به وجود می‌آید.

چاپرون **Chaperone**

عبارتی کلی برای دو نوع پروتئین، چاپرون‌های مولکولی و چاپرونین‌ها، که از تاخوردن نامناسب پروتئین‌های هدف جلوگیری کرده و یا تاخوردن صحیح پروتئین را تسهیل می‌کنند. (شکل‌های ۱۶ـ۳ و ۱۷ـ۳)

چاپرونین **Chapronine**

به چاپرون مراجعه شود.

نقطه کنترل **Checkpoint**

هر یک از چند نقطه موجود در چرخه سلولی یوکاریوتی که ورود سلول به مرحله بعد را متوقف می‌کنند تا این که شرایط مناسب حاصل شود.

تعادل شیمیایی **Chemical equlibrium**

شرایطی در واکنش شیمیایی که در آن غلظت همه محصولات و واکنش‌دهنده‌ها ثابت مانده و سرعت واکنش رفت و برگشت مساوی است.

انرژی پتانسیل شیمیایی **Chemical potential energy**

انرژی که در پیوندهای اتصال‌دهنده اتم‌ها در مولکول‌ها ذخیره می‌شوند.

کموکاین **Chemokine**

پروتئین ترشحی متعدد و کوچک که به عنوان هدایت‌کننده شیمیایی لکوسیت‌ها عمل می‌کند.

کموتاکسی **Chemotaxis**

حرکت سلول یا ارگانیسم به سمت ماده شیمیایی ویژه یا دورشدن از آن.

کایمر **Chimera**

۱ـ جانور یا بافتی که از اجزاء مختلفی تشکیل شده است. این اجزاء به طور ژنتیکی از افراد جداگانه مشتق شده‌اند، یک هیبرید، ۲ـ پروتئینی شامل قسمت‌هایی از پروتئین‌های مختلف.

کلروفیل‌ها **Chlorophylls**

گروهی از رنگدانه‌های پورفیرین جذب‌کننده نور که برای فتوسنتز ضروری هستند. (شکل ۳۱ـ۱۲)

کلروپلاست **Chloroplast**

اندامک خاص در سلول‌های گیاهی. این اندامک به وسیله دو غشاء احاطه شده و دارای غشاءهای حاوی کلروفیل (تیلاکوئید) است که واکنش‌های جذب‌کننده نور فتوسنتز در آنجا اتفاق می‌افتد.

کلسترول **Cholestrol**

لیپید شامل چهار حلقه استروئیدی با گروه‌های هیدروکسیل روی یک حلقه. ترکیبی که در غشاهای بسیاری از یوکاریوتها بوده و پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی، اسیدهای چرب و ویتامین D می‌باشد.

کروماتید **Chromatid**

نسخه‌ای از کروموزوم‌های مضاعف شده که در فاز S چرخه سلولی شکل می‌گیرد و به وسیله سانترومر به کروماتید دیگر متصل شده و کروماتید خواهری نیز نامیده می‌شود. در طول میتوز دو کروماتید جدا شده و هر کدام از آنها وارد یکی از سلول‌های دختری می‌شوند.

کروماتین **Chromatin**

کمپلکسی از DNA، هیستون‌ها و پروتئین‌های غیرهیستونی که کروموزوم‌های یوکاریوتی را تشکیل می‌دهند. تراکم کروماتین در طول میتوز باعث می‌شود کروموزوم‌ها در متافاز قابل مشاهده شوند.

کروماتوگرافی مایع **Chromatography, liquid**

گروهی از روش‌های بیوشیمیایی برای جداسازی مخلوط‌های مولکولی (مثل پروتئین‌های مختلف) بر پایه جرم (کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی)، بار (کروماتوگرافی تعویض یونی) و یا توانایی متصل شدن به طور ویژه به یک مولکول (کروماتوگرافی تمایلی) است. (شکل ۲۷ـ۳)

کروموزوم **Chromosome**

واحد ساختاری ماده ژنتیکی که در یوکاریوت‌ها شامل مولکول دو زنجیره‌ای DNA و پروتئین‌های ضمیمه می‌باشد. در بیشتر پروکاریوت‌ها یک مولکول DNA دو زنجیره‌ای حلقوی ماده ژنتیکی را تشکیل می‌دهد. به کروماتین و کاریوتیپ مراجعه شود.

مژک **Cilium (Cilia)**

ساختارهای کوچک احاطه‌کننده غشاء در سطح سلول‌های یوکاریوتی و دارای یک دسته مرکزی از ریزلوله‌ها. مژک‌ها معمولاً به صورت منظم برای به حرکت درآوردن سلول (مثل ارگانیسم‌های تک سلولی) یا برای به حرکت درآوردن ذرات کوچک یا مایعات (مثل سلول‌های تراکئا) به کار می‌روند. به اکسونم و فلاژلوم نیز مراجعه شود.

سیسترنا (سیس ترانس) **Cisterna (Cisternae)**

محفظه‌های تخت که توسط غشاء احاطه شده‌اند و در دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی یافت می‌شوند.

چرخه اسید سیتریک **Citric acid cycle**

مجموعه‌ای از نه واکنش مرتبط با هم که در ماتریکس میتوکندری انجام می‌گیرد و در آن گروه‌های استیل اکسید و CO_2 تولید می‌شود و واسطه‌های احیا شده برای تولید ATP مصرف می‌شوند. همچنین چرخه کربس و چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید (TCA) نیز نامیده می‌شود (شکل ۱۰-۱۲).

کلاترین **Clathrin**

پروتئین رشته‌ای که به کمک پروتئین‌های گردآوری‌کننده در ناحیه مخصوص سطح سیتوپلاسمی غشاء پلیمریزه شده و شبکه‌ای را تشکیل می‌دهد و به این وسیله حفره‌های پوشیده شده با کلاترین تشکیل شده و وزیکول‌ها از این ناحیه جوانه می‌زنند.

کلیواژ **Cleavage**

مجموعه‌ای از تقسیم‌های سلولی سریع در جنین‌زایی که به دنبال لقاح با رشد سلولی کم اتفاق می‌افتد و به تدریج سلول‌های کوچک تولید شده و منجر به تشکیل بلاستوسیت در پستانداران یا بلاستولا در دیگر جانوران می‌شود. این واژه برای هیدرولیز مولکول‌ها نیز به کار می‌رود. (شکل‌های ۱ـ۲۲ و ۸ـ۲۲)

Cleavage/polyadenylation complex

کمپلکس برش / کمپلکس پلی آدنیلاسیون

کمپلکس پروتئینی بزرگ که باعث شکسته شدن mRNA اولیه در انتهای ۳′ جایگاه پلی A شده و با اضافه نمودن آدنین (A)، دم پلی A را تشکیل می‌دهد.

Clone **کلون**

۱ـ جمعیتی از سلول‌های مشابه از نظر ژنتیکی یا ویروس‌ها و ارگانیسم‌هایی که از جد مشترک منشاء می‌گیرند. ۲ـ نسخه‌های متعدد از ژن‌ها یا قطعات DNA مشابه که از طریق کلون کردن DNA نگهداری می‌شوند.

Cochlea **حلزونی**

ساختار حلزونی شکل دارای اندام کورتی که بخش حساس به صدا در گوش داخلی می‌باشد.

Codon **کدون**

توالی سه نوکلئوتیدی در DNA یا mRNA که نشان‌دهنده یک اسید آمینه به خصوص در هنگام پروتئین‌سازی است. همچنین به آنها تریپلت نیز گفته می‌شود. از ۶۴ کدون ممکن، ۳ کدون مربوط به پایان پروتئین‌سازی بوده و اسید آمینه‌ای را مشخص نمی‌کند و موجب پایان سنتز پروتئین می‌شود. جدول (۱ـ۴)

Coield - Coield **کویل - کویل**

موتیف ساختاری پروتئین که از مارپیچ α آمفی‌پاتیک ساخته می‌شود و می‌تواند به دور خود جمع شده و باعث پایداری خود شود. این ساختار لوله مانند در اغلب پروتئین‌های رشته‌ای و به ویژه فاکتورهای رونویسی یافت می‌شود.

Collagen **کلاژن**

گلیکوپروتئینی با سه مارپیچ غنی از گلیسین و پرولین که یکی از اجزاء عمده ماتریکس خارج سلولی در بافت‌های پیوندی می‌باشد. زیررده‌های متعدد این پروتئین از نظر قرار داشتن در بافت‌ها و ترکیب خارج سلولی و پروتئین‌های سطح سلولی مجتمع‌کننده آنها، با هم تفاوت دارند.

Complement **کمپلمان**

گروهی از پروتئین‌های سرمی ساختاری که به طور مستقیم به سطوح میکروبی یا قارچی متصل و به این وسیله باعث فعال شدن مسیر پروتئولیتیکی شده و منجر به تشکیل کمپلکس حمله‌کننده سیتولیتیک می‌شوند.

Complementry **مکمل**

۱ـ در ارتباط با توالی اسید نوکلئیک یا زنجیره‌هایی که بازهایشان می‌توانند کاملاً با هم جفت شوند. ۲ـ مناطقی روی دو مولکول که با هم واکنش داده (مثل آنزیم و سوبسترا) و با هم به صورت قفل و کلید متناسب می‌شوند.

Complementry DNA (cDNA) **مکمل cDNA**

به **cDNA** مراجعه شود.

Complementation **کامل شدن**

به تکامل ژنتیکی و تکامل عملکردی مراجعه شود.

Concentration gradiant **شیب غلظتی**

در زیست‌شناسی سلولی، تفاوت در غلظت سوبسترا در مناطق مختلف سلول، جنین، یا محل‌های مختلف غشاء سلولی می‌باشد.

Conformation **کنفورماسیون**

شکل دقیق سه‌بعدی یک پروتئین یا سایر ماکرومولکول‌ها که از موقعیت فضایی اتم‌ها در مولکول حاصل می‌شود. (شکل ۸ـ۳)

Connexins **کانکسین‌ها**

خانواده‌ای از پروتئین‌های عبورکننده غشایی که اتصال‌های منفذدار را در مهره‌داران شکل می‌دهند. (شکل ۱۸ـ۱۹)

Constitutive **ساختاری**

در ارتباط با تولید یا فعالیت سلولی مداوم یک مولکول یا عملکرد مداوم فرایندهای سلولی (مثل ترشح خودمختار) که تولید آنها با محرک‌های داخلی یا خارجی تنظیم نمی‌شود.

Contractile loundles **دستجات انقباضی**

دستجاتی از اکتین و میوزین در سلول‌های غیرماهیچه‌ای که به عنوان اتصال سلول (مثل فیبرهای استرس) یا حرکت سلول (حلقه انقباضی در تقسیم سلول) عمل می‌کنند.

COPI **COPI**

گروهی از پروتئین‌ها که وزیکول‌های انتقالی را در مسیر ترشحی پوشش می‌دهند. این وزیکول‌های پوشش داده شده با COPI پروتئین‌ها را از دستگاه گلژی به شبکه آندوپلاسمی و یک سیسترن به سیسترن بعدی در گلژی منتقل می‌کنند.

COPII

گروهی از پروتئین‌هایی که وزیکول‌ها را در مسیر ترشحی پوشش می‌دهند. وزیکول‌های پوشش داده شده با COPII پروتئین‌ها را از شبکه آندوپلاسمی به گلژی هدایت می‌کنند.

Cotranslational - translocation

انتقال هم‌زمان با ترجمه

انتقال همزمان پروتئین‌های ترشحی به داخل شبکه آندوپلاسمی وقتی که پروتئین تولید شده هنوز متصل به ریبوزوم می‌باشد و ترجمه در شبکه آندوپلاسمی ادامه یافته و پروتئین طویل می‌شود.

انتقال همراه **Cotransport**

عبور یون‌ها و مولکول‌های کوچک از غشاء برخلاف شیب غلظت که با عبور مولکول دیگر در جهت شیب غلظت جفت می‌شود.

پیوند کووالانسی **Covalant band**

نیروی شیمیایی مستحکمی که اتم‌ها را در یک مولکول به وسیله به اشتراک گذاردن یک یا چند جفت الکترون در کنار هم نگه می‌دارد. همچنین به پیوندهای غیرکوالان مراجعه شود. (شکل ۲ـ۲ و ۶ـ۲)

Cross - exon recognition complex

کمپلکس شناسایی درون اگزون

پروتئین‌های SR بزرگ تجمعی متصل شده به RNA و دیگر ترکیب‌هایی که به مشخص کردن اگزون‌ها در mRNA اولیه در یوکاریوتهای عالی کمک می‌کنند و باعث پردازش صحیح RNA می‌شوند.

کراسینگ‌آور **Crossing Over**

تعویض ماده ژنتیکی میان کروماتیدهای مادری و پدری در طول میوز تا این که کروموزوم نوترکیب ایجاد شود. همچنین به نوترکیبی مراجعه شود. (شکل ۱۰ـ۵)

AMP حلقوی **Cyclic AMP(cAMP)**

یک پیامبر ثانویه که کانال‌های کاتیونی را در سلول‌های میله‌ای باز کرده و پروتئین کیناز G را در رگ‌های ماهیچه صاف و دیگر سلول‌ها فعال می‌کند. (شکل ۹ـ۱۵ و ۱۸ـ۱۵ و ۳۱ـ۱۵)

سیکلین **Cyclin**

هر یک از بی‌شمار پروتئین‌هایی که مقدار و غلظت آنها در طول چرخه سلول یوکاریوتی کم یا زیاد می‌شود. سیایکلین کمپلکس‌هایی با کیناز (کیناز وابسته به سیکلین) تشکیل می‌دهد و به این وسیله این آنزیم‌ها را فعال و نسبت به سوبسترای ویژه اختصاصی می‌کنند.

کیناز وابسته به سیکلین **Cyclin - dependent kinase**

یک نوع پروتئین کیناز که در هنگام اتصال به سیکلین از نظر کاتالیتیک فعال می‌باشد. سیکلین‌های ـ CDK متعدد در طی چرخه سلولی یوکاریوتها به وسیله فسفریله کردن پروتئین‌های هدف، عملیات مختلفی را به راه می‌اندازند. (شکل ۳۲ـ۲۰)

سیتوکروم‌ها **Cytochromes**

گروهی از پروتئین‌های رنگی دارای آهن می‌باشند و بعضی از آنها به عنوان حاملین الکترون در طی تنفس و فتوسنتز عمل می‌کنند. (شکل ۱۴a ـ۱۲)

سیتوکین **Cytokin**

هر یک از پروتئین‌های بی‌شمار کوچک ترشحی (مثل اریتروپوئیتین، G-CSF و اینترفرون، اینترلوکین) که به گیرنده‌های سطح سلول‌های خون و سیستم ایمنی متصل شده و تحریک تمایز و تکثیر این را باعث می‌شوند.

گیرنده سیتوکین **Cytokine receptor**

گروه بزرگی از گیرنده‌های سیگنالی سطح سلول شامل: اریتروپوئیتین، هورمون رشد، اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها. اتصال لیگاند منجر به فعال شدن بخش سیتوزولی کینازهای JAK متصل شده به رسپتور می‌شود و به این وسیله مسیر سیگنال داخل سلولی آغاز می‌گردد (شکل‌های ۸ـ۱۴ و ۱۲ـ۱۴).

سیتوکینز **Cytokinesis**

تقسیم سیتوپلاسم طی میتوز که دو سلول دختری را تولید کرده و هر کدام از این سلول‌ها شامل اندامک‌ها و هسته می‌باشند. (شکل ۳۴ـ۱۷)

سیتوپلاسم **Cytoplasm**

محتویات یک سلول که درون غشاء پلاسمایی قرار دارند. این محتویات در سلول‌های یوکاریوتی خارج از هسته قرار گرفته‌اند.

اسکلت سلولی **Cytoskeleton**

شبکه‌ای از مواد فیبری، عمدتاً شامل: ریزلوله‌ها: ریزرشته‌های اکتینی و رشته‌های حدواسط می‌باشد و در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی قرار دارد. اسکلت سلولی موجب سازمان‌یابی و حفاظت از ساختارهای سلولی شده و باعث حرکت کروموزوم‌ها، اندامک‌ها و حرکت خود سلول می‌شود. (شکل ۱ـ۱۷ و ۲ـ۱۷ و ۱ـ۱۸)

سیتوزول **Cytosol**

قسمت آبی بی‌شکل سیتوپلاسم که شامل: اندامک‌ها، غشاءها و ترکیبات نامحلول اسکلت سلولی می‌باشد.

سطح سیتوزولی **Cytosolic face**

سطحی از غشاء سلولی که پس از سیتوزول قرار دارد. (شکل ۸ـ۱۰)

D

DAG **DAG**

دی‌اسیل گلیسرول مراجعه شود.

دالتون **Dalton**

واحدی از جرم مولکولی که تقریباً برابر با جرم اتم هیدروژن است. ($1/66\times10^{-24}g$)

دناتوره شدن **Denaturation**

تغییرات اساسی در کنفورماسیون پروتئین یا اسیدنوکلئیک که به واسطه شکستن تعداد زیادی پیوندهای غیرکوالانسی به موجب گرما یا قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی مختلف ایجاد می‌شود و منجر به از دست دادن فعالیت زیستی می‌گردد.

دندریت **Dendrite**

زائده‌ای نسبتاً کوتاه و منشعب که از جسم سلولی یک نورون بیرون زده و پیام‌ها را از اکسون دیگر نورون‌ها دریافت می‌کند. (شکل ۲ـ۲۳)

سلول‌های دندریتیک **Dendritic cell**

سلول‌های فاگوسیتوزی ارائه‌دهنده آنتی‌ژن که در بافت‌های زیادی وجود دارند و پاتوژن‌ها را از طریق گیرنده‌های شبیه (Toll-like receptor)Toll تشخیص می‌دهند. بعد از وارد شدن آنتی‌ژن به محلی از بافت آسیب‌دیده یا عفونی ماکروفاژها به گره‌های لنفاوی مهاجرت کرده و فعال شدن سلول‌های T را آغاز می‌کنند. (شکل ۴ـ۲۴)

Deoxiribonacleic acid

دئوکسی ریبونوکلئیک اسید

به **DNA** مراجعه شود.

غیرقطبی شدن **Depolarization**

کاهش پتانسیل الکتریکی منفی در سطح سیتوزولی که به طور معمول در حال استراحت در دو سوی غشاء وجود دارد و منجر به کم شدن بار منفی داخل غشاء یا پتانسیل غشایی مثبت در داخل غشاء می‌گردد.

معین سازی **Determination**

تغییراتی در طی جنین‌زایی سلول است. این تغییرات سلول را در یک مسیر ویژه تمایز قرار می‌دهد.

تکوین **Development**

تمامی فرآیندهایی که شامل: رشد، تمایز و سازمان‌یابی یک سلول لقاح یافته و تبدیل آن سلول به گیاه یا جانور کامل است. طی فرایند رشد، قطبی شدن در حرکت انواع سلول‌های منفرد، بافت‌ها و اندام‌ها شکل می‌گیرد.

دی‌اسیل گلیسرول **Diacyglycerol (DAG)**

پیامبر ثانویه متصل به غشاء که می‌تواند به وسیله شکستن فسفواینوزیتول‌ها در پاسخ به تحریک گیرنده‌های سطح سلولی معین تولید شود. (شکل‌های ۹ـ۱۵ و ۲۹ـ۱۵)

بیان متفاوت ژنی **Differential gene expression**

بیان ژن‌های مختلف به وسیله سلول‌های با ژنوتیپ‌های مشابه که منجر به تولید یک سری پروتئین‌های ویژه می‌شود. این پروتئین‌های ویژه مراحل رشد یا تمایز نوع سلول را موجب می‌شوند.

تمایز **Differention**

فرآیندی که معمولاً شامل تغییرات در میان ژن‌های سلول اولیه و تبدیل آن به یک سلول تخصص یافته می‌باشد.

دیپلوئید **Diploied**

در ارتباط با سلول یا ارگانیسم که دارای دو سری کامل از کروموزوم‌های هومولوگ و به همین ترتیب دو نسخه (آلل‌ها) از هر ژن یا جایگاه ژنی می‌باشد. سلول‌های سوماتیک دارای تعدادی کروموزوم‌های دیپلوئید هستند. این کروموزوم‌ها (2n) که ویژه یک نوع است. همچنین به هاپلوئیدی مراجعه شود.

دی‌ساکارید **Disaccharide**

کربوهیدرات کوچک (قند) که شامل دو مونوساکارید است این دو مونومر به صورت کوالان با یک پیوند گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند. (شکل ۱۹ـ۲)

ثابت تجزیه **Dissociation constant (led)**

به ثابت تعادل مراجعه شود.

پیوند دی‌سولفیدی **Disulfidebond (-s-s-)**

اتصال کووالان که بین اتم‌های سولفور متعلق به سیستئین در پلی‌پپتیدهای مختلف با بخش‌های مختلفی از یک پلی‌پپتید صورت می‌گیرد.

داکسی ریبونوکلئیک اسید DNA (deoxiribonucleic acid)

پلیمر خطی طویل که از ۴ داکسی‌ریبونوکلئوتید ساخته شده و حامل اطلاعات وراثتی می‌باشد. همچنین به DNA با مارپیچ دوگانه مراجعه شود.

کلونینگ DNA **DNA Cloning**

روش DNA نوترکیب که در آن cDNA یا قطعاتی از DNA ژنومی به یک وکتور کلون‌سازی متصل می‌شود سپس وکتور را به سلول‌های میزبان کشت شده وارد می‌کنند و طی رشد سلول‌های میزبان درون آنها باقی می‌مانند. همچنین کلون‌سازی ژن نیز نامیده می‌شود. (شکل ۱۴ـ۵)

کتابخانهٔ DNA **DNA library**

مجموعه‌ای از مولکول‌های DNA کلون شده شامل کلیه قطعات ژنوم (کتابخانه ژنی) یا نسخه‌های DNA ساخته شده از همه mRNAها به وسیله یک نوع سلول (کتابخانه cDNA). این مولکول‌های DNA به وکتورهای کلون‌سازی متصل شده‌اند.

DNA لیگاز **DNA ligase**

آنزیمی که انتهای ۳َ یک قطعه DNA را به انتهای ۵ دیگری متصل می‌کند و زنجیره ممتد تشکیل می‌شود.

آرایه‌های DNA **DNA microarray**

یک سری منظم از هزاران توالی نوکلئوتیدی مختلف که در اسلاید میکروسکوپی یا سطح جامد مرتب شده‌اند و می‌توانند در میان ژن‌ها در سلول‌های مختلف یا سلول‌های ویژه در مراحل مختلف رشد یا تحت شرایط مختلف دیگر استفاده شوند.

DNA پلیمراز **DNA polymerase**

آنزیمی که از یک رشته DNA همانندسازی می‌کند (رشته الگو) تا رشته مکمل ساخته شود. همه DNA پلیمرازها، داکسی‌ریبونوکلئوتیدها را در هربار از سمت ۵ به انتهای ۳ یک پرایمر کوتاه از RNA یا DNA اضافه می‌کنند.

دُمین **Domain**

منطقه مشخص از یک پروتئین با ساختار سه‌بعدی. دُمین عملکردی فعالیت ویژه یک پروتئین را انجام می‌دهد. دُمین ساختاری دارای ۴۰ یا تعداد بیشتری آمینواسید می‌باشد که در ساختار سوم یا دوم مرتب داده شده‌اند. دُمین توپولوژیکی رابطه فضایی مشخص با بقیه پروتئین دارد.

غالب **Dominant**

در ارتباط با آللی از ژن که در فنوتیپ هتروزیگوت بیان می‌شود. آلل مغلوب بیان نمی‌شود.

Dominant negative

در علوم ژنتیک، آللی که در حالت غالب عمل می‌کند اما اثری مشابه از دست دادن فعالیت آلل غالب را بروز می‌دهد. به طور کلی آلل تولیدکننده پروتئین جهش یافته است. این پروتئین عمل پروتئین طبیعی را به وسیله متصل شدن به هر کدام از آنها یا یک پروتئین بالادست یا پایین‌دست آن پروتئین در مسیر متوقف می‌کند.

مارپیچ دوگانه DNA **Doublebelix, DNA**

ساختار معمول سه‌بعدی DNA سلولی که در آن دو زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی به صورت آنتی‌پارالل (ناهمسو) به موازات هم قرار می‌گیرند و این دو رشته توسط پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل به دور هم پیچ می‌خورند. (شکل ۳ـ۴)

فرودست(پائین دست) **Downstream**

۱ـ جهتی برای یک ژن که RNA پلیمراز طی رونویسی در آن راستا حرکت می‌کند و به سوی انتهای رشته DNA الگو پیش می‌رود موقعیت ۱+ روی ژن اولین نوکلئوتیدی است که رونویسی می‌شود و به همین ترتیب ۲+ و ۳+ تا الی آخر رونویسی می‌شوند.

۲ـ رویدادهایی که بعداً در مراحل آبشاری اتفاق می‌افتند (مثل مسیر سیگنالی). همچنین به بالادست مراجعه شود.

داینئین‌ها **Dyneins**

عضوی از پروتئین‌های حرکتی که از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP برای حرکت به سمت انتهای منفی ریزلوله‌ها استفاده می‌کنند. داینئین‌ها می‌تواند وزیکول‌ها و اندامک‌ها را منتقل کنند و مسئول حرکت مژه و تاژک می‌باشند و در حرکت کروموزوم‌ها طی میتوز نقش دارند. (شکل ۱۸ـ۲۴ و ۱۸ـ۲۵)

E

اکتودرم **Ectoderm**

خارجی‌ترین لایه از سه لایه اصلی جنین پستانداران که به بافت اپیدرمی، سیستم عصبی و اندام‌های حسی بیرونی تبدیل می‌شوند. همچنین به اندودرم و مزودرم مراجعه شود. (شکل ۱۱ـ۲۲ و ۳ـ۲۱)

بازوی EF **EF-hand**

یک نوع موتیف ساختاری مارپیچ ـ حلقه ـ مارپیچ که در پروتئین‌های متصل‌شونده به Ca^{2+} مثل کالمودولین وجود دارد (شکل ۳ـ۹b)

پتانسیل الکتریکی **Electronic potential**

انرژی مرتبط با جداشدن بارهای مثبت و منفی. پتانسیل الکتریکی تقریباً در دو سوی غشای پلاسمایی همه سلول‌ها حفظ می‌شود.

شیب الکتریکی **Electronic gradiant**

نیروی به حرکت درآورنده که به صورت انرژتیکی مسیر مناسب انتقال یک یون (یا مولکول‌های باردار) را در دو سوی غشاء مشخص می‌کند. این شیب در نتیجه ترکیب شدن اثر شیب غلظت یون‌ها و پتانسیل غشایی در دو سوی غشاء می‌باشد.

ناقل الکترون **Electron carrier**

هر مولکول یا اتمی که الکترون‌ها را از مولکول‌های دهنده می‌پذیرد و آنها را به مولکول‌های پذیرنده در واکنش‌های مزدوج اکسیداسیون و احیا منتقل می‌کند. (شکل ۲ـ۱۲)

انتقال الکترون **Electron transport**

جریانی از الکترون‌ها که از طریق ناقلین الکترون از دهنده‌های الکترونی احیاءکننده (مثل NADH) به O_2 در غشاء داخلی میتوکندری یا از H_2O به $NADP^+$ در غشاء تیلاکوئیدی کلروپلاست گیاهان صورت می‌گیرد. (شکل ۱۸ـ۱۲ و ۳۰ـ۱۲)

زنجیره انتقال الکترون **Electron transport chain**

زنجیره انتقال الکترون یک سری از کمپلکس‌های چند پروتئینی در غشاء داخلی میتوکندری که همراه با سیتوکروم C و کوآنزیم Q می‌باشد که الکترون‌ها از الکترون‌های دهنده احیاءکننده (مثل NADH) به O_2 منتقل می‌شوند. هر عضو از زنجیره شامل یک یا تعداد بیشتری از ناقلین الکترون متصل شده می‌باشد (شکل ۱۶ـ۱۲).

الکتروفورز **Electrophoresis**

یکی از چندین روش جداسازی ماکرومولکول‌ها که بر مبنای میزان حرکتشان در ژل یا محیط‌های دیگر در معرض یک میدان الکتریکی قوی از هم جدا می‌شوند.

فاکتور طویل شدن **Elongation factor (EF)**

گروهی از پروتئین‌های غیر ریبوزومی که برای ادامه ترجمه mRNA (سنتز پروتئین) به دنبال آغاز ترجمه، مورد نیاز است. (شکل ۲۵ـ۴)

آمبریوژنز (جنین‌زایی) **Emberyogenesis**

تمایزهای اولیه یک موجود زنده در تخم لقاح یافته (تخم).

Embergonic stem (ES) cells

سلول‌های بنیادی آمبروژنیک

تباری از سلول‌های کشت شده که از جنین‌های سیار ابتدایی مشتق می‌شوند و می‌توانند به صورت گسترده به انواع سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی یا بعد از اضافه کردن مجدد به جنین میزبان تمایز یابند.

اندرگونیک **Endergonic**

در ارتباط با واکنش‌ها و فرایندهایی که دارای ΔG مثبت می‌باشند بنابراین به منظور پیشرفت واکنش به انرژی آزاد نیاز دارند. متضاد (exergonic).

درون ریز **Endocrine**

در ارتباط با مکانیسم سیگنالی که در آن سلول‌های هدف به هورمون منتشر شده به داخل خون متصل شده و به وسیله سلول‌های ترشح‌کننده ویژه موجود در یک غده پاسخ می‌دهند (مثل غده تیروئید و پاراتیروئید).

مسیر آندوسیتوزی **Endocytic pathway**

مسیر سلولی شامل آندوسیتوز وابسته به گیرنده که مواد خارج سلولی را به وسیله پروتئین‌های ناقل غشایی وارد می‌کند و برای حذف گیرنده‌های پروتئین‌ها از سطح سلول و تنظیم فعالیت آنها عمل می‌کند.

آندوسیتوز **Endocytosis**

واژه کلی برای جذب مواد خارج سلولی از طریق به درون کشیده شدن غشاء پلاسمایی که شامل آندوسیتوز وابسته به گیرنده، فاگوسیتوز و پینوسیتوز می‌باشد.

اندودرم **Endoderm**

داخلی‌ترین لایه از سه لایه اصلی جنین جانوران، که به روده و دستگاه تنفسی تبدیل می‌گردد. به اکتودرم و مزودرم مراجعه شود.

شبکه آندوپلاسمی **Endoplasmic reticulum**

شبکه‌ای از ساختارهای غشایی به هم پیوسته در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتی (ER) که متصل به پوشش بیرونی هسته می‌باشد. ER حشن به ریبوزوم‌ها متصل می‌باشد و در سنتز و پردازش پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های غشایی نقش دارد. ER صاف بدون ریبوزوم می‌باشد و در سنتز لیپید نقش دارد. (شکل ۱ـ۹)

اندوزوم **Endosome**

یکی از دو جزء متصل به غشاء. اندوزوم‌های اولیه (وزیکول‌های آندوسیتوزی) از غشاء پلاسمایی طی آندوسیتوز وابسته به گیرنده جوانه می‌زند. اندوزوم‌های ثانویه دارای pH اسیدی هستند و در دسته‌بندی پروتئین‌ها به لیزوزوم‌ها نقش دارند. (شکل ۱ـ۱۴ و ۲۹ـ۱۴)

همزیستی داخلی **Endosgmbiont**

یک باکتری که داخل سلول یوکاریوت در صورت همزیست مشترک و سودمند باقی می‌ماند. بر طبق فرضیه همزیستی داخلی، هر دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست از طریق همزیستی داخلی حاصل شده‌اند.

اندوترمیک **Endothermic**

در ارتباط با واکنش‌ها و فرایندهایی که دارای تغییر مثبت در آنتالپی (ΔH) هستند و گرما را به منظور پیشرفت واکنش جذب می‌کنند. متضاد اگزوترمیک.

تشدیدکننده **Enhancer**

توالی تنظیم‌کننده در DNA یوکاریوتی است و می‌تواند در فاصله دورتر از ژنی که کنترل می‌کند قرار گیرد. تشدیدکننده ممکن است در داخل توالی رمزدهی کننده قرار گیرد. اتصال پروتئین‌های ویژه به یک تشدیدکننده، سرعت رونویسی ژن تحت کنترل را تغییر می‌دهد. (شکل ۱۶ـ۷)

جسم تشدید کننده **Enhancesome**

کمپلکس نوکلئوپروتئینی بزرگ که از تجمع فاکتورهای رونویسی حاصل می‌شود (فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌ها). این فاکتورهای رونویسی به صورت مشترک با کمک پروتئین‌های خم‌کننده DNA متصل می‌شوند. (شکل ۳۰ـ۷)

آنتالپی **Enthalpy(H)**

گرما، در یک واکنش شیمیایی، آنتالپی واکنش‌دهنده‌ها یا محصولات با مجموع انرژی‌های پیوندهایشان برابر است.

آنتروپی **Entropy(s)**

میزان بی‌نظمی در یک سیستم. هر چه آنتروپی بیشتر باشد میزان بی‌نظمی بیشتر است.

پاکت **Envelope**

به پاکت هسته‌ای یا پاکت ویروسی مراجعه شود.

آنزیم **Enzyme**

پروتئینی که واکنش‌های شیمیایی ویژه با یک یا چند سوبسترای اختصاصی را کاتالیز می‌کند.

اف **Eph**

گیرنده سطح سلولی برای افرین، همچنین رسپتور Eph نیز نامیده می‌شود.

نفرین **Nephrin**

خانواده‌ای از پروتئین‌های سیگنالی متصل به غشاء که در واکنش‌های سلول به سلول شرکت کرده در تنظیم رشد اکسون‌ها درگیر هستند. بنابراین آنها اتصال‌های مناسب طی تمایز سیستم عصبی را فراهم می‌کنند.

فاکتور رشد اپیدرمی **Epidermal growht factor (EGF)**

فاکتور رشد اپیدرمی: خانواده‌ای از پروتئین‌های ترشحی سیگنالی (خانواده EGF) که در رشد بیشتر بافت‌ها در اغلب جانوران به کار می‌روند. سیگنال‌های EGF به گیرنده‌های تیروزین کینازها محدود می‌شوند. جهش در ترکیبات انتقال‌دهنده سیگنال‌های EGF در سرطان‌های انسان مثل سرطان مغز ایجاد می‌شود. به خانواده HER مراجعه شود.

اپی‌ژنتیک **Epigenetic**

در ارتباط با فرآیندی که بیان ژن‌های خاصی را تحت تأثیر قرار داده و سلول‌های دختری آن را به ارث می‌برند، اما در تغییر توالی DNA درگیر نمی‌شوند.

اپی‌نفرین **Epinephrine**

یک کاته‌کولامین ترشحی به وسیله غده آدرنال و بعضی نورون‌ها در پاسخ به استرس، همچنین آدرنالین نیز نامیده می‌شود. اپی‌نفرین به عنوان هورمون و نوروترانسمیتر (میانجی عصبی) عمل کرده و باعث حالت تهاجمی می‌شود. (مثل افزایش سطح گلوکز خون و افزایش ضربان قلب).

اپی‌تلیوم **Epithelium (pl.epithelia)**

پوشش صفحه مانند که از یک یا چند لایه از سلول‌های متصل به هم تشکیل شده‌اند این پوشش در سطح خارجی و داخلی بدن قرار دارد.

اپی‌توپ **epitop**

قسمتی از آنتی‌ژن که به گیرنده ویژه آنتی‌ژن در سطح سلول B یا سلول‌های T یا به آنتی‌بادی متصل می‌شود. آنتی‌ژن‌های پروتئینی بزرگ دارای چندین اپی‌توپ هستند و به آنتی‌بادی‌ها با ویژگی‌های مختلف متصل می‌شوند.

ثابت تعادلی **Equilibrium constant (K)**

نسبت ثابت سرعت واکنش رفت و برگشت در یک واکنش. یک واکنش $A+B \leftrightarrow AB$. ثابت اتصال (Ka) برابر با K و ثابت تجزیه (Kd) برابر با $\frac{1}{K}$ دارد.

اریتروپویتین **Erythropoietin (Ep_0)**

سیتوکینی که تولید سلول‌های گلبول‌های قرمز را به وسیله تحریک تمایز و تکثیر سلول‌های اجدادی اریتروئید در مغز استخوان موجب می‌شود. (شکل ۶ـ۱۶ و ۵ـ۲۱)

یوکروماتین **Euchromatin**

بخش‌هایی از کروماتین که کمی فشرده‌اند و در کروموزوم‌های اینترفاز ظاهر می‌شوند و شامل مناطق فعال از لحاظ ترجمه هستند. همچنین به هتروکروماتین مراجعه شود. (شکل ۶ـ۳۳a)

یوکاریوت **Eukaryote**

رده‌ای از ارگانیسم‌ها که شامل یک یا تعداد بیشتری سلول می‌باشند و حاوی یک هسته و اندامک‌های احاطه شده با غشاء هستند. آنها یکی از سه فرمانروای موجودات زنده امروزی را تشکیل می‌دهند. به آنها یوکاریا نیز می‌گویند. یوکاریوت‌ها شامل همه ارگانیسم‌ها به جزء ویروس‌ها و پروکاریوت‌ها می‌باشند.

Excision- repair system DNA

سیستم ترمیم برش بازی DNA

یکی از مکانیسم‌های متعدد برای تعمیر آسیب DNA که در نتیجه دپورینه شدن یا آمینه شدن خودبه‌خودی یا قرار گرفتن در معرض مواد سرطان‌زا ایجاد می‌شود. این سیستم‌های تعمیری به خوبی عمل خود را انجام می‌دهند و باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان می‌شوند.

اگزرگونیک **Exorgonic**

در ارتباط با واکنش‌ها و فرآیندهایی که دارای ΔG منفی هستند و انرژی آزاد را منتشر کرده و به این ترتیب موجب پیشرفت واکنش می‌شوند. متضاد اندرگونیک

اگزوسیتوز **Exocytosis**

انتشار مولکول‌های داخل سلولی (مثل هورمون‌ها و پروتئین‌های ماتریکسی) که این مواد به وسیله وزیکول ادغام شونده با غشای پلاسمایی به بیرون سلول ریخته می‌شوند.

اگزون **Exon**

قطعاتی از ژن یوکاریوتی (یا از رونوشت اولیه ژن) که به عنوان mRNA بالغ، rRNA یا tRNA به سیتوپلاسم می‌رسد. همچنین به اینترون مراجعه شود.

تلاطم اگزونی **Exon shuffling**

فرآیند تکاملی برای ایجاد ژن‌های جدید (مثل ترکیب‌های جدید از اگزون‌ها) از انواع اولیه موجودات زنده. این فرآیند به وسیله نوترکیبی میان اینترون‌های دو ژن جدا از هم یا به وسیله جابه‌جایی عناصر متحرک DNA صورت می‌گیرد. (شکل ۱۸ـ۶ و ۱۹ـ۶)

سطح اگزوپلاسمی **Exoplasmic face**

سطحی از غشاء سلولی که دور از سیتوزول قرار دارد. (شکل ۱۰ـ۸)

اگزوزوم **Exosome**

مجموعه بزرگ دارای اگزونوکلئاز که قطعات اینترون‌های حاصل از پیرایش را تجزیه می‌کند و به طور ناقص mRNA اولیه را در هسته یا mRNAهای دارای دم پلی A کوتاه در سیتوپلاسم پردازش می‌کنند.

اگزتومیک **Exthermic**

در ارتباط با واکنش‌ها و فرآیندهایی که تغییرات آنتالپی منفی دارند و گرما آزاد کرده و به این ترتیب واکنش پیش می‌رود. متضاد اندوترمیک.

اکسپورتین **Exportin**

پروتئینی که به یک پروتئین محموله در هسته با کمک Ran (عضوی از ابرخانواده GTPase) متصل شده و محموله را از طریق منافذ هسته‌ای به سیتوپلاسم منتقل می‌کند. همچنین به ایمپورتین مراجعه شود. (شکل ۲۶ـ۱۳)

وکتور بیانی **Expression vector**

ویروس یا پلاسمید تغییر داده شده که یک ژن یا cDNA را به سلول میزبان مناسب حمل می‌کند و سنتز پروتئین رمزدهی در آنها را انجام می‌دهد و برای غربال کردن کتابخانه DNA یک ژن خاص یا تولید مقدار زیاد یک پروتئین از ژن کلون شده به کار می‌رود. (شکل ۳۲ـ۵ و ۳۱ـ۵)

ماتریکس خارج سلولی **Extra cellular matrix (ECM)**

شبکه‌ای نامحلول از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها که توسط سلول‌ها به فضای بین آنها ترشح می‌شود. این شبکه پشتوانه ساختاری در بافت‌ها ایجاد کرده و می‌تواند بر تمایز و عمل بیوشیمیایی سلول‌ها مؤثر باشد. جدول (۱ـ۱۹)

F

کمپلکس F_0F_1 **F_0F_1complex**

به ATP سنتاز مراجعه شود.

انتقال تسهیل شده **Faciliated transport**

انتقال یک یون یا مولکول‌های کوچک به کمک پروتئین از غشای سلولی در جهت شیب غلظت با سرعت بالاتر از سرعت انتشار ساده آن. همچنین آن را انتشار تسهیل شده می‌نامند. جدول (۱ـ۱۱)

Fluoerecence activated cell sorter :FACS

به مراجعه شود.

Flavin adenin dinucleutid) FAD)

فلاوین آدنین دی نوکلئوتید FAD

مولکول آلی کوچک که به عنوان ناقل الکترون به وسیله پذیرفتن دو الکترون از مولکول‌دهنده و ۲ یون H^+ از محلول عمل خود را انجام می‌دهد. (شکل ۳۳b ـ۲)

اسید چرب **Fatty acid**

هر زنجیره هیدروکربنی طویل که یک گروه کربوکسیل در یک انتها داشته و منبع اصلی انرژی طی متابولیسم و یک پیش‌ساز برای سنتز فسفرلیپیدها، تری‌گلیسریدها و استرهای کلسترول می‌باشد. (شکل ۲۱ـ۲ و جدول ۴ـ۲)

فیبروبلاست **Fibrobrast**

سلول بافت پیوندی که کلاژن و دیگر ترکیبات ماتریکس خارج سلولی را ترشح می‌کند. به هنگام ترمیم زخم یا در محیط کشت بافت می‌توانند حرکت کرده و تقسیم شوند.

FISH **FISH**

به هیبریدسازی فلورسانس مراجعه شود.

فلاژلوم **Flagellum (pl.flagella)**

ساختار حرکتی بلند (معمولاً یک عدد در هر سلول) که از سطح اغلب سلول‌های یوکاریوتی بیرون زده (مثل اسپرم) با ضربات موجی شکل سلول را حرکت می‌دهد. ساختار تاژک باکتری‌های کوچک‌تر و ساده‌تر است. همچنین به اکسونم و مژه مراجعه شود.

Flarin adenin dinucleotid (FAD)

فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD)

به FAD مراجعه شود.

فلیپاز **Flipase**

پروتئینی که حرکت لیپیدهای غشایی از یک سمت غشا به

سمت دیگر در دو لایه فسفولیپیدی را انجام می‌دهد (شکل ۱۵ـ۱۱)

Fluorescence - activated cell sorter (FACS)

وسیله‌ای که یک یا تعداد کمی سلول را ازمیان هزاران سلول دیگر تشخیص می‌دهد و آنها را بر پایه تفاوت در فلورسانسشان دسته‌بندی می‌کند. (شکل ۲۸ـ۹)

FISH **FISH**

هر یک از چندین روش برای تشخیص توالی ویژه DNA یا RNA در سلول‌ها و بافت‌ها به وسیله تیمار نمونه‌ها با پروب‌های فلورسنت که با توالی ویژه هیبرید شده و باعث مشاهده نمونه با میکروسکوپ فلورسنت می‌شوند.

رنگ‌آمیزی فلورسانت **Fluorescent staining**

روش عمومی برای مشاهده ترکیبات سلولی به وسیله تیمار سلول‌ها یا بافت‌ها با ماده رنگی نشاندار با فلورسانت (مثل آنتی‌بادی) که به طور ویژه به ترکیب خاص متصل شده و موجب مشاهده نمونه به وسیله میکروسکوپ فلورسانت می‌شوند.

انرژی آزاد **Free energy (G)**

میزانی از انرژی پتانسیل یک سیستم که مجموع عمل آنتالپی (H) و آنتروپی (S) می‌باشد.

تغییر انرژی آزاد **Free energy changc (ΔG)**

تفاوت در مجموع انرژی آزاد مولکول‌های تولید شده و مولکول‌های واکنش‌دهنده در یک واکنش (ΔG) شیمیایی. تغییر منفی زیاد ΔG نشانگر این است که واکنش (یا فرآیندهای دیگر) تمایل به پیشرفت دارد.

مکمل‌سازی عملکردی **Functional complementation**

برنامه‌ای برای غربال کردن کتابخانه DNA و شناسایی ژن وحشی که عمل یک ژن معیوب را در یک جهش یافته ویژه بازسازی می‌کند.

G

فاز G_0, G_1, G_2 **G_0, G_1, G_2 phase**

به چرخه سلولی مراجعه شود.

گامت **Gamete**

سلول هاپلوئید (تخصص یافته یک اسپرم یا یک تخمک در جانوران) که در طی تقسیم میوز به وسیله سلول‌های زایا تولید می‌شود. در تولید مثل جنسی با به هم پیوستن اسپرم و تخمک مراحل تمایز یک موجود زنده شروع می‌شود.

ژن Gap **Gap gene**

گروهی از ژن‌ها در دروزوفیلا که در مراحل اولیه جنینی به وسیله فاکتورهای رونویسی از mRNA مادری در سلول تخم فعال می‌شوند. همه فاکتورهای رونویسی که در مراحل اولیه در طول شکل‌گیری قطب قدامی و خلفی رمزدهی می‌شوند.

اتصالات شکافدار **Gap junctions**

کانال‌های پروتئینی بین سلول‌های مجاور سلول‌های جانوران که اجازه عبور یون‌ها و مولکول‌های کوچک را از غشاء سلول‌ها می‌دهد، همچنین به پلاسمودسماتا مراجعه شود. (شکل ۱۸ـ۱۹)

گاسترولاسیون **Gastrulation**

فرآیندی در مرحله اولیه جنینی که در آن سلول‌های بلاستوسیت لوله‌ای را ایجاد می‌کنند و سه لایه جنینی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را شکل می‌دهند.

ژن **Gene**

واحد فیزیکی و شیمیایی وراثت که از یک نسل به نسل دیگر منتقل می‌شود. از دیدگاه مولکولی تمام توالی DNA شامل اگزون، اینترون و مناطق کنترل رونویسی و به طور کلی آنچه که برای تولید پلی‌پپتید عملکردی از RNA ضروری می‌باشد. همچنین به واحد رونویسی مراجعه شود.

کنترل ژنی **Gene control**

همه مکانیسم‌هایی که در تنظیم بیان ژن دخیل هستند و معمول‌ترین روش کنترل تنظیم رونویسی می‌باشد. اگرچه مکانیسم‌های دیگری مثل پردازش، پایداری و ترجمه mRNA در کنترل بیان بعضی ژن‌ها مؤثرند.

بیان ژنی **Gene expression**

همه فرآیندهایی که طی آن اطلاعات رمزدهی شده در یک ژن به فنوتیپ قابل مشاهده تبدیل می‌شود (اغلب تولید یک پروتئین).

خانواده ژنی **Gene family**

دسته‌ای از ژن‌ها که به وسیله مضاعف‌شدن یک ژن اجدادی و تنوعات بعدی موجب تغییرات کمی در توالی نوکلئوتیدی می‌شوند. (شکل ۲۶ـ۶)

کد ژنتیکی **Genetic code**

دسته‌ای از فرمان‌ها که نوکلئوتیدهای سه‌تایی (رمزها) در DNA یا RNA اسیدهای آمینه ویژه را در پروتئین‌ها مشخص می‌کنند.

مکمل‌سازی ژنتیکی **Genetic complementation**

اصلاح عمل ژن وحشی در سلول‌های هتروزیگوت دیپلوئید که از سلول‌های هاپلوئید حاصل می‌شوند. هر کدام از این سلول‌ها دارای جهشی در ژن‌های متفاوت رمزدهی کننده پروتئین لازم

برای مسیر بیوشیمیایی مشترک هستند. آنالیز مکمل جهش مغلوب را در دو جهش یافته با فتوتیپ جهشی مشابه ایجاد شده در ژن‌های متفاوت یا مشابه، تشخیص می‌دهد. (شکل ۷ـ۵)

نقشه‌برداری ژنتیکی **Genetic mapping**

تشخیص مناطق مرتبط با ژن‌ها در روی یک کروموزوم.

مارکرهای ژنتیکی **Genetic markers**

الل‌های مرتبط با فتوتیپ قابل تشخیص که به طور تجربی برای شناسایی یا انتخاب ژن پیوسته یک کروموزوم، یک سلول یا یک موجود زنده به کار می‌رود. همچنین به مارکرهای مولکولی بر پایه DNA مراجعه شود.

ژنوم **Genome**

مجموع اطلاعات ژنتیکی که به وسیله یک سلول و ارگانیسم حمل می‌شود.

انگشت‌نگاری ژنومی **Genomic imprinting**

فرآیندی که طی تمایز گامت‌های درگیر در تغییرات کروماتین اتفاق می‌افتد تا موجب بیان ژن‌های ویژه شود. به علت این که در گامت‌های نر و ماده ژن‌های متفاوتی وجود دارد. بیان فتوتیپی ژن‌های بخصوص توارث الل‌های ویژه از نر یا ماده را تشخیص می‌دهد.

ژنومیکس **Genomics**

آنالیزهای مقایسه‌ای تمام توالی ژن‌های ارگانیسم‌های مختلف و تشخیص الگوهای بیان ژن که برای برآورد ارتباطات تکاملی بین گونه‌ها و پیشگویی انواع کلی RNAهای تولید شده به وسیله یک ارگانیسم به کار می‌رود.

ژنوتیپ **Genotype**

مجموع ساختار ژنتیکی یک سلول منفرد یا ارگانیسم و همچنین آلل‌های ویژه در یک یا چندین جایگاه ژنی می‌باشد.

سلول زایا **Germ cell**

هر سلولی که در تولید مثل جنسی یک ارگانیسم به طور فعال در تشکیل گامت‌ها و پیش‌سازهای نابالغ شرکت می‌کند. همچنین دودمان سلول‌های زایا نیز نامیده می‌شوند. به سلول‌های سوماتیک مراجعه شود.

لایه زاینده **Germlayer**

اجداد سلول‌های زایا که به گامت‌ها تبدیل می‌شوند و بنابراین در تشکیل نسل‌های بعدی شرکت دارند.

سلول لایه زاینده **Germline cell**

به سلول‌های زاینده مراجعه شود.

گلیا **Glia**

سلول‌های پشتیبان بافت عصبی که برخلاف نورون‌ها، تحریکات عصبی را منتقل نمی‌کنند و سلول‌های گلیا نیز نامیده می‌شوند و از سلول‌های شوآن و الیگودندروسیت‌ها که غلاف میلین را تولید می‌کنند و آستروسیت‌ها که در تشکیل سیناپس عمل می‌کنند و میکروگلیا که فاکتورهای ترومیک می‌سازد و در پاسخ‌های ایمنی عمل می‌کند تشکیل شده‌اند. (شکل ۱۴ـ۲۳)

گلوکاگون **Glucagon**

هورمون پپتیدی که در سلول‌های جزایر پانکراس تولید می‌شود و تبدیل گلیکوژن به گلوکز را در کبد انجام می‌دهد. گلوکاگون به همراه انسولین برای کنترل سطح قندخون عمل می‌کند.

گلوکز **Glucose**

مونوساکارید ۶کربنه (قند) که به عنوان یک سوخت اصلی در اغلب سلول‌هاست. پلیمر طویل گلوکز، گلیکوژن و نشاسته به ترتیب برای ذخیره انرژی در سلول‌های جانوری و گیاهی به کار می‌روند.

پروتئین‌های Glut **Glut proteins**

خانواده‌ای از پروتئین‌های گذرنده غشایی که شامل ۱۲ مارپیچ α عبوری از غشاء می‌باشد. این پروتئین‌ها انتقال گلوکز (و کمی قندهای دیگر) از غشاء پلاسمایی در جهت شیب غلظت را انجام می‌دهند. (شکل ۵ـ۱۱)

گلیکوژن **Glycogen**

پلی‌ساکارید طویل و منشعب که منحصراً از واحدهای گلوکز تشکیل شده و منبع اصلی ذخیره کربوهیدرات در جانوران می‌باشد و عمدتاً در سلول‌های ماهیچه‌ای و کبد یافت می‌شود.

گلیکولیپید **Glycolipid**

هر لیپیدی که به زنجیره کربوهیدراتی کوتاه به صورت کووالان متصل شده و اغلب در غشاء پلاسمایی یافت می‌شوند.

گلیکولیز **Glycolysis**

مسیر متابولیکی که در آن قندها با تولید ATP به صورت بی‌هوازی به لاکتات یا پیروات در سیتوزول تجزیه می‌شوند.

گلیکوپروتئین **Glycoprotein**

هر پروتئینی به یک یا تعداد زیادی از زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی که به فورکووالان متصل هستند. بیشتر پروتئین‌های ترشحی و غشایی گلیکوپروتئینی می‌باشند.

Glycosaminoglycan (GAG)

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها

پلیمر طویل، خطی و باردار با واحدهای تکرار شونده دی‌ساکاریدی که اغلب این دی‌ساکاریدها سولفاته‌اند. GAG یکی از ترکیبات اصلی ماتریکس خارج سلولی است. معمولاً به عنوان جزیی از پروتئوگلیکان می‌باشد. (شکل ۲۶ـ۱۹)

پیوند گلیکوزیدی **Glycosidic bond**

پیوند کووالان میان دو مونوساکارید که به هنگام اتصال یک اتم کربن از یک قند با گروه هیدروکسیل قند دیگر با آزاد شدن یک مولکول آب (دهیدراسیون) تشکیل می‌شود. (شکل ۱۳ـ۲)

G پروتئین، تک زیرواحدی **G proteins monomeric**

به ابرخانواده GTPآز مراجعه شود.

G protein, trimeric (large)

G پروتئین، سه زیرواحدی (بزرگ)

پروتئین‌های متصل به GTP که در مسیرهای سیگنال‌دهی داخلی سلولی عمل می‌کنند. معمولاً به وسیله اتصال لیگاند به گیرنده مزدوجشان در سطح سلول فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها دارای ۷ مارپیچ عبوری از غشاء می‌باشند. همچنین به ابرخانواده GTPآز مراجعه شود. جدول (۱ـ۱۵)

G protein Conpledreceptor (GPCR)

G پروتئین‌های جفت شونده با گیرنده

عضوی از یک گروه بزرگ گیرنده‌های سیگنالی سطح سلول که شامل اپی‌نفرین، گلوکاگون و فاکتور جفت‌گیری در مخمر می‌باشد. همه GPCRها دارای ۷ مارپیچ عبوری از غشاء می‌باشند. اتصال لیگاند موجب فعال شدن G پروتئین‌های تری‌مری (سه تکه‌ای) مزدوج می‌شود و به این وسیله مسیرهای سیگنالی داخل سلولی آغاز می‌گردد.

کمپلکس گلژی **Golgi complex**

کیسه‌های پهن متشکل از کیسه‌هایی از اجزاء غشا (سیسترن) در سلول‌های یوکاریوتی که به هم متصل شده‌اند و در پردازش و دسته‌بندی پروتئین‌ها و لیپیدها برای ارسال به بخش‌های دیگر سلولی یا برای ترشح نقش دارد. همچنین شبکه گلژی نیز نامیده می‌شود. (شکل ۶ـ۹).

رشد مخروطی **Growth cone**

متشکل از امتدادهایی از غشاء سلولی و به طور عمده، رشد انتهای اکسون می‌باشد که به عنوان ساختار راهنمایی حسگرهای متحرک عمل می‌کند. (شکل ۳۷ـ۲۳ و ۳۸ـ۲۳)

فاکتور رشد **Growth factor**

مولکول پلی‌پپتیدی خارج سلولی که به رسپتور سطح سلول متصل شده و مسیر سیگنالی داخل سلولی را ایجاد می‌کند. این مسیر به طور کلی منجر به تقسیم سلولی می‌شود.

ابر خانواده GTPآز **Gtpase super family**

گروهی از پروتئین‌های داخل سلولی که بین دو حالت چرخه‌ای غیرفعال با اتصال به GDP و یک حالت فعال متصل به GTP قرار دارند. زیر واحد $G\alpha$ از پروتئین‌های G سه زیرواحدی (بزرگ) و G پروتئین‌های تک زیرواحدی (کوچک) (مثل Rac, Ran, Rab, Ras و فاکتورهای طویل شدن ویژه دخیل در سنتز پروتئین را شامل می‌شود. همچنین به پروتئین G و سه زیرواحدی (بزرگ) مراجعه شود.

H

هاپلوئید **Haploied**

در ارتباط با یک ارگانیسم یا سلول که فقط یک عدد از هر جفت کروموزوم‌های همولوگ را دارا می‌باشد. بنابراین فقط یک نسخه (آلل) از هر ژن یا جایگاه‌های ژنی را دارد. گامت‌ها و سلول‌های باکتری هاپلوئید می‌باشند. همچنین به دیپلوئید مراجعه شود.

هجهوگ **Hedgehog (Hh)**

خانواده‌ای از پروتئین‌های سیگنالی ترشحی که تنظیم‌کننده‌های اصلی تمایز بیشتر بافت‌ها و اندام‌ها در گونه‌های متعدد جانوران می‌باشند. جهش در اجزاء و انتقال سیگنالی Hh به صورت سرطان انسانی و نقص‌های تولدی (مادرزادی) ظاهر می‌شود. گیرنده این پروتئین‌ها، پروتئین گذرنده از غشاء می‌باشد.

هلیکاز **Helycase**

۱ـ هر آنزیمی که در طول دو رشته DNA حرکت کرده و با مصرف انرژی آزاد شده به وسیله هیدرولیز ATP دو رشته DNA را از هم جدا کرده و برای همانندسازی DNA ضروری است. ۲ـ فعالیت فاکتورهای آغازی ویژه که می‌تواند ساختار سوم در mRNA را طی آغاز ترجمه باز کند.

مارپیچ حلقه مارپیچ **(HLH , helix - Loop - helix)**

موتیف ساختاری محافظت شده شامل دو مارپیچ α که به وسیله حلقه کوچک به هم متصلند و در فاکتورهای دو زیرواحدی رونویسی یوکاریوتی یافت می‌شود. (شکل ۲۹b ـ۷)

خانواده HER **HER family**

گروهی از گیرنده‌های متعلق به گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTK) که به تعدادی از فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGF) (خانواده‌ای از مولکول‌های سیگنالی در انسان‌ها) متصل می‌شوند بیان بیش از حد پروتئین HER2 با اغلب سرطان‌های سینه ارتباط دارد. (شکل ۱۸ـ۱۶)

هتروکروماتین **Hetero chromatin**

مناطقی از کروماتین که بسیار فشرده‌اند و در طی اینترفاز از نظر رونویسی غیرفعال می‌باشند. (شکل ۳۳a ـ۶)

هتروزیگوت **Heterozygous**

در ارتباط با سلول دیپلوئید یا ارگانیسم که دارای آلل‌های متفاوت از ژن ویژه می‌باشد.

هگزوز **Hexose**

مونوساکارید ۶ کربنه.

پیوند پرانرژی **High - energy bond**

پیوند کوالانی که به هنگام هیدرولیز تحت شرایط داخل سلولی مقدار زیادی انرژی آزاد می‌کند. مثال‌هایی از این پیوندها، پیوند فسوانیدرید در ATP، پیوند تیواستری در استیل CoA و پیوندهای استرفسفات متعدد می‌باشد.

هیستون **Histone**

پروتئین‌های کوچک و محافظت شده که در کروماتین سلول‌های یوکاریوت یافت می‌شوند. هیستون‌ها با DNA در ساختاری به نام نوکلئوزم پیوند می‌خورد. (شکل ۲۹ـ۶)

هومئودُمین **Homoedomain**

موتیف ساختاری محافظت شده DNA برای اتصال به DNA (یک مارپیچ ـ دور ـ مارپیچ) که در فاکتورهای رونویسی تمایزی یافت می‌شود.

هومئوز **Homeose**

تبدیل یک قسمت از بدن به قسمت دیگر که در نتیجه جهش یا بیان نامناسب ژن‌های تمایزی ایجاد می‌شود.

کروموزوم همولوگ **Homologous chromosme**

یکی از دو نسخه کروموزوم مشابه که در سلول دیپلوئید وجود دارد و همچنین به آن همولوگ نیز می‌گویند هر کروموزوم همولوگ از یک والد به ارث می‌رسند.

نوترکیبی همولوگ **Homologus recombination**

به نوترکیبی مراجعه شود.

همولوگ **Homologus**

نسخه‌های پدری و مادری از هر کروموزوم که در سلول‌های دیپلوئید وجود دارند هومولوژی نیز نامیده می‌شود.

همولوژی **Homology**

شباهت در ویژگی‌ها (مثل پروتئین و توالی اسیدنوکلئیک یا ساختار یک اندام) که منشاء تکاملی مشترک را نمایان می‌سازد. پروتئین‌ها یا ژن‌هایی که همولوژی را نشان می‌دهند هومولوگ می‌باشند و گاهی اوقات به آنها همولوگ گویند. برعکس، هم‌ارزی (آنالوژی) مشابه در ساختار یا عملکرد است. آنالوژی منشاء تکاملی واحدی را معین نمی‌کند.

هموزیگوت **Homozygous**

در ارتباط با یک سلول دیپلوئید یا ارگانیسم که دارای دو آلل مشابه از هر ژن ویژه هستند.

هورمون **Hormone**

به طور کلی هر ماده خارج سلولی که پاسخ‌های ویژه را در سلول‌های هدف تحریک می‌کند، به ویژه به مولکول‌های سیگنالی گردش‌کننده در خون و ایجادکننده سیگنال‌های آندوکرسینی، هورمون گفته می‌شود.

هگزوژن **Hoxgene**

دسته‌ای از ژن‌های تمایزی که فاکتورهای رونویسی دارای هومودُمین را رمزدهی می‌کنند و به تعیین شکل بدن جانوران کمک می‌نمایند. جهش در ژن‌های Hox منجر به هومئوزیس می‌شود. (شکل ۳۲ـ۲۲)

هیالورونان **Hyaluronan**

یک گلیکوز آمینوگلیکان هیدراته بزرگ (GAG) که یکی از ترکیبات اصلی ماتریکسی خارج سلولی می‌باشد. همچنین به آن اسید هیالورونیک یا هیالورانات نیز می‌گویند. هیالورونان باعث ارتجاعیت و سفتی و لزج شدن بافت پیوندی می‌شود.

Hybridizatin nucleic acid

هیبرید شدن اسید نوکلئیک

ترکیب دو زنجیره اسید نوکلئیک مکمل برای شکل‌گیری یک مولکول دو رشته‌ای که شامل دو رشته DNA یا RNA مورد استفاده قرار می‌گیرند.

هیبریدوما **Hybridoms**

سلول‌های دوگانه کلون شده که نامیرا بوده و آنتی‌بادی مونوکلونال می‌سازند این سلول‌های دوگانه از ترکیب سلول‌های B طبیعی با سلول‌های میلوما شکل می‌گیرند.

هیدروکربن **Hydrocarbon**

هر ترکیبی که از اتم‌های کربن و هیدروژن ساخته شده است.

پیوند هیدروژنی **Hydrogen bond**

پیوند غیرکووالان که بین یک اتم (اغلب اکسیژن یا نیتروژن) با بار منفی و یک هیدروژن با بار مثبت برقرار می‌گردد. پیوند هیدروژنی اهمیت زیادی در تثبیت ساختار پروتئین‌ها و جفت شدن بازها بین زنجیره‌های اسیدنوکلئیک دارا می‌باشد. (شکل ۸ـ۲)

آبدوست **Hydrophilic**

میانکنش مناسب و مؤثر با آب. همچنین به قطبیت مراجعه شود.

آبگریز **Hydrophobic**

میانکنش نامناسب با آب، به طور کلی حل شدن کم یا نامحلول بودن در آب. همچنین به غیرقطبی مراجعه شود.

اثر آبگریزی **Hydrophobic effect**

نیرویی که مولکول‌های غیرقطبی یا بخش‌هایی غیرقطبی از مولکول‌ها را به تجمع با یکدیگر در محیط آبی وامی دارد تا این‌که واکنش آنها با مولکول‌های آب کمتر شود. اغلب این واکنش‌ها یا پیوندها آبگریز نامیده می‌شوند.

هیپرپلاریزاسیون Hyperpolarization

افزایش پتانسیل الکتریکی در سطح سیتوزولی غشاء از حالتی که به طور معمول در دو سوی غشاء پلاسمایی در هنگام استراحت وجود دارد و منجر به پتانسیل غشایی منفی بالا می‌شود.

هیپرتونیک Hypertonic

در ارتباط با یک محلول خارج سلولی که به علت افزایش مواد محلول در آن، آب طی فرآیند اسمز از سلول خارج می‌شود.

هیپوتونیک Hypotonic

در ارتباط با یک محلول خارج سلولی که به علت کاهش غلظت محلول‌ها در آنها آب طی فرآیند اسمز وارد سلول می‌شود.

I

IgCAMs CAMهای Ig

خانواده‌ای از مولکول‌های چسبنده (اتصالی) سلولی که شامل چندین دُمین ایمونوگلوبولین است و واکنش‌های سلول به سلول مستقل از Ca^{2+} را انجام می‌دهد. CAM و Igها در بافت‌های مختلف تولید می‌شوند و از ترکیبات اتصالات سخت می‌باشند. (شکل ۲ـ۱۹)

ایمنی Immunity

حالتی از مقاومت (ایمنی) بر علیه اثرات مضر قرارگرفتن در معرض پاتوژن‌ها که در دو فرم است. پاسخ ایمنی ذاتی که به سرعت عمل می‌کند اما نسبتاً غیراختصاصی است و دیگری پاسخ ایمنی اکتسابی که چند روز بعد به طور کامل عمل می‌کند، اما کاملاً اختصاصی می‌باشد. (شکل ۱ـ۴)

ایمونوگلوبولین Ig (Ig) Immunoglobulin

هر یک از پروتئین‌های سرمی که به وسیله سلول‌های B تمایز یافته تولید می‌شوند و می‌توانند به عنوان آنتی‌بادی عمل کنند. همچنین در شکل متصل به غشاء به عنوان بخشی از گیرنده سلول‌های B می‌باشند. ایمونوگلوبولین‌ها، به پنج کلاس تقسیم می‌شوند (ایزوتیپ) و هر کدام خصوصیات عملکردی ویژه دارند. همچنین به آنتی‌بادی مراجعه شود. (شکل‌های ۹ـ۲۴ و ۸ـ۲۴)

تاخوردگی ایمونوگلبولین Immunoglubulin fold

موتیف ساختاری تکاملی که در آنتی‌بادی‌ها وجود دارد. رسپتور سلول‌های T و سایر پروتئین‌های یوکاریوتی به طور مستقیم در تشخیص آنتی‌ژن ویژه دخیل نیستند. همچنین دُمین ایمونوگلوبولین نیز نامیده می‌شوند. (شکل ۱۲b ـ۲۴)

ایمپورتین Importin

پروتئینی که به پروتئین محموله در سیتوپلاسم متصل شده و آن را از طریق منافذ هسته‌ای به داخل هسته انتقال می‌دهد. برگشت ایمپورتین به سیتوپلاسم به کمک Ran (عضوی از ابرخانواده GTPآز) صورت می‌گیرد. همچنین به اکسپورتین مراجعه شود.

القاء Induction

۱ـ تغییری در حالت تمایزی یک سلول یا یک بافت در جنین‌زایی که در نتیجه سیگنال‌هایی از سلول یا بافت دیگر یا به وسیله تماس مستقیم با سایر سلول‌ها روی می‌دهد. ۲ـ افزایش در سنتز آنزیم یا مجموعه‌ای از آنزیم‌هایی که به وسیله مولکول‌های ویژه (القاکننده) در متابولیسم سلولی صورت می‌گیرد.

التهاب Inflammation

پاسخ موضعی به آسیب یا عفونت که منجر به فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی و دیگر اجزا آن محل آسیب دیده می‌شود و به وسیله چهار نشانه قرمزی، تورم، تب و درد مشخص می‌گردد.

فاکتور شروع Initiation Factor

گروهی از پروتئین‌های غیرریبوزومی که تجمع مناسب زیبوزوم و mRNA را فراهم کرده و برای شروع ترجمه ضروری هستند (سنتز پروتئین) (شکل ۲۴-۴).

Inositol. 1, 4, 5 triphosphate (IP3)

اینوزیتول ۱ و ۴ و ۵ تری‌فسفات

پیامبر ثانویه داخل سلولی که به وسیله شکستن لیپید غشایی فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ دی‌فسفات در پاسخ به تحریک گیرنده‌های سطح سلولی تولید می‌شوند. IP3 منجر به آزاد شدن Ca^{2+} ذخیره شده در شبکه آندوپلاسمی می‌شود و یکی از چندین فسفواینوزیتول‌های فعال بیوزیستی است. (شکل ۹ـ۱۵ و جدول ۳ـ۱۵)

هیبریدیزاسیون در جا In situ hibridization

هیبریدیزاسیون در جا، روشی برای تشخیص توالی‌های ویژه DNA و RNA در سلول‌ها و بافت‌ها به وسیله تیمار نمونه با پروب‌های تک زنجیره‌ای است که این پروب‌ها با توالی اختصاصی خود در نمونه هیبرید می‌شوند.

عایق Insulator

توالی خاصی از DNA که از رونویسی یک ژن در یک سمت عایق توسط تشدید کننده‌های رونویسی (که در سمت دیگر عایق

قرار دارند) جلوگیری می‌کند. بنابر این واکنش‌های نامناسب میان عناصر کنترل ژن‌های مجاور ایجاد نمی‌شود.

انسولین Insulin

هورمون پپتیدی که توسط سلول‌های β جزایر لانگرهانس تولید می‌شود و جذب گلوکز به داخل ماهیچه‌ها و سلول‌های چربی را افزایش می‌دهد. انسولین به همراه گلوکاگون سطح گلوکز خون را تنظیم می‌کند. انسولین به عنوان فاکتور رشد در بسیاری از سلول‌ها می‌باشد.

پروتئین غشایی اینتگرال Integral membrane protein

هر پروتئینی که دارای یک یا تعداد بخش‌های آبگریز می‌باشد. این بخش‌های آبگریز در مرکز دو لایه فسفولیپیدی قرار دارد. همچنین به آنها پروتئین گذرنده غشایی نیز می‌گویند.

اینتگرین Integrin

خانواده بزرگی از پروتئین‌های هترودیمری گذرنده غشایی که به عنوان گیرنده‌های اتصال عمل کرده و موجب اتصال سلول به ماده زمینه‌ای خارج سلولی شده یا به عنوان مولکول‌های اتصال سلولی باعث اتصال سلول به سلول می‌شود.

اینترفرون (IFN) (IFNs) Interferons

گروه کوچکی از سیتوکین‌ها که به گیرنده‌های سطح سلول هدف متصل شده و موجب تغییراتی در بیان ژن می‌شوند. این تغییرات منجر به یک حالت ضد ویروسی یا سایر پاسخ‌های سلولی مهم در سیستم ایمنی می‌شوند.

اینترلوکین‌ها (ILs) Interleukins

گروه بزرگی از سیتوکین‌ها که بعضی از آنها در پاسخ به التهاب آزاد می‌شوند و موجب تکثیر و عملکرد سلول‌های B تولیدکننده آنتی‌بادی در سیستم ایمنی می‌شوند.

رشته‌های حد واسط Intermediate filament

رشته‌های اسکلت سلولی (به قطر ۱۰ نانومتر) که به وسیله پلیمریزاسیون ویژه در هر بافت ایجاد می‌شود و شامل زیر واحدهای پروتئینی مثل کراتین‌ها، لامین‌ها و رشته‌های عصبی می‌باشند. (شکل ۱۸ـ۴۵ و جدول ۱ـ۱۸)

اینترفاز Interphase

دوره زمانی طولانی چرخه سلولی شامل مراحل G_1 و D و G_2، میان یک فاز میتوزی و فازمیتوزی بعدی. (شکل ۱۷ـ۱ و ۱ـ۲۰)

اینترون Intron

بخشی از یک رونوشت اولیه (یا بخشی از DNA که آن را رمزدهی می‌کند) که در پردازش RNA حذف شده و در mRNA عملکردی و rRNA و tRNAهای بالغ وجود ندارد.

در شرایط آزمایشگاهی Invitro

واکنش یا فرایندی که در یک محیط عاری از سلول صورت می‌گیرد. گاهی اوقات به منظور شناسایی سلول‌های تکثیر شده در محیط کشت از سلول‌های تکثیر شده در ارگانیسم استفاده می‌شود.

در داخل بدن موجود زنده Invivo

واکنش یا فرآیندی که در یک سلول یا ارگانیسم دست نخورده اتفاق می‌افتد.

میانکنش یونی Ionic interaction

پیوند غیر کوالان بین یون با بار مثبت (کاتیون) و یک یون با بار منفی (آنیون) که اغلب پیوند یونی نامیده می‌شود.

IP3 IP3

به اینوزیتول ۱ و ۴ و ۵ تری‌فسفات مراجعه شود.

ایزوفرم Isoform

یکی از چندین شکل پروتئین‌های مشابه که توالی اسید آمینه‌ای آنها اندکی با هم فرق دارد ولی عملکرد کلی آنها با هم مشابه است. ایزوفرم‌ها (هم‌ریخت‌ها) به وسیله ژن‌های مختلف یا یک ژن منفرد که رونوشت اولیه آن تحت تأثیر پیرایش متناوب قرار گرفته است، ایجاد می‌شوند.

ایزوتونیک Isotonic

در ارتباط با محلولی که غلظت مواد محلول موجود در آن به حدی نیست که باعث حرکت آب به داخل یا خارج سلول شود.

pH ایزوالکتریک pH Isoelectrec poit (PI)

محلولی که پروتئین حل شده یا مولکول‌های باردار دیگر در آن بار خنثی پیدا می‌کنند و بنابراین در میدان الکتریکی حرکت نمی‌کنند. (شکل ۳ـ۳۴)

K

کاریوفرین Karyopherin

خانواده‌ای از پروتئین‌های انتقالی هستند که به عنوان ایمپورتین و اکسپورتین یا هر دو صورت عمل می‌کنند. هر کاریوفرین به توالی سیگنال (نشانه) ویژه در پروتئین‌های محموله متصل می‌شوند و به داخل یا خارج هسته حرکت می‌کنند.

کاریوتیپ Karyotype

تعداد، اندازه و شکل‌هایی از مجموع کروموزوم‌های متافازی یک سلول یوکاریوتی.

کراتین Keratin

گروهی از پروتئین‌های رشته‌ای حدواسط که در سلول‌های اپی‌تلیال وجود دارند و داخل رشته‌های هتروپلیمری تجمع

می‌یابند.

Kilocalorie (KCal) **کیلوکالری**

به کالری مراجعه شود.

Kinase **کیناز**

آنزیمی که گروه فسفات انتهای ATP را به یک سوبسترا منتقل می‌کند. پروتئین کینازها فسفریله کننده سرین، ترئونین یا تیروزین‌های ویژه، نقش مهمی در تنظیم فعالیت بسیاری از پروتئین‌های سلولی دارند. همچنین به فسفاتاز مراجعه شود. (شکل ۳۳ـ۳)

Kinesin **کینزین**

گروهی از پروتئین‌های حرکتی که با استفاده از انرژی حاصل از ATP به سمت انتهای ریزلوله‌ها حرکت می‌کنند. کینزین‌ها می‌توانند وزیکول‌ها و اندامک‌ها را جابه‌جا کرده و در طی میتوز در حرکت کروموزوم‌ها نقش دارند. (شکل ۱۹ـ۱۸ تا ۲۱ـ۱۸)

Kinetic energy **انرژی جنبشی**

انرژی حرکتی مثل حرکت مولکول‌ها.

Kinetochore **کینه‌توکور**

ساختار پروتئینی چند لایه که در نزدیکی سانتروزوم هر کروموزوم میتوزی قرار داشته و از این منطقه ریزلوله‌ها به سمت قطبین دوک سلول امتداد یافته و نقش فعال در حرکت کروموزوم‌ها به قطبین دوک در طی آنافاز دارند. (شکل ۳۹ـ۱۸)

Km **Km**

پارامتری که نشان‌دهنده تمایل یک آنزیم برای سوبسترا می‌باشد و برابر با غلظت سوبسترا در نصف سرعت حداکثر واکنش است. همچنین به آن ثابت میکائیلیس نیز می‌گویند. پارامتر مشابه Km که نشان‌دهنده تمایل پروتئین انتقال‌دهنده به مولکول انتقالی و یا تمایل یک رسپتور به لیگاندش می‌باشد نیز وجود دارد.

Knockdown, siRNA **خاموش کردن siRNA**

روشی آزمایشگاهی برای جلوگیری از ترجمه mRNA ویژه که با استفاده از siRNA صورت می‌گیرد. این روش برای کاهش فعالیت یک پروتئین به ویژه در ارگانیسم‌هایی که پیرو روش‌های ژنتیکی کلاسیک برای جداکردن فقدان عمل جهش یافته‌ها نیستند، می‌باشد.

Knockout'gene **تخریب ژنی**

غیرفعال‌سازی انتخابی ژن ویژه با جایگزین کردن آن با یک آلل غیرعملکردی (مختل شده) در یک ارگانیسم طبیعی.

L

Lagging strand **رشته پیرو**

یکی از دو زنجیره DNA خواهری که در چنگال همانندسازی شکل می‌گیرند اینها قسمت‌های ناپیوسته می‌باشند (قطعات اوکازاکی) از جهت ′۵ به ′۳ ساخته شده، بعداً به هم متصل می‌شوند. همچنین به رشته پیرو مراجعه شود. (شکل ۳۰ـ۴)

Laminin **لامینین**

پروتئین هتروتریمری بزرگ ماتریکسی که در غشاء پایه یافت می‌شود.

Lateral **لاترال**

به بازولاترال مراجعه شود.

Lateral inhibition **مهار جانبی**

فرآیند مهم توسعه‌یافته به واسطه سیگنال است. این فرآیند منجر به ایجاد سرنوشت‌های مختلف سلول‌های مجاور شبیه به هم می‌شود.

Leading strand **رشته پیرو**

یکی از دو زنجیره DNA که در چنگال همانندسازی به وسیله سنتز پیوسته در جهت ۵ به ۳ تشکیل می‌شود. جهت سنتز رشته رهبر هم جهت با حرکت چنگالی همانندسازی می‌باشد. همچنین به رشته پیشرو مراجعه شود. (شکل ۳۰ـ۴)

Lectira **لکتین**

هر پروتئینی که محکم به قندها متصل می‌شود. لکتین‌ها به تاخوردن مناسب بعضی گلیکوپروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی کمک کرده و برای خالص‌سازی گلیکوپروتئین‌ها در کروماتوگرافی تمایلی استفاده می‌شود یا هیبریدیزاسیون در روش در جا به عنوان معرف شناسایی گلیکوپروتئین‌ها کاربرد دارند.

Leucin zipper **زیپ لوسین**

موتیف ساختاری مارپیچ که از دو مارپیچ α هومودیمر یا هترودیمر تشکیل شده است، که یک موتیف مشترک در بسیاری از فاکتورهای رونویسی یوکاریوتی می‌باشند. همچنین به کویل کویل مراجعه شود.

LINES (Long interspresed element)

عناصر طویل پراکنده

دسته‌ای از رتروترانسپوزون‌ها با طول ۶ کیلوباز که به ویژه در پستانداران فراوان هستند و تقریباً ۲۱٪ از کل DNA انسانی را تشکیل می‌دهند.

Linkage **پیوستگی**

در علم ژنتیک تمایل دو جایگاه مختلف روی کروموزوم‌های مشابه برای به ارث رسیدن همراه با هم. هر چه دو جایگاه به هم

نزدیک‌تر باشند فراوانی نوترکیبی میان آنها کمتر و پیوستگی بین آنها بیشتر می‌شود.

Lipid **لیپید**

هر مولکول آلی که نامحلول می‌باشد اما در حلال‌های آلی غیرقطبی حل می‌شود. کلاس‌های اصلی آن‌ها شامل اسیدهای چرب، استروئیدها وتری‌گلیسریدها می‌باشد.

Lipid - anchored membrane protein

پروتئین غشایی متصل به لیپید

هر پروتئینی که از طریق یک یا چند پیوند کووالان به گروه‌های لیپیدی موجود در دو لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی اتصال یابد.

Lipid raft **زفت لیپیدی**

دُمین‌های کوچک در غشا پلاسمایی که از کلسترول، اسفنگومیلین و پروتئین‌های کراتین غنی می‌باشند.

Lipoprotein **لیپوپروتئین**

هر پروتئین بزرگ محلول در آب و ترکیب لیپیدی که لیپیدها را به بدن متصل می‌کند. همچنین به لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم مراجعه شود. (LDL)

Liposome **لیپوزوم**

ساختار کروی شکل دو لایه فسفولیپیدی که درون آن آب وجود دارد و در محیط آزمایشگاهی از فسفولیپیدها و احتمالاً پروتئین‌های غشایی ساخته می‌شود.

Locus **جایگاه**

جایگاه به خصوص یک ژن روی یک کروموزوم. همه آلل‌های ویژه یک ژن جایگاه‌های ژنی مشابهی را اشغال می‌کنند.

Long terminal repeats (LTRs) تکرارهای انتهایی طویل

توالی تکراری مستقیم، که بیشتر از ۶۰۰ جفت باز داشته و در طرفین مناطق رمزدهی کننده DNA رترو ویروسی الحاق شده و در رتروترانسپوزون‌های ویروسی قرار دارد.

Low density lipoprotein (LDL)

لیپوپروتئین‌های با چگالی کم

لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم: یک گروه از لیپوپروتئین‌ها شامل آپولیپوپروتئین ۱۰۰ ـ B که یک ناقل اصلی کلسترول در تشکیل استرهای کلستریل در بافت‌ها، به ویژه در کبد می‌باشد.

Lumen **لومن**

فضای داخل ساختار لوله‌ای (مثل رگ یا روده) یا حجم داخلی از یک ترکیب متصل به غشاء در یک سلول.

Lymphocytes **لمفوسیت**

دو دسته از سلول‌های سفید خون که مولکول‌های بیگانه (آنتی‌ژن‌ها) را تشخیص داده و در پاسخ ایمنی شرکت می‌کنند. لمفوسیت‌های B (سلول‌های B) مسؤول نابودسازی سلول‌های آلوده به باکتری‌ها، ویروس‌ها، سلول‌های بیگانه و سلول‌های سرطانی می‌باشند.

Lysis **لیز شدن**

نابودی یک سلول به وسیله شکستن غشای پلاسمایی و آزاد شدن محتویات آن.

Lysogeny **لیزوژنی**

پدیده‌ای که در آن DNA ویروس در سلول باکتری (باکتریوفاژ) وارد ژنوم سلول میزبان می‌شود و همراه با DNA باکتری همانندسازی شده ولی بیان نمی‌شود. فعال‌سازی بعدی منجر به شکل‌گیری ذرات ویروسی جدید شده و در نهایت موجب لیز سلول می‌شود.

Lysosome **لیزوزوم**

اندامک کوچک که دارای pH داخلی ۴.۵ بوده و شامل آنزیم‌های هیدرولیزکننده می‌باشد و در تجزیه مواد وارد شده به وسیله آندوسیتوز و اجزاء سلولی در خودخواری نقش دارد.

M

M (mitotic) phase **مرحله میتوزی**

به چرخه سلولی مراجعه شود.

Macromolecule **مولکول بزرگ**

هر مولکول پلیمری بزرگ (مثل اسیدنوکلئیک، پلی‌ساکارید، پروتئین) که دارای جرم مولکولی بیش از چند هزار دالتون می‌باشد.

Macrophage **ماکروفاژ**

لکوسیت‌های فاگوسیتوزکننده که پاتوژن‌ها را از طریق گیرنده‌های شبیه Toll (Toll - Like receptor) تشخیص می‌دهند. آنها به عنوان سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن می‌باشند و منبع اصلی تولید سیتوکین هستند.

Major histocompatibility complex (MHC)

کمپلکس سازگاری بافتی

یک سری از ژن‌های مجاور (همسایه) که مولکول‌های MHC دسته I و II و دیگر پروتئین‌ها را رمزدهی می‌کنند. برای ارائه آنتی‌ژن همچنین بعضی پروتئین‌های کمپلمان ضروری می‌باشند. ترکیب در موش و انسان HLA نامیده می‌شود.

Malignant **بدخیم**

در ارتباط با تومور یا سلول‌های توموری که به بافت‌های

طبیعی اطراف خود حمله می‌کنند و متاستاز انجام می‌دهند. همچنین به خوش‌خیم مراجعه شود.

MAP کیناز **MAP Kinase**

خانواده‌ای از پروتئینی کینازهایی که در پاسخ به تحریک سلول به وسیله فاکتورهای رشد مختلف فعال می‌شوند و با فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی ویژه و پروتئین‌های هدف دیگر باعث پاسخ سلولی می‌شوند. (شکل ۲۶ـ۱۶ و ۲۷ـ۱۶)

سرعت حداکثر **Maximal velocity**

سرعت حداکثر، به Vmax مراجعه شود.

حس‌گرهای مکانیکی **Mechanosensor**

هر یک از چندین نوع ساختارهای حسی که در بافت‌های مختلف جای دارند و به تماس‌های محیطی و حرکت‌های دست و پا و سر، در دو دما پاسخ می‌دهند.

میانجی **Mediator**

ترکیب چند پروتئین بسیار بزرگ که یک پل مولکولی میان فعال‌کننده‌های رونویسی متصل شده به یک تشدیدکننده و RNA پلیمراز II در یک پروموتر تشکیل می‌دهند. به عنوان یک فعال‌کننده در تحریک رونویسی عمل می‌کند. (شکل ۴۱ـ۷ و ۴۲ـ۷)

میوز **Meiosis**

نوع خاصی از تقسیم سلولی در یوکاریوت‌ها که طی بلوغ سلول‌های زاینده اتفاق می‌افتد و شامل دو مرحله تقسیم هسته و سیتوپلاسم است. دارای یک مرحله از همانندسازی DNA بوده و منجر به تشکیل چهار سلول هاپلوئید (گامت‌ها) از یک سلول دیپلوئید می‌شود. (شکل ۳ـ۵)

پتانسیل غشایی **Membrane potential**

تفاوت پتانسیل الکتریکی در دو سوی غشاء که به واسطه فزونی یون‌های مثبت (کاتیون‌ها) در یک سمت غشاء و یون‌های منفی (آنیون‌ها) در سمت دیگر غشاء ایجاد می‌شود. (شکل ۱۷ـ۱۱ و ۱۸ـ۱۱)

پروتئین ناقل غشاء **Membrane transport protein**

واژه‌ای کلی برای هر پروتئین اینتگرال غشا که تحرک یک یا چندین یون ویژه یا مولکول‌های کوچک از غشاء سلولی را بدون توجه به مکانیسم انتقالی، انجام می‌دهد.

مریستم **Meristem**

گروه سازمان یافته غیر تمایزی از سلول‌های تقسیم شونده که در نوک ساقه و ریشه‌های در حال رشد گیاهان حفظ می‌شوند. همه بافت‌های بالغ از مریستم منشاء می‌گیرند.

مزانشیم **Mesenchyme**

بافت پیوندی جنین نابالغ که از سلول‌های سازمان یافته و سلول‌های متصل به حالت سست تشکیل شده است و از مزودرم و اکتودرم در جانوران مشتق می‌شود.

مزودرم **Mesoderm**

لایه میانی از سه لایه اصلی جنینی جانوران که بین اکتودرم و اندودرم قرار دارد و منشاء نوتوکرود، بافت‌های پیوندی، ماهیچه، خون و دیگر بافت‌ها می‌باشد. (شکل ۳ـ۲۱ و ۱۱ـ۲۲)

RNA پیک **Messenger RAN**

به mRNA مراجعه شود.

متافاز **Metaphase**

مرحله‌ای از میتوز که در آن کروموزوم‌ها متراکم‌اند و به دوک میتوز در قسمت استوایی آن متصل می‌شوند اما هنوز جداسازی آن به سمت قطبین دوک شروع نشده است. (شکل ۳۴ـ۱۸)

متاستاز **Metastasis**

انتشار سلول‌های سرطانی از محل منشاءشان و استقرار آنها در جایگاه‌های ثانویه رشد.

MHC **MHC**

به ترکیب اصلی سازگاری بافتی مراجعه شود.

مولکول MHC **MHC molecule**

گلیکوپروتئینی که پپتیدهای مشتق از پروتئین‌های بیگانه و خودی روی سطح سلول را ارائه می‌دهد و برای ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های T ضروری می‌باشد دسته MHCI تقریباً در همه سلول‌های هسته‌دار بیان می‌شود. مولکول دسته MHCII در سطح سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن بیان می‌گردد. (شکل ۲۳ـ۲۴ و ۲۴ـ۲۴)

میسل **Micelle**

تجمع کروی از فسفولیپیدهای محلول در آب یا مولکول‌های آمفی‌پاتیک دیگر، که خودبه‌خودی در محلول آبی تشکیل می‌گردند. (شکل ۶ـ۱۰c)

ثابت میکائیلیس **Michaelis constart**

ثابت میکائیلیس؛ به Km مراجعه شود.

ریزرشته **Microfilament**

رشته‌های اسکلت سلولی (با قطر ۷ نانومتر) که به وسیله پلیمریزه شدن اکتین کروی (G) ایجاد می‌شوند. همچنین به آنها رشته‌های اکتین نیز می‌گویند. ریزرشته‌ها در انقباض ماهیچه‌ها، سیتوکینز، حرکت سلول و سایر عملکردهای سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند.

RNA کوچک **Micro RNA**

به mRNA مراجعه شود.

ریزلوله **Microtubule**

رشته‌های اسکلت سلولی (با قطر ۲۵ نانومتر) که به وسیله پلیمریزه شدن مونومرهای توبولین α و β شکل می‌گیرند و دارای قطبیت ساختاری و عملکردی هستند. ریزلوله‌ها از اجزاء اصلی مژه، تاژک، دوک میتوزی و سایر ساختارهای سلولی می‌باشند. (شکل ۱۸ـ۲ و ۱۸ـ۳)

Microtubule - associated Protein (MAP)

پروتئین‌های متصل به ریزلوله (MAP)

هر پروتئینی که به ریزلوله‌ها متصل شده و پایداری آنها را تنظیم می‌کنند. (شکل ۱۸ـ۱۴ و ۱۸ـ۱۵)

Microtubnle organizing center

مرکز سازماندهی ریزلوله‌ها

به MTOC مراجعه شود.

میکروویلی **Microvillus (microvilli)**

برآمدگی‌های کوچک پوشش‌دهنده غشاء در سطح سلول‌های جانوری که شامل مرکزی از رشته‌های اکتین می‌باشند. میکروویلی‌های زیادی در سطح جذبی سلول‌های اپی‌تلیال روده وجود دارند. این میکروویلی‌ها سطح جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهند. (شکل ۱۷ـ۴ و ۱۹ـ۹)

RNA کوچک **Micro RNA , miRNA**

هر یک از RNAهای داخل سلولی کوچک که دارای ۳۰ـ۲۰ نوکلئوتید هستند و از نواحی دو رشته‌ای با ساختارهای ثانویه سنجاق سر در RNA طویل اولیه تشکیل شده‌اند. یک رشته از miRNA بالغ متصل شده و یک ترکیب RNA القاءکننده خاموشی (RISC) ایجاد می‌شود. این ترکیب از ترجمه mRNA هدف هیبرید شده به چندین پروتئین به طور ناقص با miRNA جلوگیری می‌کند. چندین miRNA باید با یک mRNA منفرد دو رشته شوند تا از ترجمه آن جلوگیری به عمل آورند. همچنین به siRNA مراجعه شود (شکل ۸ـ۲۵ و ۸ـ۲۶)

میتوکندری **Mitochondrion (mitochondria)**

یک اندامک بزرگ که توسط غشاء فسفولیپیدی دولایه احاطه شده و حاوی DNA بوده و فسفریلاسیون اکسیداتیو را انجام می‌دهد که به موجب آن بیشترین ATP در یوکاریوت‌ها تولید می‌شود. (شکل ۸ـ۹ و ۱۲ـ۶)

میتوژن **Mitogen**

فرآیندی در سلول‌های یوکاریوتی که به موجب آن هسته تقسیم شده و دو هسته خواهری مشابه با کروموزوم‌های دیپلوئید تولید می‌کند. همچنین به سیتوکینتر و میوز مراجعه شود. (شکل ۱۸ـ۳۴)

عامل پیش برنده میتوز **Mitosis - promoting factor**

به MPF مراجعه شود.

دوک میتوزی **Mitotic spindle**

ساختار موقتی تخصص یافته که طی میتوز در سلول‌های یوکاریوت ایجاد می‌شود و کروموزوم‌ها روی آن قرار گرفته و آنها را به قطب‌های مختلف سلول تقسیم شده، حرکت می‌دهد. همچنین دستگاه میتوزی نیز نامیده می‌شود. (شکل ۱۸ـ۳۶)

عنصر متحرک DNA **Mobile DNA element**

به عناصر قابل انتقال DNA مراجعه شود.

چاپرون مولکولی **Molecular chaperone**

به چاپرون مراجعه شود.

مکمل شدن مولکولی **Molecular compementry**

نوع تناسب قفل و کلید میان اشکال، بارها، آبدوستی و یا دیگر خصوصیات فیزیکی دو مولکول یا دو پروتئین که چندین واکنش غیرکووالان میان آنها برای نزدیک‌تر کردن‌شان شکل می‌گیرد.

Molecular markers, DNA based

مولکول‌های مارکر بر اساس DNA

توالی‌های DNA که بین گونه‌های یکسان موجودات زنده متنوع می‌باشند (چندشکلی DNA) و در مطالعات پیوستگی در علم ژنتیک مفید هستند و شامل RFLPها می‌باشند.

آنتی‌بادی مونوکلونال **Monocloral ontibody**

آنتی‌بادی که به وسیله یک سلول B تولید می‌شود بنابراین این پروتئین هموژن یک آنتی‌ژن منفرد و اختصاصی (اپی‌توپ) را تشخیص می‌دهد و می‌تواند به طور آزمایشگاهی با استفاده از هیبریدوما تولید گردد.

مونومر **Monomer**

هر مولکولی که به طور شیمیایی به سایر مولکول‌های مشابه خود متصل شده و یک پلیمر را شکل می‌دهد مثل اسید آمینه، نوکلئوتیدها و مونوساکاریدها.

مونوساکارید **Monosaccharide**

هر قند ساده با فرمول $(CH_2O)_n$ که در آن n=۳-۷ می‌باشد.

مورفوژن (ریخت‌زا) **Morphogen**

یک مولکول سیگنال که هویت یک سلول را در طی تمایز مشخص می‌کند. این کار با توجه به غلظت این مولکول انجام می‌گیرد.

موتیف ساختاری **Motif, structural**

ترکیب ساختاری سه‌بعدی و دوبعدی در پروتئین‌ها که اغلب

به وسیله توالی اسید آمینه‌ای ویژه ایجاد می‌شود. همچنین آن را تاخوردگی ساختاری نیز می‌نامند. یک موتیف ساختاری دارای یک ساختار سه‌بعدی ویژه بوده و اغلب عملکرد بخصوصی را انجام می‌دهد.

پروتئین حرکتی **Motor protein**

عضوی از دسته به خصوص آنزیم‌های مکانو شیمیایی که از انرژی هیدرولیز ATP، برای حرکت خطی یا چرخشی استفاده می‌کنند. همچنین به آنها حرکت‌دهنده‌های مولکولی نیز می‌گویند. همچنین به داینئین، کینزین و میوزین مراجعه شود.

MPF (mitosis - promoting factor)

عامل پیش برنده میتوزی

پروتئین هترودیمری که از سیکلین میتوزی و کیناز وابسته به سیکلین (CDK تشکیل شده و باعث ورود سلول به میتوز و به وسیله فسفریلاسیون پروتئین‌های به خصوص می‌شود.

mRNA پیک **mRNA (messenger RNA)**

هر RNA که ترتیب اسیدهای آمینه را در پروتئین مشخص می‌کند (مثل ساختار اولیه) و به وسیله رونویسی DNA به واسطه آنزیم RNA پلیمراز تولید می‌شود. در یوکاریوت‌ها آغاز تولید RNA (رونوشت اولیه) تحت تأثیر پردازش برای ایجاد mRNA بالغ قرار می‌گیرد. همچنین به ترجمه مراجعه شود. (شکل ۱۵ـ۱۴)

mRNA خارج‌کننده **mRNA - exporter**

پروتئین هترودیمری که به mRNA حاوی ذرات ریبونوکلئوپروتئین‌ها (mRNPS) متصل شده و آن را از هسته سیتوپلاسم به وسیله واکنش با نوکلئوپورین‌ها به صورت گذرا در کمپلکس منافذ هسته‌ای انتقال می‌دهد. (شکل ۲۲ـ۱۸)

MTOC (microtubule - organizing center)

مرکز سازماندهی ریزلوله‌ها

واژه عمومی برای هر ساختاری مثل سانتروزوم، دوک قطبی و جسم پایه که ریزلوله‌ها را در سلول‌ها شکل می‌دهد. (شکل ۵ـ۱۸)

Multiadhesive matrix proteins

پروتیئن‌های چنداتصالی ماتریکس

گروهی از پروتئین‌های طویل انعطاف‌پذیر که به ترکیبات دیگر ماده زمینه‌ای خارج سلولی و گیرنده‌های سطح سلولی متصل می‌شوند و بنابراین اجزاء ماتریکس را به غشاء سلولی متصل می‌کنند. مثال‌هایی از این پروتئین‌ها، لامینین یک ترکیب اصلی غشاء پایه و فیبرونکتین که در بسیاری از بافت‌ها وجود دارد، می‌باشد.

چندزیرواحدی **Multimeric**

پروتئین‌هایی که شامل چند زنجیره پلی‌پپتیدی (یا زیرواحد) می‌باشند.

جهش‌زا **Mutagen**

ماده شیمیایی یا فیزیکی که القاءکننده جهش می‌باشد.

جهش **Mutation**

تغییر وراثتی پایدار در توالی نوکلئوتید یک کروموزوم و اغلب در یک ژن که معمولاً منجر به تغییر در عملکرد محصول ژن می‌شود.

غلاف میلین **Myelin sheath**

غشاء سلولی تخصص یافته و توده‌ای شکل که یک لایه عایق اطراف اکسون مهره‌داران تشکیل داده و سرعت هدایت پیام‌های عصبی را افزایش می‌دهد. (شکل ۱۵ـ۳)

میوفیبریل **Myofibril**

یک ساختار بلند در سیتوپلاسم سلول‌های ماهیچه‌ای شامل ردیف تکراری منظم از سارکومرها که از رشته‌های ضخیم (میوزین) و رشته‌های نازک (اکتین) تشکیل شده‌اند. (شکل ۳۹ـ۱۷)

میوزین‌ها **Myosins**

دسته‌ای از پروتئین‌های حرکتی که با تحریک اکتین، دارای فعالیت ATP آزی می‌شوند. میوزین‌ها به هنگام انقباض ماهیچه و سیتوکینز و همچنین به هنگام جابه‌جایی وزیکول‌ها در طول رشته‌های اکتین حرکت می‌کنند.

N

NAD^+ (nicotinamide adenine dinocleotile)

NAD^+ (نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید)

مولکولی آلی کوچک که به عنوان ناقل الکترون به کار می‌رود و این عمل را به وسیله پذیرفتن دو الکترون از یک مولکول‌دهنده و یک H^+ محلول انجام می‌دهد. (شکل ۳۳aـ۲)

$NADP^+$ (nicotinamide adenine NAD dinocleotide phosphate)

$NADP^+$ (نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات)

شکل فسفری NAD^+ که به صورت ممتد در طی فتوسنتز به عنوان یک ناقل الکترون در مسیر بیوسنتزی عمل می‌کند.

Na^+/K^+ ATP ase

$ATP - Na^+/K^+$ از

یک پمپ ATP آز که با هیدرولیز ATP برای خارج ساختن یون‌های Na^+ و داخل نمودن یون‌های K^+ جفت می‌شود و به طور گسترده مسئول حفظ غلظت داخل سلولی Na^+ (کم) و K^+

(زیاد) در سلول‌های جانوران می‌باشد. اغلب پمپ سدیم پتاسیم نامیده می‌شود. (شکل ۱۲ـ۱۱)

سلول‌های کشنده طبیعی Natural Killer (NK) cells

سلول‌های کشنده طبیعی: اجزاء سیستم ایمنی ذاتی که به طور غیراختصاصی سلول‌های آلوده به ویروس و سلول‌های توموری را تشکیل داده و آنها را از بین می‌برند. (شکل ۵ـ۲۴)

نکروز Necrosis

مرگ سلولی در نتیجه آسیب بافتی یا سایر امراض است و معمولاً با تورم و ترکیدن سلول و آزاد شدن محتویات آن مشخص می‌شود. در مقایسه با آپوپتوز به کار می‌رود.

رشته‌های عصبی Neurofilaments (NFs)

گروهی از پروتئین‌های رشته‌ای حدواسط که فقط در نورون‌ها وجود دارند و در ساختار اکسونی و سرعت دادن به انتقال پتانسیل عمل در جهت اکسونی شرکت می‌کنند.

نورون (سلول عصبی) Neuron (nerve cell)

هر کدام از سلول‌هایی که پیام‌های عصبی را در سیستم عصبی هدایت می‌کنند، یک نورون شامل جسم سلولی، تعدادی زائده‌های کوچک منشعب (دندریت‌ها) و یک زائده طویل (اکسون) می‌باشد. (شکل ۱ـ۲۳ و ۲ـ۲۳)

میانجی عصبی Neuro transmitter

مولکول سیگنال‌دهی خارج سلولی که توسط نورون پیش‌سیناپسی در یک سیناپس شیمیایی آزاد شده و یک سیگنال به نورون پس‌سیناپسی منتقل می‌کند. پاسخی که به وسیله میانجی عصبی تحریک می‌شود شامل پاسخ‌های تحریکی یا مهاری است و توسط گیرنده‌های پس‌سیناپسی سلول تشخیص داده می‌شوند. (شکل ۱۹ـ۲۳ و ۲۰ـ۲۳)

نوروتروفین Neurotrophin

خانواده‌ای از فاکتورهای تروفیکی ساختاری و عملکردی که به گیرنده‌های TRKs متصل شده و برای حیات نورون‌ها ضروری هستند و شامل فاکتور رشد عصبی (NGF) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) می‌باشد.

نورولاسیون Neurolation

شکل‌گیری لوله عصبی به وسیله تاخوردن صفحه عصبی، در جنین مهره‌داران و بخشی از اکتودرم که به ساختار عصبی تمایز می‌یابد.

نوتروفیل Neutrophils

لکوسیت‌های فاگوسیتوزکننده که به سمت بافت آسیب‌دیده جذب شده و به طرف آن حرکت می‌کنند. نوتروفیل‌های فعال شده سیتوکین‌ها و آنزیم‌های کشنده باکتری‌ها (مثل لیزوزیم) و دیگر محصولاتی را ترشح می‌کنند. این محصولات در التهاب شرکت کرده و به پاک‌سازی پاتوژن‌های مهاجم کمک می‌کنند.

Nicotinamide adenine dinocleotid

نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید

به NAD^+ مراجعه شود.

Nicotin amid adenine dinocleutide phosphate

نیکوتین آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید فسفات

به $NADP^+$ مراجعه شود.

الیگوساکاریدهای متصل به N N- Linked oligosaccharide

زنجیره الیگوساکاریدهای منشعب که به زنجیره جانبی گروه اسید آمینه‌ای از یک آسپاراژین در یک گلیکوپروتئین متصل می‌شود. همچنین به الیگوساکارید متصل به O مراجعه شود.

نوسیسپتور Nociceptor

حس‌گرهای مکانیکی که به درد مرتبط با بافت صدمه دیده بدن پاسخ می‌دهند و به وسیله ترومای مکانیکی، تب، الکتریسته شدن (برق) پاسخ‌های شیمیایی ایجاد می‌شوند.

میانکنش‌های غیرکووالان Noncovalunt interaction

هر واکنش شیمیایی نسبتاً ضعیف که در آن الکترونی به اشتراک گذارده نمی‌شود. (شکل ۶ـ۲ و ۱۲ـ۲)

غیرقطبی Nonpolar

در ارتباط با مولکول یا ساختاری که فاقد هر بارالکتریکی یا توزیع نامتقارن بارهای مثبت و منفی می‌باشد. به طور کلی مولکول‌های غیرقطبی کمتر از مولکول‌های قطبی در آب حل می‌شوند و اغلب در آب نامحلول می‌باشند.

لکه‌گذاری نورتون Northern blotting

روشی برای تشخیص RNAهای ویژه که به وسیله الکتروفورز تفکیک شده‌اند. این کار با هیبریدسازی RNA مورد نظر با یک پروب نشاندار DNA صورت می‌گیرد همچنین به لکه گذاری ساترن مراجعه شود. (شکل ۲۷ـ۵)

جسم هسته‌ای Nuclear body

ناحیه کروی و سخت تخصص یافته عملکردی در هسته که شامل پروتئین‌های ویژه RNAها می‌باشد و در تجمع کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین‌ها (RNP) عمل کرده و بیشترین نوع شاخص جسم هسته‌ای و هستک‌ها می‌باشند.

پاکت هسته‌ای Nuclear envelop

ساختار دولایه غشایی که اطراف هسته را احاطه می‌کند. غشاء خارجی به شبکه آندوپلاسمی متصل می‌شود و دولایه غشاء با کمپلکس منافذ هسته‌ای روزن‌دار (متخلخل) می‌شوند. (شکل ۱ـ۹)

لامین هسته‌ای **Nuclear lamina**

شبکه رشته‌ای در سطح داخلی غشاء هسته که از رشته‌های حدواسط لامین تشکیل شده‌است. (شکل ۱۶ـ۲۰)

کمپلکس منفذ هسته‌ای **Nuclear pore complex (NPC)**

ساختار چند پروتئینی بزرگ که به مقدار زیاد از نوکلئوپورین‌ها تشکیل شده و در عرض دولایه پوشش غشایی هسته امتداد می‌یابد. یون‌ها و مولکول‌های کوچک از طریق NPCها انتشار می‌یابند و ریبونوکلئوپروتئین‌ها به صورت انتخابی از طریق NPCها با کمک پروتئین‌های محلول منتقل می‌شوند. (شکل ۱۳ـ۳۲)

گیرنده هسته **Nuclear receptor**

عضوی از یک دسته گیرنده‌های داخل سلولی که به مولکول‌های محلول در لیپید (مثل هورمون‌های استروئید) متصل می‌شوند. تشکیل کمپلکس‌های گیرنده لیگاند، رونویسی را فعال می‌کند. همچنین ابرخانواده گیرنده استروئید نامیده می‌شود. (شکل ۷ـ۵۰)

اسید نوکلئیک **Nucleic acid**

یک پلیمری از نوکلئوتیدهای متصل به هم از طریق پیوندهای فسفودی‌استری DNA و RNA از اسیدهای نوکلئیک اصلی در سلول‌ها هستند.

نوکلئوکپسید **Nucleocapside**

کپسید ویروسی اسیدنوکلئیک.

هستک **Nuclealus**

ساختار بزرگ در هسته سلول‌های یوکاریوتی بوده و سنتز و پردازش RNA در هستک و زیرواحدهای ریبوزوم‌ها در آنجا جمع می‌شوند.

نوکلئوپورین‌ها **Nucleoporins**

گروه بزرگی از پروتئین‌ها که کمپلکس منفذ هسته‌ای را می‌سازند. یک دسته (نوکلئوپروتئین FG) در ورود و خروج هسته‌ای شرکت می‌کند.

نوکلئوزید **Nucleosid**

یک مولکول کوچک که از بازپورین یا پیریمیدین متصل به پنتوز (ریبوز یا داکسی‌ریبوز) تشکیل شده است.

نوکلئوزوم **Nucleosome**

واحد ساختاری کروماتین شامل یک مرکز صفحه‌ای شکل از پروتئین‌های هیستون که قطعه‌ای به طول ۱۴۷ جفت باز از DNA به دور آن پیچ خورده است. (شکل ۲۹ـ۶)

نوکلئوتید **Nucleotid**

یک نوکلئوزید با یک یا چند گروه فسفات که به وسیله پیوند استری به قسمت قندی و به طور کلی به قسمت '۵ مولکول قند متصل شده است. DNA و RNA پلیمرهایی از نوکلئوتیدها هستند و به ترتیب شامل داکسی‌ریبوز و ریبوز می‌باشند. (شکل ۱۶ـ۲ و جدول (۳ـ۲)

هسته **Nucleus**

اندامک غشاءدار بزرگی در سلول‌های یوکاریوتی که حاوی DNA سازنده ریبوزوم است. سنتز پردازش RNA و جمع شدن ریبوزوم‌ها در هسته اتفاق می‌افتد.

O

قطعات اوکازاکی **Okazaki fragment**

قطعات DNA (کمتر از ۱۰۰۰ باز) کمک رشته‌ای کوچکی که در طی سنتز رشته پیرو در همانندسازی DNA شکل می‌گیرند و به سرعت به وسیله DNA لیگاز به هم متصل می‌شوند تا یک زنجیره ممتد DNA تولید کنند. (شکل ۳۰ـ۴)

الیگوپپتید **Oligopeptide**

یک پلیمر خطی کوچک با اندازه متوسط که از اسیدهای آمینه تشکیل شده و به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل شده‌اند. واژه‌های پپتید و الیگوپپتید اغلب به طور مترادف استفاده می‌شوند.

الیگوساکارید متصل به O **O- Linked oligosaccharid**

زنجیره الیگوساکارید که به گروه هیدروکسیل یک سرین پاترئونین در یک گلیکوپروتئین متصل می‌شود. همچنین به الیگوساکارید متصل به N مراجعه شود.

انکوژن **Oncogene**

ژنی که محصول آن در تبدیل سلول‌ها در محیط کشت یا در القای سرطان در جانور دخیل است. اغلب ژن‌های توموری، شکل جهش یافته یک ژن طبیعی می‌باشند. (پیش ژن توموری یا پروترانکوژن در کنترل فرآیندهای تقسیم سلولی یا رشد سلول دخیل می‌باشند. (شکل ۱۱ـ۲۵)

پروتئین توموری **Oncoprotein**

پروتئینی که توسط انکوژن رمزدهی می‌شود موجب تکثیر غیرطبیعی سلولی می‌گردد و ممکن است شکل جهش یافته از یک پروتئین طبیعی غیرتنظیمی یا یک پروتئین طبیعی باشد که به فراوانی در زمان یا مکان اشتباه در یک ارگانیسم تولید می‌شود.

قالب خواندن **Open reading frame (ORF)**

مناطقی از توالی DNA که به وسیله کدون پایان در یکی از قالب‌های خواندن نوکلئوتیدهای سه‌تایی قطع نشده است. یک ORF با یک کدون شروع آغاز شده و تقریباً به تعداد ۱۰۰ کدون

که به احتمال زیاد یک پروتئین را رمزدهی می‌کنند، امتداد می‌یابد.

اپراتور **Operator**

توالی کوچک DNA در هر ژن یک باکتری یا باکتریوفاژ که به یک گیرنده پروتئینی متصل شده و رونویسی ژن‌های مجاور را کنترل می‌کند.

اپرون **Operon**

ناحیه‌ای شامل ژن‌های متصل به هم در DNA باکتریایی که به واسطه یک اپراتور رونویسی می‌شوند و از رونویسی آن یک mRNA شامل توالی رمزدهی کننده چند پروتئینی ایجاد می‌شود. (شکل ۱۳a-۴)

اندامک **Organelle**

هر ساختار دارای غشاء که در سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند. (شکل ۲b-۱ و ۱-۹)

اندام کورتی **Organ of corti**

ساختار حسی آکوستیک که در حلزون گوش داخلی قرار داشته و از سلول‌های مویی تشکیل شده است. این ساختارها حرکت مکانیکی حاصل از ایجاد صدا را به پیام‌های الکتریکی تبدیل می‌کنند. این حس‌گرها به عنوان میکروفن (دستگاه انتقال صدای بدن) در بدن می‌باشند.

اسمز **Osmosis**

حرکت آب از یک غشاء نیمه تراوا که (نفوذپذیر نسبت به آب نه به محلول‌ها) از محلولی با غلظت کمتر به سمت محلولی با غلظت بیشتر انجام می‌شود. (شکل ۶-۱۱)

اکسیداسیون **Oxidation**

از دست دادن الکترون‌های یک اتم هنگامی که یک اتم هیدروژن از یک مولکول حذف یا اکسیژن اضافه می‌شود. متضاد احیاء.

پتانسیل اکسیداسیون **Oxidation potential**

تغییر ولتاژ هنگامی که یک اتم یا مولکول یک الکترون را از دست می‌دهد، یا میزان تمایل یک مولکول برای از دست دادن یک الکترون. برای انجام یک واکنش اکسیداسیون (رفت) پتانسیل اکسیداسیون مقدار یکسانی (یکنواختی) دارد اما در واکنش برگشت (احیاء) پتانسیل احیاء ایجاد شده، مقدار عکس واکنش رفت را دارد.

فسفریلاسیون اکسیداتیو **Oxidative phosphorylation**

فسفریلاسیون ADP به منظور ایجاد ATP که به وسیله انتقال الکترون‌ها به اکسیژن (O_2) در باکتری و میتوکندری صورت می‌گیرد. این فرآیند شامل تولید شیب پروتونی طی انتقال الکترون بوده و در پی آن از این شیب به منظور تولید ATP استفاده می‌شود.

P

پروتئین p53 **p53 protein**

محصول ژن مهارکننده توموری است و در جلوگیری از آسیب DNA سلول‌ها نقش مهمی دارد. جهش غیرفعال در ژن p53 در بسیاری از سرطان‌های انسانی ایجاد می‌شود. (شکل ۲۶-۲۵)

ژن‌های pair - rules **Pair - rule genes**

یک گروه از ژن‌ها که در نوارهای متناوب در طول محور قدامی، خلفی جنین اولیه دروزوفیلا بیان می‌شوند. همه آنها فاکتورهای رونویسی را رمزدهی کرده و همراه با ژن‌های gap و ژن‌های segment - polarity در ایجاد قطعات بندی در حشرات عمل می‌کنند. (شکل ۲۷c-۲۲)

پاراکرین **Paracrine**

در ارتباط با مکانیسم سیگنال‌دهی بوده و در آن سلول هدف به یک مولکول سیگنال (مثل فاکتور رشد و میانجی عصبی) که به وسیله سلول‌های نزدیک تولید شده و با انتشار به سلول هدف می‌رسند، پاسخ می‌دهند.

تکه ـ نگهداری **Patchclamping**

روشی برای شناسایی جریان یون‌ها از طریق یک کانال یونی یا از کل غشاء سلولی با استفاده از یک میکروپیپت. از نوک میکروپیپت برای گرفتن قطعه‌ای کوچک از غشاء سلولی استفاده می‌گردد. (شکل ۲۱-۱۱)

تشکیل الگو **Pattern formation**

فرآیند سازمان‌یابی سلول‌ها، اندام‌ها و بافت‌های یک جنین تمایز یافته به الگوهای منظم ویژه مثل استخوان‌های دست یا نقش و نگار روی بال پروانه.

جسم P **P body**

دُمین سیتوپلاسمی فشرده که حاوی ریبوزوم و فاکتورهای ترجمه نیست و در مهار ترجمه و تجزیه mRNA نقش دارد. همچنین آن را جسم پردازش‌کننده RNA سیتوپلاسمی نیز می‌نامند.

PCR (polymerase chain reaction

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

روشی برای تکثیر قطعه به خصوص از DNA است. این قطعات به وسیله چندین چرخه سنتز DNA از پرایمرهای الیگونوکلئوتید کوچک ساخته می‌شوند. در این روش از گرمای مختصری برای جدا کردن زنجیره‌های مکمل استفاده می‌شود. (شکل ۲۳-۵)

پنتوز **Pentose**

مونوساکارید ۵ کربنه. ریبوز و داکسی ریبوز به ترتیب در RNA و DNA وجود دارند. (شکل ۱۶ـ۲)

پپتید **Peptide**

پلیمر خطی کوچک از اسیدهای آمینه که به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل هستند. واژه پپتید و الیگوپپتید به طور مترادف استفاده می‌شوند. به پلی‌پپتید نیز مراجعه شود.

پیوند پپتیدی **Peptid bond**

پیوندی کووالان که اسیدهای آمینه را به هم متصل می‌کند. این پیوند با واکنش بین گروه‌های آمین و کربوکسیل در اسیدآمینه مجاور شکل می‌گیرد و یک مولکول آب نیز رها می‌گردد (دهیدراسیون). (شکل ۱۳ـ۲)

Peripheral membrane protein

پروتئین‌های محیطی غشا

هر پروتئینی که با سطح سیتوپلاسمی یا سیتوزولی غشا پیوند می‌یابد اما وارد بخش آبگریز دو لایه غشاء نمی‌شود. همچنین به پروتئین‌های غشایی اینتگرال مراجعه شود. (شکل ۱ـ۱۰)

پرلکان **Perlecan**

یک پروتوگلیکان چنددُمینی بزرگ که از ترکیبات ماتریکسی خارج سلولی (ECM) بوده و به اجزا ECM مثل فاکتورهای رشد و مولکول‌های سطح سلولی متصل می‌شوند. پرلکان از ترکیبات اصلی غشاء پایه است.

پراکسیزوم **Peroxisome**

اندامک کوچک حاوی آنزیم‌هایی برای تجزیه اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه است که طی واکنش‌هایی، پراکسید هیدروژن تولید شده را به وسیله آنزیم کاتالاز به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند.

pH **pH**

معیاری برای اندازه‌گیری اسیدی یا قلیایی بودن یک محلول که به صورت لگاریتم منفی غلظت یون هیدروژن مول بر لیتر تعریف می‌شود که $pH=-Log[H^+]$، در محیط خنثی pH ۷ بوده و مقادیر کمتر از آن اسیدی و بیشتر از آن قلیایی به شمار می‌روند.

فاگوسیت **Phagocyte**

هر سلولی که پاتوژن‌ها و دیگر ذرات آنتی‌ژن را هضم کرده و از بین می‌برد. فاگوسیت‌های اصلی، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک و نوتروفیل‌ها می‌باشند.

فاگوسیتوز **Phagocytosis**

فرآیندی که در آن ذرات نسبتاً بزرگ (سلول‌های باکتریایی) به وسیله سلول‌های یوکاریوتی ویژه بلعیده می‌شوند. در این فرآیند تشکیل و تخریب رشته‌های اکتین دخیل هستند. فاگوسیتوز از اندوسیتوز وابسته به گیرنده متمایز می‌باشد.

فنوتیپ **Phenotype**

خصوصیات فیزیکی و فیزیولوژیکی قابل تشخیص یک سلول یا یک ارگانیسم که به وسیله ژنوتیپ ایجاد می‌شود. همچنین ویژگی به خصوص مرتبط با یک الل ویژه است.

فرمون **Pheromone**

مولکول سیگنال‌دهی که به وسیله یک فرد آزاد می‌شود و ساختار، میان ژن افراد دیگر از همان‌گونه را تغییر می‌دهد. عوامل جفت‌گیری α و a مخمر نمونه‌هایی هستند که به خوبی مطالعه شده‌اند.

فسفاتاز **Phosphatase**

آنزیمی که گروه فسفات را از یک سوبسترا به وسیله عمل هیدرولیز حذف می‌کند، فسفاتازهای فسفوپروتئین‌ها با همکاری پروتئین کینازها، فعالیت اغلب پروتئین‌های سلولی را کنترل می‌کنند. (شکل ۳۳ـ۳)

پیوند فسفوانیدریدی **Phosphoanhidride bond**

یک نوع پیوند پرانرژی که بین دو گروه فسفات ایجاد می‌شود مثل پیوندهای بین فسفات β و γ یا α و β در مولکول ATP. (شکل ۳۱ـ۲).

پیوند فسفودی‌استری **Phosphodiester bond**

پیوند شیمیایی میان نوکلئوتیدهای مجاور در مولکول DNA و RNA که شامل دو پیوند فسفراستری سمت ′۵ و ′۳ فسفات می‌باشد. (شکل ۲ـ۴)

فسفوگلیسریدها **Phosphoglicerids**

مشتق آمفی‌پاتیک از گلیسرول ۳ فسفات است و به طور کلی از دو زنجیره آبگریز اسید چرب استری شده با گروه‌های هیدروکسیل گلیسرول و یک گروه سرقطبی متصل به فسفات تشکیل شده است. فسفوگلیسریدها فراوان‌ترین لیپیدها در غشاء زنده می‌باشند. (شکل ۵aـ۱۰ و ۲۰ـ۲)

فسفواینوزیتید **Phosphoinositids**

گروهی از لیپیدهای غشایی که دارای مشتقات فسفاته اینوزیتول هستند و بعضی از آنها به عنوان پیامبرهای ثانویه در چندین مسیر سیگنال‌دهی عمل می‌کنند.

فسفولیپاز C **Phospholipase C (PLC)**

فسفولیپاز متصل به غشاء از طریق Gaq یا Gao است و لیپید غشایی فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ بین فسفات را شکسته و پیامبر ثانویه DAG و IP3 را تولید می‌کند. (شکل ۲۹ـ۱۵ و ۳۰ـ۱۵)

فسفولیپید **Phospholipid**

دسته‌ای از لیپیدها که در غشاء زیستی وجود دارند و شامل فسفوگلیسیریدها و اسفنگولیپیدها می‌باشند. (شکل ۵a-۱۰ و ۲-۲۰)

دو لایه فسفولیپیدی **Phospholipid bilayer**

در لایه فسفولیپیدی ساختار دولایه صفحه مانند که در همه غشاهای زیستی یافت می‌شود و در آن ساختارهای سرقطبی فسفولیپیدها در معرض محیط آبی قرار می‌گیرند در حالی که زنجیره‌های غیرقطبی اسیدچرب در وسط این ساختارها قرار دارند. (شکل ۶a,b-۱۰)

انتقال فتوالکترون **Photoelecteron transport**

انتقال به وسیله نور می‌باشد و از طریق آن یک بار الکتریکی از اتم جدا شده و در طول غشاء فتیلاکوئید منتقل می‌شود. رویدادهای بعدی در فتوسنتز به واسطه این عمل اتفاق می‌افتد. (شکل ۳۳-۱۲)

تنفس نوری **Photorespiration**

مسیر واکنش که با تثبیت CO_2 (چرخه کلوین) با مصرف ATP و تولید CO_2 اتفاق می‌افتد، بنابراین کارآیی فتوسنتز کاهش می‌یابد (شکل ۴۵-۱۲).

فتوسنتز **Photosynthesis**

یکی مجموعه واکنش‌های پیچیده در بعضی باکتری‌ها و در کلروپلاست گیاهان که در آن از انرژی نورانی برای تولید کربوهیدرات از CO_2 استفاده می‌شود. این واکنش‌ها معمولاً با مصرف H_2O و تولید O_2 همراه می‌باشند.

فتوسیستم‌ها **Photosystems**

کمپلکس‌های چند پروتئینی که در ارگانیسم‌های فتوسنتزکننده وجود دارند و از کمپلکس‌های دریافت‌کننده نور کلروفیل‌ها و یک مرکز واکنش جایی که انتقال نوری الکترون اتفاق می‌افتد تشکیل شده است. (شکل ۴۲-۱۲)

فراگموپلاست **Phragmoplast**

یک ساختار موقتی در گیاهان است و در طی تلوفاز هنگامی که غشاء پلاسمایی دو سلول دختر تشکیل شده و محتویات دیواره سلولی بین دو سلول جدید گسترش می‌یابد، شکل می‌گیرد. (شکل ۴۳-۱۸)

pI **pI**

به نقطه ایزوالکتریک مراجعه شود.

پلاکین‌ها **Plakins**

خانواده‌ای از پروتئین‌ها که به متصل شدن رشته‌های حدواسط به دیگر ساختارها کمک می‌کنند.

سنجش‌ها پلاک‌ها **Plaqueassay**

روشی برای تشخیص تعداد ذرات ویروسی در یک نمونه که به وسیله کشت نمونه‌های رقیق شده در سطح لایه‌های سلول حساس میزبان صورت می‌گیرد. سپس محل‌های روشن حاوی سلول‌های لیز شده (پلاک‌ها) شمارش می‌شوند. (شکل ۴۵-۴)

غشاء پلاسمایی **Plasma membrane**

غشای احاطه‌کننده یک سلول که سلول را از محیط خارجی جدا می‌کند و شامل دو لایه فسفولیپیدی و لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و... می‌باشد. (شکل ۲-۱۰ و ۱-۱۰)

پلاسمید **Plasmid**

DNA حلقوی کوچک خارج کروموزومی که قادر است به طور خودمختار در یک سلول همانندسازی کنند. اغلب در کلون‌سازی DNA به عنوان وکتور (حامل) استفاده می‌شود.

پلاسمودسماتا **Plasmodesmata (sing plasmadesm)**

اتصالات لوله‌ای شکل که سیتوپلاسم سلول‌های گیاهی مجاور را به هم متصل می‌کند و از نظر عملکردی مشابه اتصالات در سلول‌های جانوری است. (شکل ۳۸-۱۹)

بلوغ پروتئین **Protein muturation**

تغییر یک نوکلئوتید در ناحیه به خصوص از DNA رمزدهی کننده یک پروتئین بوده و ممکن است منجر به تشکیل کدون دیگر رمزدهی کننده اسیدآمینه متفاوت یا کدون پایان رونویسی در ژن شود. حذف یا اضافه شدن یک نوکلئوتید موجب تغییر در قالب خواندن می‌شود.

قطبی **Polar**

در ارتباط با یک مولکول یا ساختاری دارای یک بار الکتریکی یا توزیع بار منفی و مثبت به صورت نامتقارن می‌باشد. مولکول‌های قطبی محلول در آب هستند.

قطبیت **Polarity**

در زیست‌شناسی سلولی وجود تفاوت‌های ساختاری و یا عملکردی در مناطق مشخص یک سلول یا ترکیبات سلولی می‌باشد.

قطبی شده **Polarized**

در زیست‌شناسی سلولی، در ارتباط با هر سلول یا ساختار سلولی که به وسیله نامتقارن بودن عملکردی و ساختاری مشخص می‌شود.

پلیمر **Polymer**

مولکول بزرگ متشکل از چندین واحد مشابه (مونومر) است که به وسیله پیوندهای کوالان به هم متصل شده‌اند. (شکل ۱۳-۲)

Polymerase chain reaction (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)
به PCR مراجعه شود.

پلی پپتید **Polypeptide**
پلیمر خطی از اسیدهای آمینه‌ای که به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل شده‌اند و معمولاً دارای ۲۰ یا تعداد بیشتری مونومر می‌باشند. به پروتئین نیز مراجعه شود.

پلی ریبوزوم **Polyribosome**
ترکیبی دارای چندین ریبوزوم که در آن همه ریبوزوم‌ها یک RNA واحد را ترجمه می‌کنند و به آنها پلی‌زوم نیز می‌گویند. (شکل ۲۸ـ۴)

پلی ساکارید **Polysacharide**
پلیمر منشعب یا خطی از مونوساکاریدها که به وسیله پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند و معمولاً دارای بیش از ۱۵ مونوساکارید هستند. به پلیمرهای حاوی کمتر از ۱۵ مونوساکارید، الیگوساکارید گویند.

کروموزم پلی تن **Polyten chromosome**
کروموزوم بزرگی که از چندین نسخه مشابه خود تشکیل شده‌اند. این نسخه‌ها به وسیله چندین چرخه همانندسازی DNA بدون جدا شدن کروموزومی ایجاد می‌شوند. کروموزوم‌های پلی‌تن در بسیاری از پلاک‌ها در دروزوفیلا و سایر حشرات یافت می‌شوند. (شکل ۴۴ـ۶ و ۴۵ـ۶)

غیراشباع چندگانه **Poly unsaturated**
در ارتباط با ترکیبی (مثل اسیدچرب) که در آن دو یا تعداد بیشتری پیوندهای دوگانه یا سه‌گانه کربن ـ کربن وجود دارد.

پورین **Porin**
دسته‌ای از پروتئین‌های تریمری گذرنده غشایی که از طریق این پروتئین‌ها، مولکول‌های کوچک محلول در آب می‌توانند از غشاء دولایه عبور کنند. این پروتئین‌ها در غشاء بیرونی میتوکندری، کلروپلاست و باکتری‌های گرم منفی وجود دارند. (شکل ۸ـ۱۰)

انرژی پتانسیل **Potential energy**
انرژی ذخیره شده در سیستم‌های زیستی، شکل اصلی انرژی که به صورت‌های مختلف مانند پتانسیل پیوندهای شیمیایی، شیب غلظت و پتانسیل الکتریکی در غشاهای سلولی وجود دارد.

پیش mRNA **Pre mRNA**
رونوشت اولیه RNA پیک که در اثر پردازش ایجاد می‌شود.

پیش RNA **Pre RNA**
RNA ریبوزومی اولیه بزرگ که در هستک سلول‌های یوکاریوتی سنتز می‌شوند و سه چهارم RNAهای موجود در ریبوزوم را تولید می‌کند. (شکل ۳۴ـ۸ و ۳۵ـ۸)

ساختار اولیه **Primary structure**
توالی خطی اسید آمینه‌ای در زنجیره پلی‌پپتیدی در پروتئین‌ها.

رونوشت اولیه **Primary transcript**
RNA اولیه در یوکاریوت‌ها که دارای اینترون‌ها و اگزون‌ها است و به وسیله رونویسی از DNA الگو ایجاد می‌شود. اغلب رونوشت‌های اولیه تحت پردازش قرار می‌گیرند تا RNA فعال از نظر فیزیولوژیکی را ایجاد کنند.

پریماز **Primase**
RNA پلیمراز تخصص یافته که قطعات کوچکی از RNA را تولید می‌کنند. این قطعات به عنوان پرایمر برای سنتز DNA استفاده می‌شوند. (شکل ۳۱ـ۴)

پرایمر **Primer**
توالی کوتاه اسیدنوکلئیک که دارای گروه ′۳ هیدروکسیل آزاد بوده و با زنجیره مکمل خود جفت بازها را تشکیل می‌دهد و به عنوان نقطه شروع اضافه شدن نوکلئوتیدها به نسخه زنجیره الگو عمل می‌کند.

پروب **Probe**
قطعاتی از DNA یا RNA مشخص که با مواد رادیواکتیو یا مواد شیمیایی نشاندار شده‌اند و به منظور شناسایی توالی نوکلئوتیدی ویژه مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی **Programmed cell death**
به آپوپتوز مراجعه شود.

پروکاریوت **Prokaryote**
دسته‌ای از ارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها و آرکئا است که فاقد غشاء هسته و سایر اندامک‌ها می‌باشند. همچنین به یوکاریوت‌ها مراجعه شود. (شکل ۳ـ۱)

پرومتافاز **Prometaphase**
دومین مرحله میتوزی که غشاء هسته و لامین هسته‌ای شکسته می‌شود و میکروتوبول‌ها برای تشکیل دوک میتوز شکل گرفته و جفت‌های کروموزوم‌ها به وسیله ساختارهای اختصاصی کینه‌توکور روی دوک قرار می‌گیرند. (شکل ۳۴ـ۱۸)

پروموتر **Promotor**
توالی DNA که محل آغاز رونویسی برای RNA پلیمراز را تشخیص می‌دهد. (شکل ۱۱ـ۴)

عناصر نزدیک پروموتر **Promotor - proxmial element**
هر توالی تنظیم‌کننده در DNA یوکاریوتی که در فاصله حدوداً ۲۰۰ جفت باز از محل شروع رونویسی قرار دارد. رونویسی

بیشتر ژن‌ها به وسیله چندین عنصر نزدیک پروموتر کنترل می‌شود. (شکل ۱۶ـ۷)

پروفاز **Prophase**

اولین مرحله میتوزی طی این مرحله تراکم، مضاعف شدن سانتروزوم‌ها و حرکت آنها به سمت قطبین دوک و تشکیل دوک میتوز اتفاق می‌افتد. (شکل ۳۴ـ۱۸)

پروتئاز **Protease**

هر آنزیمی که یک یا تعداد بیشتری از پیوندهای پپتیدی را در پروتئین‌های هدف می‌برد.

پروتئوزوم **Proteasoma**

ترکیب پروتئازی چند عملکردی بزرگ در سیتوزول که پروتئین‌های داخل سلولی متصل و نشاندار شده به چندین مولکول یوبی‌کوئیتین را تخریب می‌کند.

پروتئین **Protein**

مولکول بزرگ که از یک یا چندین زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است و در حالت طبیعی به شکل ویژه سه‌بعدی (حالت فعال پروتئینی) تامی‌خورد.

خانواده پروتئینی **Protein family**

یک سری از پروتئین‌های همولوگ که به وسیله یک خانواده ژنی رمزدهی می‌شود.

پروتئین کیناز A **Protein kinase A (PKA)**

آنزیم سیتوزولی که به وسیله AMP حلقوی (cAMP) فعال شده و پروتئین‌های سلولی زیادی را فسفریله کرده و بنابراین فعالیت آنها را تنظیم می‌کند. همچنین پروتئین کیناز وابسته به AMP نامیده می‌شود. (شکل ۲۳ـ۱۵)

پروتئین کیناز B **Protein kinase B (PKB)**

آنزیم سیتوزولی در غشاء پلاسمایی که به وسیله فسفواینوزیتیدهای تحریک شده سیگنالی فعال می‌شوند. همچنین AKT نامیده می‌شود. (شکل ۳۰ـ۱۶)

پروتئین کیناز C **Protein kinase C (PKC)**

آنزیم سیتوزولی که در پاسخ به تحریک سیگنال به کار می‌رود و منجر به بالا رفتن غلظت Ca^{2+} می‌شود، سپس به وسیله دی‌اسیل‌گلیسرول (DAG) متصل به غشاء فعال می‌شود.(شکل ۳۰ـ۱۵)

پروتئوگلیکان‌ها **Proteoglycans**

گروهی از گلیکوپروتئین‌ها (مثل پرلکان و اگرکان) که از یک پروتئین مرکزی و یک یا تعداد بیشتری زنجیره گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) تشکیل شده است. آنها در ماتریکس خارجی سلولی همه جانوران یافت می‌شوند. بعضی از پروتئوگلیکان‌ها به صورت پروتئین‌های اینتگرال (درون غشایی) هستند. (شکل ۲۹ـ۱۹)

پروتئوم **Proteom**

مجموع پروتئین‌های تولید شده به وسیله یک سلول.

پروتئومیکس **Proteomix**

مطالعه سیستماتیک که تغییرات، واکنش‌ها، منطقه‌بندی و عملکردهای همه پروتئین‌ها را در کل ارگانیسم، بافت و سلول و اجزای سلولی بررسی می‌کند.

پروتون **Proton**

واژه عمومی برای یک یون هیدروژن (H^+)

نیروی محرک پروتون **Proton - motive force**

انرژی معادل شیب غلظتی H^+ و شیب پتانسیل الکتریکی در غشاء سلولی است و برای سنتز ATP به وسیله ATP سنتاز و انتقال مولکول‌ها خلاف شیب غلظت‌شان و حرکت فلاژل (تاژک) باکتریایی به کار می‌رود. (شکل ۲ـ۱۲)

پیش انکوژن **Proto oncogene**

ژن طبیعی سلولی است و پروتئین دخیل در تنظیم رشد و تمایز سلولی را رمزدهی می‌کند. این ژن‌ها می‌توانند به وسیله جهش، تغییر در رمزدهی کردن یک قسمت از پروتئین یا به وسیله تغییر در بیان ژن به انکوژن‌های ایجادکننده سرطان تبدیل شوند. (شکل ۱۱ـ۲۵)

پرو ویروس **Provirus**

DNA ویروس طبیعی که به درون ژنوم میزبان وارد می‌شود. در طی همانندسازی سلول. DNA پروویروس همانندسازی کرده و در سلول‌های دختری ظاهر می‌شود. فعال شدن DNA پروویروس منجر به تولید و انتشار ویروس اولیه می‌شود.

ژن کاذب **Pesudogene**

توالی DNA که شبیه ژن عملکردی است اما محصول عملکردی تولید نمی‌کند و احتمالاً به وسیله حرکت توالی ژن‌های مضاعف شده ایجاد می‌شوند.

ضربه ـ تعقیب **Pulse - chase**

روشی آزمایشگاهی که در آن یک مولکول رادیواکتیو کوچک (تعقیب) برای مدت کوتاهی به سلول اضافه شده، سپس با افزایش شکل غیر نشاندار از همان مولکول کوچک (ضربه) در محیط دیگر قرار داده می‌شود و برای تشخیص تغییر موقعیت مولکول‌های سلولی یا سرنوشت متابولیکی آن مولکول در طول زمان، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پمپ **Pump**

به پمپ ATP مراجعه شود.

پورین‌ها **Purines**

دسته‌ای از ترکیبات نیتروژن‌دار که دارای دو حلقه هتروسایکلیک

متصل به هم بوده و در پورین‌های A و G در DNA و RNA یافت می‌شوند. همچنین به جفت باز مراجعه شود. (شکل ۱۷ـ۲)

پیریمیدین‌ها **Pyrimidines**

دسته‌ای از ترکیبات نیتروژن‌دار که شامل یک حلقه هتروسیکلیک است. از این ترکیبات سیتوزین و تیمین در DNA یافت می‌شود که در RNA یوراسیل جایگزین تیمین شده است. به جفت باز نیز مراجعه شود. (شکل ۱۷ـ۲)

Q

ساختار چهارم **Quatemary structure**

تعداد و موقعیت نسبی زنجیره‌های پلی‌پپتیدی در پروتئین‌های چند زیرواحدی. (شکل ۱۰b ـ۳)

R

رادیوایزوتوپ **Radioisotope**

شکل ناپایدار یک اتم که همراه با از بین رفتن خود اشعه ساطع می‌کند. رادیو ایزوتوپ‌های زیادی به عنوان نشانگرهای مولکول‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

پروتئین Ras **Ras protein**

پروتئین تک زیرواحدی از ابرخانواده GTPآز که پروتئین شروع‌کننده سیگنالی بوده و به غشاء پلاسمایی به وسیله یک لیپید متصل شده‌اند و در مسیرهای سیگنالی داخل سلولی عمل کرده و به وسیله اتصال لیگاند به گیرنده تیروزین کینازی و سایر گیرنده‌های سطح سلولی دیگر فعال می‌شوند.

ثابت سرعت **Rate constant**

ثابتی که غلظت واکنش‌گرها را به سرعت واکنش شیمیایی مرتبط می‌سازد.

قالب خواندن **Reading frame**

توالی نوکلئوتیدهای سه‌تایی (کدون‌ها) که از یک کدون شروع ترجمه آغاز شده و به یک کدون پایان ترجمه ختم می‌شوند. بعضی mRNAها را می‌توان به وسیله تغییر در قالب خواندشان (دو قالب خواندن مختلف) به پلی‌پپتیدهای متفاوت ترجمه کرد.

گیرنده **Receptor**

هر پروتئینی که به طور اختصاصی به مولکول دیگری اتصال می‌یابد تا سیگنال‌های سلول ـ سلول، آندوسیتوز، اتصال (چسبندگی) یا سایر فرایندهای سلولی انجام گیرد. این پروتئین‌ها اغلب در غشاء پلاسمایی، هسته یا سیتوزول قرار دارند و به مولکول‌های خارج سلولی ویژه (لیگاند) اتصال می‌یابند. اغلب تغییرات کنفورماسیون را در گیرنده تحریک کرده و به این وسیله پاسخ سلولی را آغاز می‌کنند همچنین به گیرنده اتصال، گیرنده هسته‌ای مراجعه شود. (شکل ۱ـ۱۵ و ۱ـ۱۶)

Receptor mediated endosiytosis

آندوسیتوز از طریق گیرنده

جذب مواد خارج سلولی که به گیرنده‌های ویژه سطح سلولی که به وسیله به درون کشیده شدن غشاء پلاسمایی اتصال می‌یابند تا وزیکول غشایی (اندوزوم اولیه) تشکیل شود. (شکل ۲۹ـ۱۴)

Receptor tyrosin Kinase (RTK)

گیرنده تیروزین کینازی

عضوی از یک دسته بزرگ گیرنده‌های سطح سلولی که معمولاً دارای یک دُمین گذرنده از غشاء بوده و شامل رسپتورهایی برای انسولین و فاکتورهای رشد می‌باشند. اتصال لیگاند، پروتئین کیناز ویژه تیروزین را در دُمین گیرنده فعال می‌کنند و به این وسیله مسیرهای سیگنالی داخل سلولی آغاز می‌شود. (شکل ۱۷ـ۱۶ و ۱۶ـ۱۶)

مغلوب **Recessive**

در ارتباط با آللی از یک ژن که در فتوتیپ در حضور آلل غالب بیان نمی‌گردد بنابراین در فتوتیپ فردی که دارای دو آلل مغلوب (هموزیگوت) می‌باشد ظاهر می‌گردد. جهش در آلل‌های مغلوب در کل منجر به از دست رفتن عملکرد ژن می‌شود. (شکل ۲ـ۵)

نوترکیبی DNA **Recombinant DNA**

هر مولکول DNA که در محیط آزمایشگاهی به وسیله پیوستن قطعات DNA از منابع مختلف تولید می‌شود.

نوترکیبی **Recombination**

فرآیندی که در آن کروموزوم‌ها یا مولکول‌های DNA شکسته شده و قطعات برای ایجاد ترکیبات جدید دوباره به هم پیوند می‌خورند. نوترکیبی همولوگ در طی میوز از کراسینگ آور کروموزوم‌های همولوگ ایجاد می‌شود. نوترکیبی همولوگ و نوترکیبی غیرهمولوگ (بین کروموزوم‌های مورفولوژیک متفاوت) طی مکانیسم‌های تعمیر DNA نیز اتفاق می‌افتد و می‌تواند در محیط آزمایشگاه با DNA خالص‌سازی شده و آنزیم‌ها انجام شود. (شکل ۱۰ـ۵)

واکنش ردوکس **Redox reaction**

یک واکنش اکسیداسیون ـ احیاء که در آن یک یا چند الکترون از یک واکنش‌گر به دیگری انتقال می‌یابد.

احیاء **Reduction**

گرفتن یک الکترون از یک اتم یا مولکول هنگامی که اتم

هیدروژن به یک مولکول اضافه شده یا اکسیژن حذف می‌شود. متضاد اکسیداسیون

پتانسیل احیاء **Reduction potetial (E)**

تغییر ولتاژ در یک اتم یا مولکول هنگامی که یک الکترون می‌گیرد، یا میزان تمایل یک مولکول به گرفتن الکترون برای انجام واکنش احیاء. E احیاء (واکنش رفت) مقداری برابر اما مخالف پتانسیل اکسیداسیون برای واکنش برگشت (اکسیداسیون) را دارد.

فاکتور آزاد کننده **Release factor (RF)**

یکی از دو نوع پروتئین‌های غیر ریبوزومی که کدون پایان را در mRNA تشخیص داده و آزاد شدن زنجیره پلی‌پپتیدی کامل را پیش برده و به این وسیله ترجمه را پایان می‌دهند (سنتز پروتئین) (شکل ۲۷ـ۴).

چنگال همانندسازی **Replication fork (RF)**

ناحیه به شکل Y در DNA دو رشته‌ای که در آن دو زنجیره از هم باز شده و طی سنتز DNA همانندسازی می‌شوند. همچنین به آن چنگال رشد نیز می‌گویند. (شکل ۳۰ـ۴)

ناحیه منشاء همانندسازی **Replication origin**

بخش‌های واحدی از DNA که در ژنوم DNA یک موجود جایی که همانندسازی شروع می‌شود وجود دارد. کروموزوم‌های یوکاریوتی دارای چندین محل شروع می‌باشند در حالی که کروموزوم‌های باکتریایی و پلاسمیدها معمولاً فقط یک محل شروع دارند.

ژن گزارشگر **Reporter gene**

ژنی که به آسانی سنجش می‌شود (مثل β گالاکتوزیداز، لوسیفراز). ژن‌های گزارشگر در آزمایشهای متعددی به کار میروند تا فعالیت پروموتور یک ژن را تشخیص دهند.

مهارکننده **Repressor**

فاکتور رونویسی ویژه که از رونویسی جلوگیری می‌کند.

ریشه **Residue**

واژه عمومی برای واحدهای تکراری در یک پلیمر که بعد از پیوند کووالان پیش‌سازهای مونومری حفظ می‌شود.

تفکیک **Resolution**

حداقل فاصله بین دو جسم که به وسیله چشم تشخیص داده می‌شود. همچنین به آن نیروی تفکیک نیز می‌گویند.

زنجیره تنفسی **Respiratory chain**

به زنجیره انتقال الکترون مراجعه شود.

کنترل تنفس **Respiratory control**

وابستگی اکسیداسیون NADH و $FADH_2$ میتوکندریایی به مصرف ADP و P برای سنتز ATP.

Resting K^+ channels

کانال‌های غیرفعال (استراحت) K^+

کانال‌های یون K^+ در غشاء پلاسمایی که دریچه ندارند و در همکاری با غلظت زیاد K^+ سیتوزولی ایجاد شده به وسیله پمپ ATP Na^+/K^+ تولید می‌شوند به طور عمده این کانال‌ها مسئول ایجاد پتانسیل غشایی استراحت درونی در سلول‌های پستانداران می‌باشند.

آنزیم محدودکننده **Restriction enzyme**

هر آنزیمی که توالی کوتاه اختصاصی را در محل برش محدودکننده تشخیص داده و برش می‌دهد. در مولکول‌های دو زنجیره‌ای DNA به طور عمده در تولید DNA نوترکیب در آزمایشگاه استفاده می‌شوند. به آنها آندونوکلئاز محدودکننده نیز می‌گویند. (شکل ۱۱ـ۵) و جدول (۱ـ۵)

قطعه محدودکننده **Restriction fragment**

قطعه DNA که به وسیله تشخیص شکسته شدن با آنزیم محدودکننده ویژه ایجاد می‌شود. این قطعات در تولید مولکول‌های DNA نوترکیب و کلون کردن DNA استفاده می‌گردد.

Restriction fragment lenghpolynarphisms

قطعات با طول مختلف حاصل عملکرد آنزیم‌های محدودکننده

به RFLP مراجعه شود.

نقطه محدودکننده **Restriction point**

نقطه‌ای در اواخر G_1 چرخه سلولی در سلول‌های پستانداران بوده و سلول را متعهد به ورود به مرحله S و کامل شدن چرخه سلولی حتی در صورت فقدان فاکتورهای رشد می‌کند. به طور عملکردی برابر با استارت در مخمر می‌باشد.

نقشه‌های شبکیه‌ای **Retinotectal maps**

نقشه‌های مربوط به اطلاعات بینایی که در یک قسمت در شبکیه به وسیله ورود نور ایجاد شده است. قسمت دیگر در بخش بینایی مغز (رکتوم) به وسیله سلول‌های گانگلیون رتینال آورنده اطلاعات از چشم به مغز ایجاد می‌شود. نقشه ایجاد شده در مغز مشابه نقشه ایجاد شده در چشم است.

رتروترانسپوزون **Retrotransposone**

عناصر DNA قابل انتقال در یوکاریوت‌ها که در ژنوم به وسیله RNA حد واسط حرکت می‌کنند و در مرحله رونویسی معکوس درگیر می‌شوند. همچنین به ترانس پوزون مراجعه شود. (شکل ۸ـ۶b)

رتروویروس **Retrovirus**

نوعی ویروس یوکاریوتی حاوی RNA که در سلول‌ها به وسیله ساختن یک نسخه DNA از روی RNA همانندسازی

می‌کنند. این DNA ویروسی به DNA کروموزومی سلولی وارد شده و یک پروویروس (پیش‌ویروس) را تشکیل داده و باعث ایجاد RNAهای ژنومی بعدی و همچنین mRNA برای پروتئین‌های ویروسی می‌شود. (شکل ۴۹ـ۴)

ترانس کریپتاز معکوس **Revers transcriptas**

آنزیمی که در رتروویروس‌ها یافت می‌شود و واکنش‌های پیچیده‌ای را کاتالیزو می‌کند. در این واکنش‌ها یک زنجیره دو رشته‌ای DNA از یک الگوی تک رشته‌ای RNA ساخته می‌شود.

RFLP (Restriction fragment lengh polymorphism)

ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز

تفاوت‌های میان افراد در توالی DNA ژنومی که به وسیله محل‌های تشخیص با آنزیم‌های محدودکننده ویژه ایجاد شده یا از بین می‌روند. این توالی‌ها یکی از چندین نوع توالی‌های متفاوت میان افراد بوده و به عنوان نشانگرهای مولکولی DNA در مطالعات پیوستگی انسانی به کار می‌روند.

اسید ریبونوکلئیک **Ribonocleic acid (RN)**

به RNA مراجعه شود.

Ribonocleoprotein (RNP) complex

کمپلکس ریبونوکلئو پروتئین

یک واژه کلی برای هر ترکیب پیچیده‌ای از پروتئین‌ها و RNA. بیشتر مولکول‌های RNA در سلول به شکل RNPها وجود دارند.

ریبوزوم **Ribosome**

ترکیب بزرگ شامل چندین rRNA متفاوت و بیش از ۵۰ پروتئین که از دو زیرواحد کوچک و بزرگ تشکیل شده است و محل ترجمه (سنتز پروتئین) می‌باشد. (شکل ۲۳ـ۴ و ۲۲ـ۴)

RNA ریبوزومی **Ribosomal RNA**

به rRNA ریبوزومی مراجعه شود.

ریبوزیم **Ribozyme**

مولکول RNA با فعالیت کاتالیزوری. ریبوزیم در پردازش RNA و سنتز پروتئین نقش دارد.

Ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase

قطعات چندشکلی حاصل عمل آنزیم محدود کننده

آنزیمی که در کلروپلاست قرار دارد و اولین واکنش در چرخه کلوین را انجام می‌دهد. این عمل با اضافه کردن مولکول CO_2 به قند پنج کربنه (ریبولوز ۱ و ۵ پس‌فسفات) صورت می‌گیرد و منجر به تشکیل دو مولکول ۳ فسفوگلیسرات می‌شود به آن روبسکو نیز می‌گویند. (شکل ۴۳ـ۱۲)

RISC **RISC**

به خاموش‌کننده القاءکننده RNA مراجعه شود.

RNA (ریبونوکلئیک اسید) **RNA (Ribonucleic acid)**

پلیمر تک زنجیره‌ای خطی که از نوکلئوتیدهای ریبوز تشکیل شده است. mRNA, rRNA و tRNA هر کدام نقش‌های متفاوتی در سنتز پروتئین دارند. تعدادی از RNAهای کوچک در کنترل پایداری و ترجمه mRNAها و کنترل ساختار کروماتین و رونویسی نقش دارند. (شکل ۱۷ـ۴)

ویرایش RNA **RNA editing**

پردازش انواع غیرمعمول RNA که در آن توالی یک mRNA اولیه تغییر می‌یابد.

RNA - induced silencing complex (RISC)

کمپلکس القاء خاموش(ریسک) RNA

یک ترکیب چند پروتئینی بزرگ که به یک RNA تک زنجیره‌ای کوتاه متصل شده است (siRNA یا miRNA) و تجزیه یا مهار ترجمه یک mRNA مکمل یا کمی مکمل را انجام می‌دهد.

RNA مداخله‌کننده **RNA interference (RNAs)**

غیرفعال سازی عملکردی یک ژن ویژه به وسیله یک RNA دو رشته‌ای مربوطه است و تجزیه یا مهار ترجمه mRNA تک زنجیره مکمل رمزدهی شده به وسیله یک ژن را القا می‌کند. این عمل برای mRNAهایی با توالی متفاوت صورت نمی‌گیرد. (شکل ۴۵ـ۵)

RNA پلیمراز **RNA polymerase**

آنزیمی که یک رشته از DNA را (زنجیره الگو) رونویسی می‌کند تا با استفاده از ریبونوکلئازتری‌فسفات زنجیره RNA مکمل را بسازد. (شکل ۱۵ـ۴)

پیرایش RNA **RNAs splicing**

فرایندی که منجر به حذف اینترون‌ها و به هم پیوستن اگزون‌ها در mRNA اولیه می‌شود. همچنین به اسپلایسوزوم مراجعه شود. (شکل ۸ـ۸)

rRNA (ریبوزومی RNA) **rRNA (ribosomal RNA)**

هر یک از چندین مولکول بزرگ mRNA که از ترکیبات ساختاری و عملکردی ریبوزوم‌ها بوده و اغلب rRNAهایی با ضریب رسوب ۲۸ و ۱۸ و ۸ و ۵ در یوکاریوت‌های عالی می‌باشند. (شکل ۲۲ـ۴)

روبسکو **Rubisco**

به ریبولوز او ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز مراجعه شود.

S

فاز S (سنتز) **S (synthesis) phase**

به چرخه سلولی مراجعه شود.

سارکومر **Sarcomere**

واحد ساختاری تکراری ماهیچه‌های صاف (اسکلتی) که از رشته‌های نازک (اکتین) هم‌پوشان و رشته‌های کلفت (میوزین) تشکیل شده است و از یک صفحه Z تا صفحه Z دیگری امتداد می‌یابد که در هنگام انقباض سارکومرها کوتاه می‌شوند. (شکل ۲۹ـ۱۷ و ۳۰ـ۱۷)

شبکه سارکوپلاسمی **Sarcoplasmic reticulum**

شبکه غشایی در سیتوپلاسم یک سلول ماهیچه‌ای که یون‌های Ca^{2+} را جدا نگه می‌دارد. به وسیله تحریک انقباض ماهیچه‌ای موجب انتشار Ca^{2+} ذخیره شده می‌شود.

DNA ماهواره **Satellite DNA**

به توالی ساده DNA مراجعه شود.

اشباع شده **Saturated**

در ارتباط با یک ترکیب (مثل اسیدچرب) که در آن همه پیوندهای کربن ـ کربن یگانه هستند.

پیامبر ثانویه **Second messenger**

یک مولکول داخل سلولی کوچک (مثل IP3, DAG, Ca^{2+}, cGMP, cAMP) که غلظت‌شان در پاسخ به اتصال یک سیگنال خارج سلولی افزایش (یا کاهش) می‌یابد و این مولکول‌ها در انتقال سیگنال عمل می‌کنند. (شکل ۹ـ۱۵)

ساختار ثانویه **Secondary structure**

تاخوردگی یک زنجیره پلی‌پپتیدی به ساختار منظم دارای مارپیچ α و صفحات β و پیچ β

مسیر ترشحی **Secretory pathway**

مسیر سلولی سنتز و دسته‌بندی پروتئین‌های غشایی و محلول است که در شبکه آندوپلاسمی، گلژی و لیزوزیم‌ها، پروتئین‌های غشای پلاسمایی و پروتئین‌های ترشحی طبقه‌بندی می‌شوند.

وزیکول ترشحی **Secretory vesicle**

وزیکول غشایی کوچک که از شبکه ترانس گلژی منشاء می‌گیرد و حاوی مولکول‌های منتشر شده از سلول می‌باشد.

ژن‌های قطبیت قطعه **Segment polarity genes**

دسته‌ای از ژن‌ها در دروزوفیلا است که این ژن‌ها ترکیبات سیستم‌های سیگنال‌دهی تعیین‌کننده سرنوشت سلول‌ها و قطبیت اسکلت سلولی در طول محور قدامی، خلفی در جنین اولیه را رمزدهی می‌کنند.

تفکیک **Segregation**

فرایندی که در طی میوز و میتوز کروموزوم‌های مشابه را به سلول‌های دختری پخش می‌کنند.

سلکتین‌ها **Selectins**

خانواده‌ای از مولکول‌های اتصال‌دهنده (چسبانده) سلول که واکنش‌های وابسته به Ca^{2+} را انجام می‌دهد. این اتصال با بخش الیگوساکاریدی ویژه در گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها در سطح سلول‌های مجاور یا گلیکوپروتئین‌های خارج سلولی صورت می‌گیرد. (شکل ۲ـ۱۹ و ۳۶ـ۱۹)

وکتور شاتل **Shuttle vector**

وکتورهای پلاسمیدی که قادر به تکثیر در دو میزبان متفاوت هستند. (شکل ۱۷ـ۵)

زنجیره جانبی **Side chain**

گروه جانشینی متنوع در اسیدهای آمینه که به اتم کربن α متصل شده و به طور گسترده ویژگی‌های به خصوص هر اسید آمینه را ایجاد می‌کند. همچنین گروه R نامیده می‌شود. (شکل ۱۴ـ۲)

مولکول سیگنالی **Signaling molecule**

واژه کلی برای هر مولکول داخل یا خارج سلولی که در پاسخ یک سلول به محیط اطراف خارجی یا به دیگر سلول‌ها دخیل می‌باشد.

ذره تشخیص سیگنال (SRP) **Signal - recognition particle (SRP)**

ذره ریبونوکلئوپروتئین سیتوزولی که به توالی سیگنال ER در پروتئین ترشحی در حال سنتز متصل می‌شود و ترکیب ریبوزوم و زنجیره در حال سنتز را به غشاء ER منتقل می‌کند. در این غشاء سنتز و ترجمه پروتئین در شبکه ER کامل می‌شود. (شکل ۵ـ۱۳)

توالی سیگنال **Signal sequence**

توالی نسبتاً کوتاه اسید آمینه‌ای که پروتئین را به مقصد خاص در سلول راهنمایی می‌کند، همچنین به آن سیگنال پپتیدی و توالی جذب هدف نیز می‌گویند. جدول (۱ـ۱۳)

انتقال سیگنال **Signal transduction**

تبدیل یک سیگنال از شکل فیزیکی یا شیمیایی به شکل دیگر. در زیست‌شناسی سلولی اغلب به فرآیندهای متوالی گفته می‌شود که با اتصال یک سیگنال خارج سلولی به یک گیرنده شروع می‌گردند و این فرآیندها منجر به ایجاد یک یا چند پاسخ سلولی می‌گردند.

خاموش‌کننده **Silencer**

توالی از DNA یوکاریوتی که باعث ایجاد ساختار متراکم کروماتین در یک منطقه می‌شود در نتیجه جلوی دسترسی پروتئین‌های ضروری برای رونویسی ژن‌ها در صدها جفت باز توالی خاموش‌کننده گرفته می‌شود. همچنین پیش توالی خاموش‌کننده نیز نامیده می‌شود.

انتشار ساده **Simple diffusion**

حرکت یک مولکول از غشاء سلولی در جهت شیب غلظتی آن. این عمل با سرعتی متناسب با شیب و نفوذپذیری غشاء صورت می‌گیرد. به آن انتقال غیرفعال نیز می‌گویند.

توالی ساده DNA **Simple - sequence DNA**

توالی‌های تکراری کوتاه و پشت سر هم که در سانتروزوم و تلومر و سایر مناطق کروموزومی یافت می‌شوند. این توالی‌ها رونویسی نمی‌شوند. همچنین به آنها DNA ماهواره نیز می‌گویند.

SINES (short intersperesd elements)

عناصر کوتاه پراکنده (SINE)

دسته‌ای از رتروترانس پوزون‌ها که دارای ۴۰۰ـ۱۰۰ نوکلئوتید می‌باشند و ۱۳ درصد از کل DNA انسانی را تشکیل می‌دهند. عناصر ALU در انسان‌ها تقریباً دو سوم SINEها را تشکیل می‌دهند.

siRNA **siRNA**

یک RNA دو رشته‌ای کوچک که دارای ۲۳ـ۲۱ نوکلئوتید با دو نوکلئوتید تک رشته‌ای در دو انتها می‌باشد یک ته رشته‌ای siRNA به پروتئین‌های متعددی متصل است و این اتصال یک کمپلکس RNA القاءکننده خاموشی (RISC) را تشکیل می‌دهد. RNA هدفی را که siRNA با آن به طور کامل جفت باز تشکیل داده است می‌شکند. به این siRNAها، RNA مداخله‌گر کوچک و مهارکننده کوچک نیز می‌گویند. siRNA می‌تواند به طور آزمایشگاهی بیان ژن‌های ویژه را مهار کند. همچنین به miRNA مراجعه شود. (شکل ۲۵b-۸)

Smads **Smads**

دسته‌ای از فاکتورهای رونویسی که با فسفریلاسیون فعال شده به دنبال این عمل اتصال تعدادی از فاکتورهای رشد تبدیل‌کننده TGFB β که خانواده‌ای از مولکول‌های سیگنالی هستند به گیرنده‌های سطح سلولی صورت می‌گیرد. (شکل ۴ـ۱۶)

پروتئین SMC **SMC protein**

پروتئین‌های ساختاری نگهدارنده کروموزومی که خانواده‌ای کوچک از پروتئین‌های کروماتین غیر هیستونی هستند و در حفظ ساختار مورفولوژیکی کروموزوم‌ها و تفکیک‌پذیری مناسب آنها طی میتوز نقش مهمی دارند. اعضای این خانواده از کاندنسین که به تراکم کروموزوم‌ها در طی میتوز کمک می‌کند و کوهسین که کروماتیدهای خواهری را به هم متصل می‌کند تا این که در آنافاز از هم جدا شوند تشکیل شده است. پروتئین‌های SMC باکتریایی در تفکیک مناسب کروموزوم‌های باکتریایی سلولی‌های دختری عمل می‌کنند (شکل ۳۸ـ۶ و ۲۱ـ۲۰).

SNAREs **SNAREs**

پروتئین‌های اینتگرال سیتوزولی که اتصال وزیکول‌ها به غشاءهای هدف را انجام می‌دهند. واکنش v-SNAREها در سطح یک وزیکول با t-SNAREهای وابسته (مکمل) در سطح غشای هدف یک ترکیب بسیار پایدار تشکیل می‌دهند. این ترکیب وزیکول و غشاء هدف را به سمت داخل می‌کشد. (شکل ۱۰ـ۱۴)

SnoRNA (small nuclear RNA)

SnoRNA (RNA کوچک هسته‌ای)

نوعی RNA پایدار کوچک که در پردازش rRNA و تغییرات بازها در هستک عمل می‌کند.

SnoRAN (small nuclear RNA)

RAN کوچک هسته‌ای

یکی از چندین RNA کوچک پایدار که در هسته قرار دارد. پنج siRNA از ترکیبات اسپلایسوزوم بوده و در پیرایش mRNA اولیه عمل می‌کنند. (شکل ۹ـ۸ و ۱۱ـ۸)

سلول سوماتیک **Somatic cell**

هر سلول حیوانی یا انسانی به جزء سلول جنسی.

Somatic cell nuclear transfor (SCNT)

انتقال هسته‌ای سلول سوماتیک

پیش‌ساز تولید انواع سلول‌های ویژه در محیط کشت آغازی از سلول‌های بنیادی بزرگسال یا جنینی.

سیگنال ارسال **Sorting signal**

یک توالی نسبتاً کوتاه اسید آمینه‌ای که پروتئین را به وزیکول انتقالی ویژه هدایت می‌کند. این وزیکول از غشاء دهنده در مسیر اندوسیتوزی یا ترشحی جوانه می‌زند. جدول (۲ـ۱۴)

لکه‌گذاری ساترن **Southern blotting**

روشی برای تشخیص توالی DNA ویژه که توسط الکتروفوروز جدا شده‌اند. هر توالی به وسیله یک پروب اسیدنوکلئیک نشاندار هیبرید می‌شود. (شکل ۲۶ـ۵)

سازمان‌دهنده اسپمان **Spemann organizer**

مرکز سیگنالی در سمت پشتی جنین اولیه که در تشکیل الگوی قدامی، خلفی و پشتی - جلویی جنین عمل می‌کند.

SPF (sphase - promoting factor)

SPF (فاکتور پیش برنده فاز S)

یک پروتئین هترودیمر که از سیکلین G_1 و کیناز وابسته به سیکلین (CDR) تشکیل شده‌است. این پروتئین ورود سلول‌های یوکاریوتی به مرحله S چرخه سلولی را به وسیله فسفریله کردن پروتئین‌های ویژه انجام می‌دهد.

اسفنگولیپید **Sphingo lipid**

گروه بزرگی از لیپیدهای غشایی که از اسفنگوزین مشتق شده‌اند و شامل دو زنجیره بلند هیدروکربنی و یک گروه سرفسفریله شده (اسفنگومیلین) یا گروه سرکربوهیدراتی (سربروزیدها و گانگلیوزیدها) می‌باشد. (شکل ۵b-۱۰)

اسپلایسموزوم **Splicesome**

ترکیب ریبونوکلئوپروتئینی بزرگ که به پیش‌ساز mRNA متصل شده و پردازش RNA را انجام می‌دهد. (شکل ۱۱-۸)

SRE - binding protein (SREBPs)

پروتئین متصل شونده به SRE

فاکتورهای رونویسی وابسته به کلسترول که در غشاء ER قرار دارند و در پاسخ به سطح کلسترولی کم سلولی فعال شده و سپس بیان ژن‌های رمزدهی کننده پروتئینی دخیل در سنتز و وارد کردن کلسترول و همچنین سنتز سایر لیپیدها را تحریک می‌کند. (شکل ۳۸-۱۶)

نشاسته **Starch**

پلی‌ساکارید منشعب و بسیار طویل که منحصراً از واحدهای گلوکز ساخته شده‌اند و از منابع ذخیره کربوهیدرات در سلول‌های گیاهی می‌باشد.

استات **STAT**

انتقال سیگنال و فعال‌سازی رونویسی: دسته‌ای از فاکتورهای رونویسی که در سیتوزول به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده سیتوکینی فعال می‌شوند. (شکل ۲-۱۶)

حالت پایا **Steady state**

شرایطی در مسیر متابولیسم سلولی که سرعت تشکیل و سرعت مصرف مواد برابر می‌شوند تا این که غلظت مواد ثابت باقی بماند. (شکل ۲۳-۲)

سلول بنیادی **Stem cell**

یک سلول که می‌تواند خود را تبدیل کند تا بتواند به طور متناسب (قرینه) به دو سلول دختر با پتانسیل تمایزی مشابه با سلول بنیادی والدینی تقسیم شوند یا به طور نامتناسب (غیرقرینه) سلول‌های دختری با پتانسیل تمایزی متفاوت تولید کند. (شکل ۲-۲۱)

Stereocilia (sing stereocilium)

استروسیلیا

رشته‌های برجسته از سلول‌های مویی در اندام کورتی که به وسیله ارتعاش صدا حرکت می‌کنند و باعث دپلاریزه شدن اکسون‌های مرتبط با هر سلول مویی می‌شود. (شکل ۳۰-۲۳ و ۳۱-۲۳)

ایزومر فضایی **Stereoisomer**

دو ترکیب با فرمول‌های مولکولی یکسان که اتم‌ها به طور مشابه به هم پیوند خورده ولی آرایش فضایی اتم‌ها متفاوت است. در ایزومرهای نوری، اتم‌های متصل به کربن نامتقارن نسبت به هم تصویر آینه‌ای دارند و در دو شکل D و L هستند. ایزومرهای هندسی شامل اشکال سیس و ترانس دارای یک پیوند دوگانه می‌باشند.

استروئیدها **Steroids**

گروهی از هیدروکربن‌های چهار حلقه‌ای مثل کلسترول و ترکیبات وابسته به آن. بیشتر هورمون‌ها (مثل استروژن و پروژسترون) استروئیدی هستند. استرول‌ها، استروئیدهایی هستند که دارای یک یا چندین گروه هیدروکسیل می‌باشند (شکل ۵۲-۱۰).

سوبسترا **Substrate**

مولکولی که در واکنش کاتالیزی به وسیله یک آنزیم تغییر می‌کند.

Substrate - level - phosphrylation

فسفریلاسیون در سطح سوبسترا

تشکیل ATP از ADP و Pi که به وسیله آنزیم‌های سیتوزولی کاتالیز می‌گردد. تشکیل ATP به وسیله واکنش‌هایی غیروابسته به نیروی محرک پروتونی یا اکسیژن مولکولی انجام می‌گیرد.

گروه سولفیدریل **Sulfydryl - group (-SH)**

یک گروه جانشین در اسید آمینه سیستئین و سایر مولکول‌هایی که دارای یک اتم هیدروژن هستند و به صورت کوالانی به یک اتم سولفور متصل شده‌اند. گروه تیول نیز نامیده می‌شود.

جهش سرکوب‌کننده **Suppressor mutation**

جهشی که تأثیر فنوتیپی جهش ثانویه را معکوس می‌کند. جهش‌های سرکوب‌کننده مکرراً برای شناسایی ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین‌های واکنش‌دهنده استفاده می‌شوند. (شکل ۹a-۵)

هم‌انتقالی **Symport**

نوعی از هم انتقالی که در آن یک پروتئین غشایی (هم انتقال‌دهنده Symporter) مولکول یا یون متفاوت یا از غشاء

سلولی در جهت یکسان عبور می‌دهد. همچنین به انتقال متقابل مراجعه شود. (شکل ۳ـ۱۱ و 3bJ)

سیناپس **Synapse**

جایگاه تخصص یافته بین اکسون انتهایی یک نورون با نورون مجاورش یا با سایر سلول‌های تحریک شونده (مثل سلول‌های ماهیچه‌ای) که در این جایگاه پیام‌ها منتقل می‌شوند. در یک سیناپس شیمیایی پیام‌ها به وسیله یک میانجی عصبی منتقل می‌شوند. در یک سیناپس الکتریکی انتقال پیام‌ها از طریق اتصالات منفذدار متصل‌کننده سلول‌های پس‌سیناپس و پیش‌سیناپس به هم صورت می‌گیرد. (شکل ۴ـ۲۳)

سینسیتیوم **Synciytium**

یک سیتوپلاسم چند هسته‌ای که به وسیله یک غشاء پلاسمایی پوشیده شده است.

سیندکان‌ها **Syndecans**

دسته‌ای از پروتئوگلیکان‌های سطح سلولی که در چسبندگی ماتریکس سلولی و واکنش با اسکلت سلولی و شاید اتصال به سیگنال‌های خارجی عمل می‌کند. به این صورت در سیگنال‌دهی سلول ـ سلول شرکت می‌کند.

سینتنی **Synteny**

ظهور ژن‌هایی در نظم مشابه روی کروموزوم در دو یا چند گونه متفاوت.

جهش‌کشنده سنتزی **Synthetic lethal mutation**

جهشی که اثر فنوتیپی سایر جهش‌ها را در ژن‌های مشابه یا مرتبط افزایش می‌دهد. (شکل 5ـ9b,c)

T

جعبه TATA **TATA box**

توالی حفظ شده واقع در پروموتر بسیاری از ژن‌های رمزدهی کننده پروتئین یوکاریوتی، جایی که کمپلکس آغاز رونویسی به آنجا متصل می‌شود. (شکل ۱۲ـ۷)

سلول T **T cell**

لنفوسیتی که در تیموس بالغ شده و گیرنده‌های آنتی‌ژنی ویژه متصل به پپتیدهای آنتی‌ژنی در ترکیب با مولکول MHC را بیان می‌کند. دو دسته از سلول‌های T وجود دارد. سلول‌های T کشنده (دارای مارکر سطحی CD_8، محدود به کلاس MHCT که سلول‌های توموری و آلوده به ویروس را از بین می‌برد) و سلول‌های T کمکی و دارای مارکر CD_4 و محدود به کلاس MHC II و سیتوکین تولید کرده و برای فعال‌سازی سلول‌های β ضروری است) (شکل ۳۴ـ۴۴ و ۳۶ـ۲۴).

گیرنده سلول T **T cell receptor**

پروتئین هترودیمری گذرنده غشایی که به آنتی‌ژن متصل شده و دارای مناطق ثابت و متغیر می‌باشد. به ترکیب CD_3 چند زیرواحدی انتقال‌دهنده سیگنالی متصل است. (شکل ۲۹ـ۲۴)

تلومر **Telomere**

بخش انتهایی یک کروموزوم یوکاریوتی که دارای چندین توالی کوتاه تلومری تکراری پشت سرهم (TEL) می‌باشد. تلومرها برای تفکیک مناسب کروموزوم‌ها ضروری می‌باشند و به وسیله فرایند ویژه از کوتاه شدن کروموزوم‌های همانندسازی DNA جلوگیری کرده و همانندسازی می‌شوند.

تلوفاز **Telophase**

آخرین مرحله میتوزی که طی آن پوشش هسته در اطراف کروموزوم‌های جدا شده دوباره تشکیل می‌شود. کروموزوم‌ها تراکم خود را از دست داده و تقسیم سیتوپلاسم (سیتوکینز) کامل می‌گردد. (شکل ۳۴ـ۱۸)

جهش حساس به حرارت **Temperature sensitive (ts) mutation**

جهشی که فنوتیپ نوع وحشی را در یک دما (دمای مناسب (مجاز) تولید کرده اما فنوتیپ جهش یافته در دمای دیگر (دمای غیرمجاز (غیرمتناسب) تولید می‌کند. این نوع جهش در شناسایی ژن‌های ضروری برای زنده ماندن مفید است. (شکل ۶ـ۵)

ساختار سوم **Tertiary structure**

شکل سه‌بعدی یک زنجیره پلی‌پپتیدی در پروتئین‌ها که با چندین پیوند غیرکووالانی بین زنجیره‌های جانبی، پایدار می‌شود. (شکل ۱۰a ـ۳)

تیلاکوئید **Thylakoids**

کیسه‌های غشایی پهن در کلروپلاست که به حالت توده‌ای روی هم انباشته می‌شوند و دارای رنگدانه‌های فتوسنتزی و فتوسیستم‌ها می‌باشند.

اتصال محکم **Tight junction**

یک نوع اتصال سلول ـ سلول بین غشاء پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیال مجاور که از انتشار مولکول‌های بزرگ و بسیاری از مولکول‌های کوچک و یون‌ها در فضای میان سلول‌ها و همچنین انتشار ترکیبات غشایی از میان مناطق پایه‌ای جانبی و استوایی غشاء پلاسمایی جلوگیری می‌کند. (شکل ۱۵ـ۱۹)

گیرنده‌های شبه تول **Toll - likereceptor (TLR)**

عضوی از یک دسته گیرنده‌های داخلی سطح سلول که انواع

محصولات باکتری‌ها را تشخیص می‌دهد. اتصال لیگاند به این رسپتور مسیر سیگنال‌دهی ایجاد کرده و پاسخ‌های متعدد بسته به نوع سلول را تحریک می‌کند.

توالی توپوژنی **Topogenic sequence**

بخشی در یک پروتئین که توالی، تعداد و ترکیب آن ورود و جهت‌گیری دسته‌های متعدد پروتئین‌های گذرنده غشایی در غشاء شبکه آندوپلاسمی را موجب می‌گردد.

رونویسی **Tanscription**

فرآیندی که در آن یک رشته از مولکول DNA به عنوان الگو برای سنتز RNA مکمل به وسیله RNA پلیمراز به کار می‌رود (شکل ۱۰ـ۴ و ۱۱ـ۴).

منطقه کنترل ترجمه **Transcription - control rigion**

واژه کلی برای همه توالی‌های تنظیمی DNA که رونویسی ژن‌های ویژه را تنظیم می‌کند.

عامل رونویسی **Tanscription factor (TF)**

واژه عمومی برای هر پروتئین به جزء RNA پلیمراز که برای آغاز یا تنظیم رونویسی در سلول‌های یوکاریوتی ضروری است. فاکتورهای عمومی برای رونویسی همه ژن‌ها ضروری هستند و در تشکیل ترکیب آغاز رونویسی نزدیک جایگاه شروع شرکت می‌کنند. فاکتورهای اختصاصی، رونویسی ژن‌های ویژه را به وسیله اتصال به توالی تنظیمی‌شان تحریک (فعال) یا مهار می‌کنند.

واحد رونویسی **Transcription unit**

منطقه‌ای در DNA که دارای یک محل شروع و یک محل خاتمه رونویسی می‌باشد و این منطقه باعث تولید یک رونوشت اولیه می‌شود.

ترانس سیتوز **Ttranscytosis**

مکانیسم انتقالی مواد ویژه از صفحه انتقالی که با آندوسیتوز وابسته به گیرنده و اگزوسیتوز ترکیب می‌شود.

ترانس فکشن **Transfection**

ورود DNA بیگانه در محیط کشت به سلول میزبان است که معمولاً با بیان ژن‌های DNA وارد شده همراه می‌شود. (شکل ۳۲ـ۵)

RNA ناقل **Transfer RNA**

به tRNA مراجعه شود.

ترانسفورماسیون **Transformation**

۱ـ تغییرات ثابت وراثتی در یک سلول که در نتیجه جذب و اتصال یک DNA خارجی به ژنوم سلول میزبان روی می‌دهد، همچنین ترانس فکشن پایدار نیز نامیده می‌شود. ۲ـ تبدیل یک سلول طبیعی پستاندار به یک سلول سرطانی که در نتیجه تماس با یک ویروس یا سایر مواد سرطان‌زا رخ می‌دهد.

(TGFβ) transforming growth factor β

فاکتور رشد تغییر شکل β

یک خانواده از پروتئین‌های سیگنال که در تمایز بافت‌ها در بیشتر یا همه جانوران نقش دارد تعدادی از خانواده TGFβ اغلب رشد بافت‌هایی تحریک شده به وسیله آن را مهار می‌کنند. جهش در اجزاء انتقال سیگنال TGFβ در سرطان انسانی مثل سرطان سینه مشاهده شده است.

ترانس ژن **Transgene**

یک ژن کلون شده که به طور پایدار به یک سلول گیاهی یا جانوری وارد شده و به ژنوم آن ملحق گردیده و نسل‌های پی‌درپی از آن ایجاد می‌گردد.

ترانس ژنیک **Transgenic**

در ارتباط با هر گیاه یا جانوری که دارای یک ترانس‌ژن می‌باشد.

شبکه ترانس گلژی **Trans-Golgi network (TGN)**

شبکه پیچیده‌ای از غشاءها وزیکول‌ها که به عنوان محل جوانه زدن در مسیر ترشحی عمل می‌کند. جوانه زدن وزیکول‌ها بیشتر از بخش دور گلژی صورت گرفته و غشاء و پروتئین‌های محلول را به سطح سلول یا لیزوزوم‌ها منتقل می‌کند. (شکل ۱ـ۱۴ و ۱۷ـ۱۴)

حالت گذار **Transition state**

حالتی از واکنش‌گرها در طی یک واکنش شیمیایی که در آن سیستم در بالاترین سطح انرژی است. به آن حالت انتقالی واسطه نیز می‌گویند.

ترجمه **Translation**

تولید یک رشته پلی‌پپتیدی به واسطه ریبوزوم‌ها: توالی اسیدی آمینه‌ای توسط توالی نوکلئوتیدی در یک mRNA تعیین می‌شود. (شکل ۱۷ـ۴)

ترانسلوکان **Translocon**

یک مجموعه چند پروتئینی در غشاء شبکه آندوپلاسمی خشن که از میان آن پروتئین در حال سنتز وارد شبکه آندوپلاسمی می‌شود. (شکل ۷ـ۱۳)

پروتئین گذرنده غشایی **Transmembrane protein**

به پروتئین اینتگرال غشاء مراجعه شود.

پروتئین انتقالی **Transport protein**

به پروتئین انتقالی غشا مراجعه شود.

وزیکول انتقالی **Transport vesicle**

اجزاء دارای غشاء کوچکی که پروتئین‌های محموله ترشحی و غشایی را در مسیر ترشحی به داخل یا خارج سلول انتقال می‌دهد. وزیکول‌ها از اندامک‌های دهنده ایجاد شده و محتویات درون خود را با ترکیب شدن با غشاء هدف منتشر می‌کنند.

Transposable DNA element

عناصر قابل انتقال DNA

هر توالی DNA که در منطقه کروموزومی یکسان در همه افراد یک گونه وجود ندارد و می‌تواند به وسیله انتقال به مکان جدید حرکت کند. همچنین عنصر حرکتی DNA و توالی تکراری پراکنده نیز نامیده می‌شوند.

Transposition **انتقال**

حرکت عناصر قابل انتقال DNA در ژنوم که به وسیله مکانیسم برش و اتصال یا رونویسی ـ اتصال بسته به نوع عناصر حرکتی صورت می‌گیرد. (شکل ۸ـ۶)

Transposon DNA **ترانسپوزون DNA**

عناصر قابل انتقال DNA موجود در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها می‌باشد. این عناصر در ژنوم به وسیله مکانیسم درگیر در سنتز DNA و جابه‌جایی حرکت می‌کنند. همچنین به رتروترنسپوزون‌ها مراجعه شود.

Triacylglycerol **تری‌اسیل گلیسرول**

به تری‌گلیسیرید مراجعه شود.

Triglyceride **تری‌گلیسرید**

شکل عمده ذخیره و انتقال اسیدهای چرب در جانوران بوده و شامل سه زنجیره اسیدچرب می‌باشد که با یک مولکول گلیسرول استری شده است.

tRNA (transfer RNA) **tRNA (RNA ناقل)**

گروهی از مولکول‌های RNA کوچک که به عنوان دهنده اسید آمینه در طی سنتز پروتئین عمل می‌کنند. هر مولکول tRNA به طور کوالان به اسید آمینه ویژه متصل شده و یک ترکیب آمینواسیل ـ tRNA تشکیل می‌گردد.

Trophic factor **فاکتور تروفیک**

هر یک از بی‌شمار پروتئین‌های سیگنال‌دهی که برای زنده ماندن سلول در موجودات چند سلولی ضروری می‌باشد. در غیاب چنین سیگنال‌هایی، سلول به وسیله آپوپتوز تحت خودکشی قرار می‌گیرد.

Tubulin **توبولین**

یک خانواده از پروتئین‌های کروی اسکلت سلولی که برای تشکیل دیواره ریزلوله‌ها پلیمریزه می‌شوند.

Tumor **تومور**

یک توده سلولی منشأ گرفته از یک سلول که در نتیجه از دست دادن تنظیم‌کننده‌های رشد سلولی طبیعی ایجاد می‌شود و ممکن است خوش‌خیم یا بدخیم باشد.

Tumor - suppressor gene **ژن‌های سرکوبگر تومور**

هر ژن رمزدهی کننده پروتئین که به طور مستقیم یا غیرمستقیم پیشرفت چرخه سلولی را مهار می‌کند. از دست رفتن عملکرد این پروتئین‌ها در اثر جهش انکوژنیک می‌باشد. وراثت یک الل جهش یافته از ژن‌های بازدارنده توموری (مثل BRCA1, APC, RB) باعث افزایش پیشرفت سرطان کلورکتال یا سایر سرطان‌ها می‌شود. (شکل ۱۱ـ۲۵ و ۹ـ۲۵)

U

Ubiquitin **یوبی‌کوئیتین**

یک پروتئین کوچک که می‌تواند به طور کووالان به سایر پروتئین‌های داخل سلولی متصل شود و به این وسیله پروتئین‌ها را برای تخریب به وسیله پروتئوزوم، انتقال به لیزوزوم یا تغییر در عملکرد پروتئین هدف نشاندار کند.

Uncouper **جداکننده**

هر ماده طبیعی (پروتئین ترموژنین) یا ماده شیمیایی (۲ و ۴ دی‌نیتروفنل) که نیروی حرکت پروتونی را در غشای داخلی میتوکندری یا غشای تیلاکوئید کلروپلاست از بین می‌برد و به این وسیله جلوی سنتز ATP را می‌گیرد.

Uniport **تک‌انتقالی**

نوعی انتقال که در آن یک پروتئین غشایی (پروتئین انتقال‌دهنده) انتقال مولکول‌های کوچک را از غشا در جهت شیب غلظتی از طریق انتشار تسهیل شده انجام می‌دهد. انتقال‌دهنده گلوکز (پروتئین GLUT) مثال خوبی از پروتئین تک انتقالی است و به خوبی مطالعه شده است. (شکل ۳ـ۱۱ و [3A])

Unsaturated **اشباع نشده**

در ارتباط با ترکیب (مثل اسیدچرب) که در آن یکی از پیوندهای کربن ـ کربن پیوند دوگانه یا سه‌گانه می‌باشد.

Upstream **بالادست (فرادست)**

۱- جهتی بر روی DNA که طی رونویسی برخلاف جهت حرکت RNA پلیمراز می‌باشد. نوکلئوتیدهای فرودست با جایگاه‌های ۱+ (نوکلئوتید شروع رونویسی) و نوکلئوتیدهای بالادست با جایگاه‌های ۱ـ و ۲ـ و غیره مشخص می‌شود. ۲ـ رویدادهایی که در مراحل آبشاری اتفاق می‌افتد (مثل مسیر سیگنال‌دهی). همچنین به فرودست مراجعه شود.

Upstream activating sequence (USA)

توالی فعال کننده بالادست

هر پروتئین متصل شده به توالی تنظیمی در DNA مخمر و سایر یوکاریوت‌های پست که برای حداکثر بیان ژن ضروری می‌باشد. در یوکاریوت‌های عالی این توالی‌ها به جای توالی‌های

تشدیدکننده یا عناصر نزدیک پروموتر قرار دارند.

V

واکسن **Vaccine**

ترکیب بی‌ضرر که از پاتوژن‌ها تشکیل می‌شود و پاسخ ایمنی را به منظور ایجاد ایمنی در تهاجم‌های میکروبی بعدی به وسیله یک شکل کشنده از همان پاتوژن تحریک می‌کند.

میانکنش واندروالس **Vander waals interaction**

یک پیوند غیرکوالانی ضعیف که در اثر عدم تقارن کوچک و گذرای ابرالکترونی در اطراف اتم‌ها (دوقطبی‌ها) ایجاد می‌گردد (شکل ۱۰ـ۲).

وکتور (حامل) **Vector**

عنصر ژنتیکی که می‌تواند به طور خودکار همانندسازی کند و برای انتقال قطعات DNA یا cDNA به داخل ژنوم سلول میزبان به هدف کلون کردن ژن به کار می‌رود. اغلب وکتورها، پلاسمیدهای باکتری‌ها و ژنوم‌های باکتریوفاژ تغییر داده شده می‌باشند. همچنین به وکتور بیانی و وکتور شاتل مراجعه شود. (شکل ۱۳ـ۵)

پاکت ویروسی **Viral envelop**

دو لایه فسفولیپیدی که پوشش بیرونی بعضی ویروس‌ها (مثل ویروس‌های آنفلونزا و هاری) را تشکیل می‌دهد و به وسیله جوانه زدن از غشای سلول میزبان حاصل شده و شامل گلیکوپروتئین‌های رمزدهی کننده ویروس می‌باشد.

ویریون **Virion**

یک ذره ویروسی.

ویروس **Virus**

یک انگل داخل سلولی کوچک که از اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) احاطه شده به وسیله پوشش پروتئینی تشکیل می‌شود و فقط در سلول‌های میزبان حساس شده همانندسازی می‌کند. به طور گسترده در تحقیقاتی زیست‌شناسی سلولی استفاده می‌شود. (شکل ۴۴ـ۴)

سرعت حداکثر **Vmax**

پارامتری که حداکثر سرعت یک واکنش کاتالیز آنزیمی یا فرآیندهای دیگر مثل انتقال مولکول‌ها به واسطه پروتئین از غشاء پلاسمایی را توصیف می‌کند. (شکل ۲۲ـ۳ و ۴ـ۱۱)

W

لکه‌گذاری وسترن **Western blotting**

روشی که در آن پروتئین‌های جدا شده به وسیله الکتروفورز به یک غشاء نیتروسلولزی یا غشاءهای دیگر متصل می‌شود و پروتئین‌های خاص به وسیله آنتی‌بادی‌های نشاندار تشخیص داده می‌شوند. همچنین به آن ایمونوبلات نیز می‌گویند. (شکل ۳۸ـ۳)

نوع وحشی **Wild type**

حالت طبیعی و جهش نیافته یک ژن، پروتئین، سلول یا موجود زنده.

Wnt **Wnt**

خانواده‌ای از پروتئین‌های سیگنال‌دهی ترشحی که در تمایز بیشتر بافت‌ها در همه یا اکثر جانوران نقش دارند. جهش در Wnt ترکیبات انتقال سیگنالی در سرطان‌های انسانی مشاهده می‌شود. گیرنده‌های این پروتئین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های مارپیچی بوده و دارای هفت قسمت گذرنده از غشاء هستند.

X

کریستالوگرافی اشعه X **X- ray crystallography**

روشی است که برای تشخیص ساختار سه بعدی مولکول‌های بزرگ (به ویژه اسیدهای نوکلوئیک و پروتئین‌ها) استفاده می‌شود به وسیله عبور اشعه X از میان کریستال (بلور) مولکول‌های خالص و آنالیز پراکنش نقطه‌های جدا از هم، این کار انجام می‌گیرد.

Z

انگشت روی **Zinc finger**

چندین موتیف ساختاری متصل به DNA که از ساختارهای ثانویه تشکیل شده است.

زیگوت (تخم) **Zygote**

یک تخم لقاح یافته. سلول دیپلوئیدی که در نتیجه ترکیب گامت‌های نر و ماده ایجاد شده است.